

# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



## Original

### Análisis de la variación intraespecífica de *Conidiobolus coronatus* usando RAPD y secuencias ITS

Carolina Pérez-Martínez<sup>a,\*</sup>, Reyna I. Rojas-Martínez<sup>a</sup>, Raquel Alatorre-Rosas<sup>a</sup>, Francisco Hernández-Rosas<sup>b</sup> y Gabriel Otero-Colina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, México

<sup>b</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Amatlán de los Reyes, México

#### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

##### Historia del artículo:

Recibido el 19 de octubre de 2010

Aceptado el 15 de octubre de 2012

On-line el 14 de enero de 2013

##### Palabras clave:

Entomoftores

Factor de virulencia

Multihospedero

Rinoentomoftomicosis

Variación intraespecífica

#### RESUMEN

**Introducción:** El hongo *Conidiobolus coronatus* (*C. coronatus*) tiene una extensa distribución de hábitats y organismos; se encuentra en forma saprofítica, ataca insectos y mamíferos, incluido el humano, aunque de este los reportes son pocos y están restringidos a zonas tropicales. El objetivo de este trabajo fue determinar si existe o no variación genética entre aislamientos de *C. coronatus* provenientes de lesiones en humanos y otras fuentes.

**Métodos:** Once aislamientos de *C. coronatus* obtenidos de suelo, insectos y humanos se analizaron con las técnicas de polimorfismo derivado de la amplificación aleatoria de ADN (RAPD) y secuenciación del espaciador interno transcrita (ITS1-5.8S rADN-ITS2); para el análisis de las regiones ITS se usaron los métodos de máxima parsimonia, neighbour-joining (NJ) y mínima evolución.

**Resultados:** El análisis de los polimorfismos de *C. coronatus* con las técnicas RAPD e ITS evidenció altos niveles de variación intraespecífica en los aislamientos evaluados. Los aislamientos obtenidos de lesiones en humanos presentan la mayor divergencia genética respecto de los obtenidos de otras fuentes; la mayor distancia genética entre grupos de aislamientos se da entre los provenientes de humanos y los tomados del insecto *Lycoriella ingenua*.

**Conclusiones:** Este trabajo es el primero en evaluar y demostrar que existe variación intraespecífica a nivel molecular de *C. coronatus* que, a su vez, está relacionada con la fuente de la que se obtuvieron.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Intraspecific variation analysis of *Conidiobolus coronatus* using RAPD and ITS sequencing

#### ABSTRACT

##### Keywords:

Entomophthorales

Virulence factor

Multi-host

Rhinoentomophthoromycosis

Within species variation

**Introduction:** The fungus *Conidiobolus coronatus* (*C. coronatus*) has an extensive distribution of habitats and hosts. It is found saprophytically, and attacks insects and mammals, including humans. Although there are few reports on humans, and they are restricted to tropical areas. The aim of this work was to determine whether genetic variation exists between *C. coronatus* isolates coming from human lesions and other sources.

**Methods:** A total of 11 *C. coronatus* isolates obtained from soil, insects and humans were analyzed with the random amplification of polymorphic ADN (RAPD) and internal transcribed spacer (ITS) techniques; the maximum parsimony, neighbour-joining and minimum evolution methods were used for the ITS analysis.

**Results:** The analysis of the *C. coronatus* polymorphisms showed high intra-species variation levels between the evaluated isolates. The isolates coming from human lesions showed the greatest genetic divergence compared with the remaining isolates. The greatest genetic distance between isolate groups was found between those coming from humans and those taken from the insect *Lycoriella ingenua*.

**Conclusions:** This is the very first work evaluating and demonstrating that within species variation exists at molecular level in *C. coronatus*, and is related to the source where the isolates were taken from.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [caroperez@colpos.mx](mailto:caroperez@colpos.mx) (C. Pérez-Martínez).

## Introducción

*Conidiobolus coronatus* (*C. coronatus*) (Entomophthorales) es un hongo cosmopolita y patógeno de insectos de diferentes órdenes<sup>1</sup>; se ha encontrado sobre madera en descomposición, hojarasca, suelo<sup>2</sup> y también como patógeno de mamíferos, incluyendo al hombre, a quien produce rinoentomoftomicosis, que afecta la superficie del tracto respiratorio, puede dañar la mucosa nasal y paranasal e incluso extenderse a la piel de la nariz, labio superior y área fronto-glabelar<sup>3</sup>.

El reporte de daño en humanos es poco frecuente y se restringe a regiones con climas tropicales y de alta humedad<sup>4</sup>. La extensa distribución de *C. coronatus* y los pocos casos de rinoentomoftomicosis reportados sugieren que no todos los aislamientos son patógenos para el humano y animales superiores<sup>3,5</sup>.

En la planta de producción de champiñones (*Agaricus bisporus*) Hongos Rioxal (Perote, Veracruz, México) se detectó un brote epizoótico de *C. coronatus* sobre moscas de la especie *Lycoriella ingenua* (*L. ingenua*), considerada la principal plaga del champiñón<sup>6</sup>. El champiñón se produce en naves cerradas que presentan condiciones similares a un clima tropical húmedo<sup>7</sup> y en las que hay moscas infectadas por *C. coronatus*. Los trabajadores se exponen a ambos factores por períodos prolongados, lo que implica que se encuentran en contacto con las esporas del hongo y, a pesar de ello, no existen reportes de rinoentomoftomicosis originados en plantas de producción de champiñón.

La relación entre *C. coronatus* y su amplia gama de hospederos es digna de estudio y se puede considerar un indicio de variación intraespecífica. Basado en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue investigar si existe o no variación genética entre aislamientos de *C. coronatus* provenientes de lesiones en humanos y otras fuentes (suelo, insecto, compost).

Para determinar la variabilidad genética entre aislamientos provenientes de diferentes hospederos se requiere del uso de técnicas moleculares<sup>8</sup>. El espaciador interno transcrita (ITS por sus siglas en inglés) es el locus más popular en la investigación micológica basada en secuencias; es el más exitoso para la identificación de un gran número de hongos, por lo que se ha designado como un marcador de ADN del código de barras universal para hongos; además, su probada capacidad para el estudio de la variación inter- e intraespecífica lo convierte en una herramienta muy poderosa<sup>9-12</sup>. De igual

modo, la técnica de polimorfismo derivado de la amplificación aleatoria de ADN (RAPD por sus siglas en inglés) ha adquirido diversos usos en el estudio de la diversidad genética; en los hongos ha sido utilizada con éxito principalmente en estudios intraespecíficos<sup>13</sup>. Se implementaron estas 2 técnicas en 11 aislamientos de *C. coronatus* y sus resultados se analizaron y discutieron en términos de la distancia genética según la fuente de la que fueron aislados (suelo, insecto y humano).

## Materiales y métodos

### Aislamientos

Se usaron 11 aislamientos de *C. coronatus*; 8 de ellos se obtuvieron de colecciones públicas y 3 se aislaron por cuenta propia (Lyco 1, 4 y 5). Todos se procesaron para analizarlos con las técnicas RAPD y amplificación de la región ITS1-5.8S rADN-ITS2 (intrones ubicados entre los genes rADN 28S y 18S). La lista de todos los aislamientos y la fuente de que se tomaron se muestra en la tabla 1.

Los aislamientos de *C. coronatus* Lyco 1, 4 y 5 se obtuvieron en la planta de producción de champiñones Hongos Rioxal (según método de Papierok y Hajek<sup>14</sup>), donde se detectó el brote epizoótico de un hongo entomopatógeno sobre moscas de la especie *L. ingenua*, que fue identificado por el especialista Arthur A. Callaghan como *C. coronatus*. Todos los aislamientos presentaron las características morfológicas propias de la especie (por ejemplo, conidios vellosos producidos solo por esta especie). Se realizaron los postulados de Koch y con ellos se comprobó que *C. coronatus* fue el agente causal de la enfermedad sobre *L. ingenua*.

Los 11 aislamientos de *C. coronatus* se mantuvieron a temperatura ambiente y se preservaron en agua destilada estéril. Para su desarrollo, se inocularon en medio agar dextrosa Sabouraud a 25 °C.

### Extracción de ADN

Se obtuvo micelio liofilizado de los 11 aislamientos de *C. coronatus* siguiendo el método descrito por Guzmán-Franco et al.<sup>15</sup>. El ADN se extrajo mediante el método CTAB (bromuro de hexacetyltrimetilamonio) modificado de Ahrens y Seemüller<sup>16</sup>. El macerado se colocó en un tubo Eppendorf con 400 µl de solución de lisis (cloruro de sodio 0,4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, PVP 1%) y

**Tabla 1**

Lista de aislamientos usados

Especie	Código de aislamiento	Origen	Sitio de colecta	No. Acceso NCBI
<i>C. coronatus</i>	Lyco 1	<i>Lycoriella ingenua</i> (Diptera: Sciaridae) <sup>a,b,c,d</sup>	Méjico, Planta Hongos Rioxal	HQ602772
<i>C. coronatus</i>	Lyco 4	<i>Lycoriella ingenua</i> (Diptera: Sciaridae) <sup>a,b,c,d</sup>	Méjico, Planta Hongos Rioxal	HQ602773
<i>C. coronatus</i>	Lyco 5	<i>Lycoriella ingenua</i> (Diptera: Sciaridae) <sup>a,b,c,d</sup>	Méjico, Planta Hongos Rioxal	HQ602774
<i>C. coronatus</i>	ARSEF 512	<i>Nilaparvata lugens</i> (Hemiptera: Delphacidae) <sup>a,b,d</sup>	Malasia	HQ602775
<i>C. coronatus</i>	ARSEF 1884	<i>Mocis latipes</i> (Lepidoptera: Noctuidae) <sup>a,b,d</sup>	Brasil	HQ602776
<i>C. coronatus</i>	ATCC 32865	Humano <sup>a,b,d</sup>	Greer, EE. UU.	HQ602777
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 4:004	Muestra de suelo de una plantación de pino <sup>a,b,d</sup>	Reino Unido	HQ602778
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 15:008	Muestra de suelo de las orillas de un área de pastoreo <sup>a,b,d</sup>	Reino Unido	HQ602779
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 10:027	Muestra de suelos de plantación de hoja ancha <sup>a,b,d</sup>	Reino Unido	HQ602780
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 1:037	Muestra de suelos de una plantación de pino alerce ( <i>Larix spp.</i> ) <sup>a,b,d</sup>	Reino Unido	HQ602781
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 04:427	Muestra de suelos de una plantación de pino alerce ( <i>Larix spp.</i> ) <sup>a,b,d</sup>	Reino Unido	HQ602782
<i>C. coronatus</i>	VPCI-126P	Humano <sup>b,e</sup>	India (Norte)	FN421422
<i>C. coronatus</i>	P1	Insecto <sup>b,e</sup>	Hungría	AJ345094
<i>C. coronatus</i>	FSU 784	Compost de champiñón <sup>b,e</sup>	Alemania (Braunschweig)	JN943011,1
<i>C. thromboides</i>	FSU 785	<i>Myzus persicae</i> <sup>b,e</sup>	EE. UU.	JN943012,1

ARSEF: provenientes de la USDA-ARS Entomopathogenic Fungus Collection (Ithaca, New York EE. UU.); ATCC 32865: proveniente de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE. UU.); Lyco: estos aislamientos se colectaron de la planta de champiñones Rioxal (Méjico); STAFFS: procedentes de la colección del Dr. Arthur A. Callaghan de la Universidad Staffordshire, College Road, U.K.

<sup>a</sup> Aislamientos usados en el análisis RAPD.

<sup>b</sup> Aislamientos usados en el análisis ITS.

<sup>c</sup> Aislamientos obtenidos en este estudio.

<sup>d</sup> Las secuencias ITS se obtuvieron en este estudio.

<sup>e</sup> Las secuencias ITS se obtuvieron del NCBI Genbank.

**Tabla 2**

Secuencia de los iniciadores RAPD y fragmentos amplificados

Iniciador	Secuencia (5' → 3')	Número de fragmentos	Fragmentos polimórficos (%)
A03	5'-AGTCAGGCCAC-3'	9	2 (22)
A18	5'-AGGTGACCGT-3'	5	4 (80)
B01	5'-GTT TCG CTC C-3'	3	3 (100)
B02	5'-TGA TCC CTG G-3'	3	3 (100)
B03	5'-CAT CCC CCT G-3'	3	1 (33)
B04	5'-GGA CTG GAG T-3'	5	4 (80)
B06	5'-TGC TCT GCC C-3'	2	2 (100)
B07	5'-GGT GAC GCA G-3'	2	1 (50)
B10	5'-CTG CTG GGA C-3'	2	2 (100)
B11	5'-GTA GAC CGG T-3'	2	2 (100)
B13	5'-TTC CCC CGC T-3'	2	1 (50)
B15	5'-GGA GGG TGT T-3'	6	6 (100)
B17	5'-AGG GAA CGA G-3'	5	4 (80)
Total		48	34 (70,83)

se mezcló con un agitador vórtex para homogenizar. Enseguida se agregaron 50 µl de SDS 20%, 40 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 65 °C durante una hora. Después se agregaron 600 µl de solución CTAB 3% (Sigma Chemicals, EE. UU.) y se incubó nuevamente durante 45 min a 65 °C. Posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y centrifugó 10 min a 14.000 rpm, donde se formaron 2 fases; la fase acuosa se colocó en un tubo Eppendorf con un volumen de isopropanol y se incubó a -20 °C por 60 min; después se centrifugó 10 min a 14.000 rpm. El ADN fue resuspendido en 50 µl de agua destilada estéril; la concentración y calidad del ADN se estimó con un NanoDrop ND-1000 V3.7 (Thermo Scientific®, EE. UU.). Por último, el ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1% en 1 X de buffer TBE (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 0,002 M) teñido con bromuro de etidio (0,5 µg ml<sup>-1</sup> por 10 min) y se fotografió con un fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®, EE. UU.).

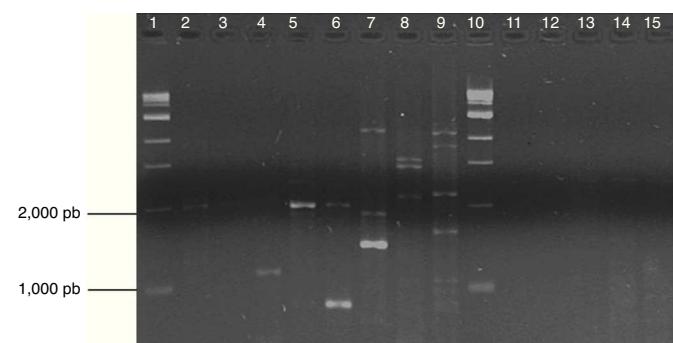
#### Amplificación RAPD

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se realizó en un termociclador My Cycler™ Thermal cycler BIO-RAD modelo 580BR 09275. Se usaron tubos Eppendorf de 0,5 ml; el volumen final de la mezcla fue 25 µl/PCR y contenía 4 µl de ADN (80 ng/µl), buffer 10x, cloruro de magnesio 3 mM, 2,5 mM de cada dNTP (Gene Choice), 1,5 U de Taq polimerasa (Bioningenia) y 2 µl de cada iniciador (10 pmol). Se utilizaron iniciadores aleatorios de la serie A de Operon Technology® y de la serie B de Invitrogen (tabla 2). De 19 iniciadores probados, solo aquellos que dieron resultados reproducibles (3 amplificaciones) se utilizaron en el análisis RAPD, por lo que al final se seleccionaron 13.

El programa de amplificación fue de un ciclo de desnaturación inicial a 94 °C por un min, seguido de 38 ciclos de desnaturación a 94 °C por 30 s, hibridación a 35 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 1,5 min, seguido de una extensión final a 72 °C durante 5 min. El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó usando un marcador de peso molecular de 1 kb (QIAGEN). En la amplificación de cada iniciador se utilizaron como testigos *Zoophthora radicans* (aislado de *Plutella xylostella*) y *Cercospora agavicola* (aislado de *Agave tequilana*) (fig. 1), que no se incluyeron en el análisis de datos RAPD. El manejo de estos aislamientos (crecimiento y extracción de ADN) se describe en Guzmán-Franco et al.<sup>15</sup> y Ayala-Escobar et al.<sup>17</sup>

#### Ánalisis de datos RAPD

La presencia o ausencia de patrones de bandas RAPD se consideró como un carácter independiente y se analizó visualmente a partir de fotografías de los geles de agarosa; la presencia se



**Figura 1.** Productos de PCR con el iniciador RAPD A18 en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 10: marcadores; carriles 2-4: Lyco 1, 4 y 5; carriles 5 y 6: ARSEF 512 y 1884; carril 7: ATCC 32865; carriles 8 y 9 testigos (*Z. radicans* y *C. agavicola*); carril 11-15: STAFFS 4:004, STAFFS 15:008, STAFFS 10:027, STAFFS 1:037, STAFFS 04:427.

registraba con 1 y la ausencia con 0. Con estos resultados se construyó una matriz binaria donde se encontraban los polimorfismos de cada uno de los iniciadores. A partir de dicha matriz de similitud y del coeficiente de apareamiento simple, se construyó un dendrograma; para generar y visualizar las relaciones se usó NTSYS 2.0. Para obtener un dendrograma de mayor solidez se realizaron 1.000 réplicas Bootstrap (BS) con Winboot.

#### Amplificación de la región ITS

Se amplificaron las regiones ITS1-5.8 ADNr-ITS2 del ADN ribosomal para los 11 aislamientos de *C. coronatus* usando los iniciadores universales ITS 5 (5'GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) e ITS 4 (5'TCCCCGCTTATTGATATGC)<sup>18</sup>. Las amplificaciones se realizaron en tubos Eppendorf de 0,5 ml y el volumen final de la muestra por reacción fue 25 µl. Cada reacción contenía 2 µl de ADN (80 ng/µl), buffer 10x, cloruro de magnesio 2,6 mM, 2,5 mM de cada dNTP (Gene Choice), 1,5 U/µl de Taq polimerasa, 2 µl de cada iniciador (20 pmol). Los tubos testigos contenían agua destilada estéril en lugar de ADN. El programa de amplificación fue de un ciclo de desnaturación inicial a 95 °C por 5 min, después 35 ciclos de desnaturación a 95 °C por 30 s, hibridación a 50 °C por un min, extensión a 60,3 °C por 1,5 min y una extensión final a 72 °C durante 5 min. El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó usando marcadores de peso molecular de 1 kb y 100 pb (QIAGEN).

Para encontrar diferencias a nivel de nucleótidos entre los aislamientos, los productos de PCR-ITS se enviaron para su limpieza y secuenciación a la empresa Macrogen (Corea). La secuenciación se realizó en ambas direcciones usando los iniciadores universales 4 y 5<sup>18</sup>.

#### Ánalisis de datos de la región ITS

Las 11 secuencias de ITS se editaron manualmente con Bioedit y FinchTV 1.3. El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con Clustal W. Las secuencias se depositaron en el NCBI Genbank (tabla 1). Para construir un árbol filogenético más confiable, adicionales a las 11 secuencias de *C. coronatus* obtenidas en este estudio, se utilizaron 3 secuencias de *C. coronatus* y una de *Conidiobolus thomboideus* del NCBI Genbank (tabla 1).

La selección de *C. thomboideus* como grupo externo se hizo a partir de un blast (NCBI Genbank) con las 11 secuencias de *C. coronatus* y un análisis de parsimonia, cuyos resultados arrojaron que está estrechamente emparentado con *C. coronatus* pero es diferente en la región ITS.

Con MEGA5 se construyó un árbol filogenético con los métodos de máxima parsimonia, neighbour-joining (NJ) y mínima evolución; en los 2 últimos se usó el modelo de Tamura-Nei. Para evaluar

**Tabla 3**

Ánálisis de sitios variables totales y en el interior cada grupo en la región ITS1-5.8S rADN-ITS2

Grupo	Totales	Sitios variables				Número de aislamientos
		ITS 1	5.8	ITS2		
Insecto	29	19	1	9		6
Suelo	22	13	1	8		5
Humano	5	3	0	2		2
Compost	-	-	-	-		1
Totales	69	40	3	26		14

la confianza de la relaciones filogenéticas; la solidez de los nodos se estimó por análisis BS con 2.000 réplicas.

Para analizar más a fondo la diversidad genética de los aislamientos, las secuencias de ITS se agruparon de acuerdo con su sustrato u hospedero: 1) insecto, 2) suelo, 3) humano y 4) compost; con el programa MEGA5 se hizo un recuento para determinar el número de sitios variables en el interior de cada grupo y entre todos los grupos, así como la región en la que se encontraban (ITS1-5.8S rADN-ITS2) (tabla 3). Para estas 2 evaluaciones no se consideró al grupo externo.

## Resultados

### Análisis RAPD

Los iniciadores seleccionados amplificaron 48 bandas con una variación polimórfica de 22 a 100%; se obtuvieron 34 bandas polimórficas, resultando en 70,83% de polimorfismo; se obtuvieron de 2 a 9 bandas por iniciador (tabla 2). La figura 1 muestra los patrones de bandeo obtenidos por la amplificación con el iniciador A18 y se aprecia la diferencia genética entre los aislamientos evaluados procedentes de diferentes fuentes.

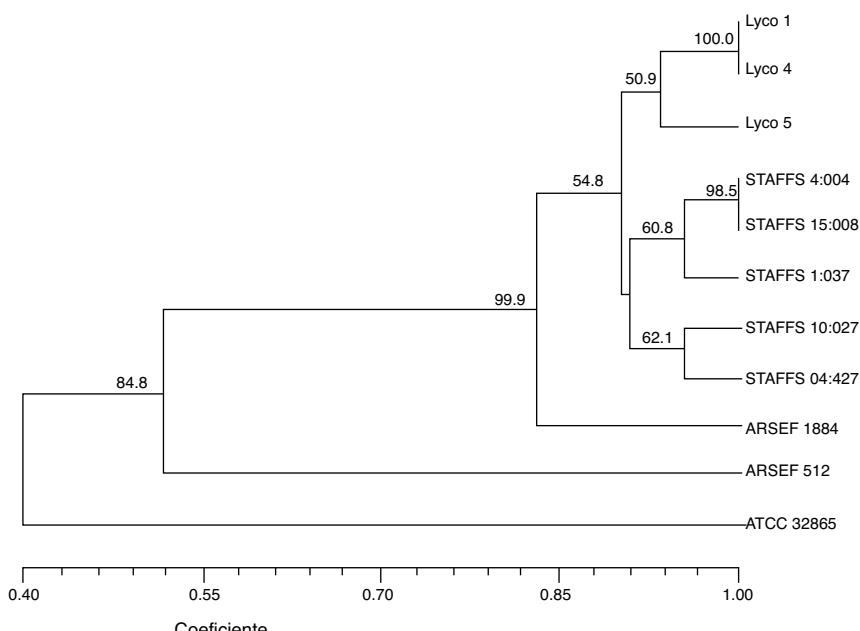
El dendrograma construido a partir del análisis de los patrones de bandeo obtenidos con los 13 iniciadores revela la formación de 4 grupos principales (A, B, C y D) con un 40% de similitud. Los resultados indican un alto nivel de diversidad genética. La estabilidad de los agrupamientos obtenidos se evaluó con un análisis BS con

1.000 réplicas (fig. 1). El grupo A incluye 8 aislamientos divididos en 2 subgrupos, I y II; el subgrupo I contiene los aislamientos obtenidos de *L. ingenua* Lyco 1, Lyco 4 y Lyco 5 (Lyco 1 y Lyco 4 tienen un 100% de similitud); el subgrupo II está formado por los aislamientos de suelo STAFFS 4:004, STAFFS 15:008, STAFFS 1:037, STAFFS 10:027 y STAFFS 04:427 (STAFFS 4:004, STAFFS 15:008 tienen un 100% de similitud). El grupo B solo incluye el aislamiento ARSEF 1884 tomado de *Mocis latipes*, con 80% de similitud. El grupo C solo incluye el aislamiento ARSEF 512 proveniente de *Nilaparvata lugens*, con 50% de similitud. En el grupo D solo está el aislamiento ATCC 32865 proveniente de lesiones humanas, con 40% de similitud, y este presenta la mayor distancia genética respecto del resto de los aislamientos (fig. 2).

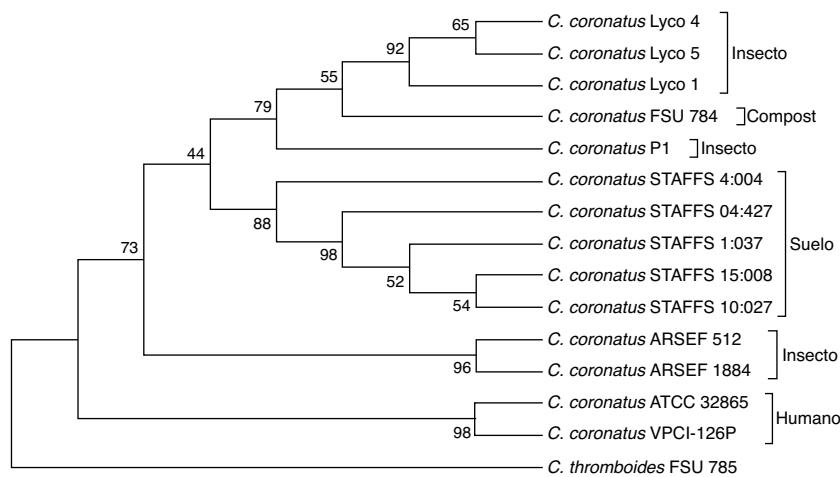
### Análisis de la región ITS

Los iniciadores ITS usados<sup>18</sup> amplificaron un fragmento de 666 pb (los espacios se consideraron como sitios informativos) correspondiente a las regiones ITS1-5.8S rADN-ITS2 en los 11 aislamientos evaluados. La longitud de cada una de las regiones fue homogénea en todos los aislamientos: ITS1 223 pb; 5.8S rADN, 155 pb; ITS2, 288 pb. El alineamiento y análisis de las secuencias con el programa MEGA5 de la región ITS1-5.8S rADN-ITS2 de aislamientos de *C. coronatus* (tabla 1) muestra 69 sitios variables entre los 14 aislamientos. De estos, 40 se encuentran en ITS1, convirtiéndola en la región más polimórfica, tanto de todos los grupos como de los aislamientos de cada grupo. La región 5.8S es la más conservada, ya que solo presenta 3 sitios variables entre los 14 aislamientos. En el interior de cada grupo también hubo diferencias en el número de sitios variables totales, siendo el grupo procedente de insectos el de mayor número (29) y el grupo de humanos el más homogéneo (5) (tabla 3).

La variabilidad de la región ITS proporcionó información acerca de los patrones de diversificación de *C. coronatus*. Se construyó un árbol filogenético con los métodos estadísticos de máxima parsimonia, neighbour-joining (NJ) y mínima evolución y usando a *C. thomboides* como grupo externo. Se obtuvo el mismo resultado con las 3 aproximaciones tanto en la topología como en el soporte de las ramas (valor BS); la región ITS diferenció claramente a



**Figura 2.** Dendrograma construido a partir del análisis de fragmentos de ADN de 11 aislamientos de *C. coronatus* amplificados con 13 iniciadores RAPD. Los números en cada punto de los nodos representan los valores Bootstrap.



**Figura 3.** Árbol filogenético basado en la secuencia de la región ITS de *C. coronatus*, usando el método NJ. Se usó *C. thromboides* como grupo externo. Los números cercanos a los nodos representan valores Bootstrap expresados como porcentaje de 2.000 repeticiones.

*C. coronatus* de *C. thromboides* (especie cercanamente relacionada). En la figura 3 se muestra el árbol resultado del análisis de NJ.

Las distancias genéticas entre aislamientos se representan por la longitud de la rama de los grupos que se forman. Se formaron los grupos A, B y C. El grupo A incluye 10 aislamientos divididos en los subgrupos I y II; el subgrupo I contiene los aislamientos Lyco 1, Lyco 4 y Lyco 5 (obtenidos *L. ingenua*), FSU 784 (obtenido de compost de champiñón) y P1 (obtenido de insecto). En el subgrupo II se encuentran los aislamientos STAFFS 4:004, STAFFS 15:008, STAFFS 10:027, STAFFS 1:037 y STAFFS 04:427 (obtenidos de suelo); el valor BS del nodo que une a los subgrupos I y II es bajo (44%), pero el valor BS del nodo que une a los aislamientos del subgrupo I es de 79% y del subgrupo II es de 88%. El grupo B incluye los aislamientos ARSEF 512 y ARSEF 1884 (aislados de insectos homópteros y coleópteros, respectivamente) y por último, en el grupo C se encuentran los aislamientos ATCC 32865 y VPCI-126P (tomados de lesiones humanas). Este grupo presenta la mayor distancia genética respecto de los demás aislamientos y su valor BS es de 98%.

## Discusión

Los resultados de este trabajo muestran la evidente variación genética entre los aislamientos de *C. coronatus* evaluados, agrupados según su origen en: 1) insecto, 2) compost, 3) suelo y 4) humano.

A pesar de que los principios de la técnica con secuencias de ITS difieren de los de la técnica RAPD<sup>19,20</sup>, se cumple con lo que indica Soll<sup>21</sup>, quien afirma que para que los resultados obtenidos con un método se consideren válidos, deben confirmarse con al menos una técnica diferente. Nuestros resultados son consistentes con ambas técnicas basados en que: 1) existe variación intraespecífica en los aislamientos evaluados; 2) los aislamientos de humanos presentan la mayor divergencia genética respecto del resto de los aislamientos; 3) la mayor distancia genética entre grupos de aislamientos se da entre los provenientes de humanos y los Lycos (aislados de *L. ingenua*).

Aun cuando resultados como los de Ribes et al.<sup>5</sup>, Valle et al.<sup>3</sup> y Wieloch et al.<sup>4</sup> sugieren que no todos los aislamientos son patógenos para el humano y que, a su vez, esto es un indicio de variación intraespecífica del hongo, no hay estudios que lo respalden. Este trabajo es el primero en evaluar y demostrar que existe variación intraespecífica a nivel molecular de *C. coronatus* relacionada con la fuente de la que fueron tomados.

Estudios similares han evaluado la variación en otros entomoforales con RAPD y amplificación de ITS<sup>22,23</sup>. Así como nuestros

resultados muestran una clara distancia genética entre aislamientos provenientes de diferentes fuentes, Fargues et al.<sup>9</sup> y Morton et al.<sup>24</sup> reportaron la relación entre la variación genética y el hospedero.

Existen estudios del complejo *Fusarium*, que aunque no es entomoforral, comparte con *C. coronatus* la característica de infectar una amplia gama de hospederos, incluido el humano. Zhang et al.<sup>25</sup> buscaron variación intraespecífica sin éxito en 471 aislamientos tomados de humanos, suelo, animales, aire de hospitales y plantas. La razón de ello es que *Fusarium* es un hongo multihospedero<sup>26</sup>, lo que implica que un mismo aislamiento puede infectar un gran número de organismos de diversos phyla.

Cada microorganismo tiene un conjunto de características que funcionan como factores de virulencia en sus hospederos; sin embargo, se desconoce hasta qué punto condicionan los mecanismos de infección en diferentes grupos de hospederos. Una causa de ello es la ausencia de modelos que permitan analizar la virulencia entre grupos infectados<sup>27</sup>. Tomando en cuenta las diversas fuentes en las que se ha encontrado a *C. coronatus* y nuestros resultados que muestran claramente la variación intraespecífica entre aislamientos, consideramos que *C. coronatus* podría servir como modelo para evaluar mecanismos de virulencia que lo hacen específico para cada uno de los grupos de organismos a los que ataca.

Aun cuando nuestros resultados muestran una clara diferencia a nivel molecular entre aislamientos de *C. coronatus* provenientes de humanos y otras fuentes, en este trabajo no se presentan resultados morfológicos o fisiológicos de los aislamientos para comprobar si las diferencias genéticas se traducen en diferencias fenotípicas; sin embargo, existen observaciones propias (solo con algunos aislamientos) y de otros autores que nos ayudan a inferirlo, además de plantear la posibilidad de que exista algún aislamiento que no sea patógeno de humanos. Hall et al.<sup>28</sup> consideran que la capacidad de desarrollarse a 37 °C es un criterio para evaluar el potencial de los hongos como patógenos de humanos; Mier et al.<sup>29</sup> trabajaron en una cepa proveniente de humano y se desarrolló a 37 °C, mientras que Papierok et al.<sup>2</sup> estudiaron 10 cepas, de las cuales solo una de origen humano y una aislada del miriápodo *Hansenella unguiculata* crecieron a 37 °C; el resto provenía de insectos de diversos órdenes. En nuestro caso, se observó el efecto de la temperatura sobre los aislamientos Lyco 1, 4 y 5, encontrando que no hubo desarrollo a 37 °C (datos no presentados). Además, observamos que el aislamiento ATCC 32865 (tomado de humano) tardó casi 4 días más en llenar una caja Petri de 85 mm de diámetro con respecto a los obtenidos de insectos (datos no presentados) y tenía una apariencia algodonosa, de poca rugosidad y tonalidades grisáceas,

características que no se presentaron en los demás aislamientos evaluados. Estas características también sustentan las diferencias entre el aislamiento de humanos y el resto, lo que podría atribuirse a la fuente de la que se obtuvo y sugiere que esta puede ser un factor que genera distancias genéticas. Los resultados de López-Martínez et al.<sup>30</sup> también sugieren la variación intraespecífica y que no todos los aislamientos son patógenos de mamíferos; realizaron pruebas en ratones, hámsters y cobayos con una cepa de *C. coronatus* tomada de *Aenolamia postica* y aunque hubo una invasión inicial en todos los animales, desapareció 15 días después de la inoculación, lo que indica que el hongo no fue capaz de establecerse e infectarlos. Lo anterior pone de manifiesto la ausencia de patogenicidad de esta cepa en particular en mamíferos.

De esta manera, nuestros resultados sobre la distancia genética con ITS y RAPD entre el aislamiento ATCC 32865 (de humano) y los tomados de insectos, junto con las características fisiológicas y morfológicas de los aislamientos *Lycos* descritas anteriormente, sugieren que estos no son patógenos para el humano; esta podría ser la razón por la que, pese a que los trabajadores están en contacto con el hongo, no hay reportes de daño en humanos por *C. coronatus* en plantas productoras de champiñón.

Nuestros resultados no son concluyentes para sugerir el uso de *C. coronatus* en el control biológico de insectos; hace falta investigación para determinarlo, como ocurrió con la cepa 251 del hongo *Purpureocillium lilacinus* que es usada actualmente para el control biológico de nematodos, aun cuando el hongo está reportado como patógeno de humanos y animales. Esta cepa es la única que no produce la paecilotoxina, que es el agente causal de daño en humanos<sup>31</sup>. Cabe mencionar que para *C. coronatus* ya se identificó el metabolito coronatin-1 en larvas de *Galleria mellonella* y, aunque hace falta determinar su modo de acción, sería interesante investigar si este metabolito es capaz de causar alteraciones en humanos<sup>4</sup>.

El tamaño de la muestra y el número de hospederos/sustratos de este trabajo fueron limitados, lo que podría haber afectado el análisis de la diversidad genética y el número de ramas que se formaron en los árboles filogenéticos. Se recomienda realizar pruebas con un mayor número de aislamientos e incluir estudios de morfología y fisiología. A pesar de esas limitaciones, nuestros resultados con las técnicas RAPD e ITS proporcionan información sobre la diversidad intraespecífica de *C. coronatus* relacionada con el hospedero/sustrato.

## Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Ing. Iobana Alanís-Martínez, al Dr. Ariel Guzmán-Franco sus valiosas aportaciones. Al Dr. Arthur A. Callaghan, el envío de los aislamientos STAFFS 4:004, STAFFS 15:008, STAFFS 10:027, STAFFS 1:037, STAFFS 04:427, así como al Dr. Richard A. Humber el envío de los aislamientos ARSEF 512 y ARSEF 1884.

## Bibliografía

1. Sajap AS, Atim AB, Husin H, Wahab YA. Isolation of *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes: Entomophthorales) from soil and its effects on *Coptotermes curvignatus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiol. 1997;30:257-62.
2. Papierok B, Rafanomezantsoa-Randriambololona BN, Ziat N. Nouvelles données sur l'écologie et le comportement entomopathogène expérimental de l'entomophthorale *Conidiobolus coronatus* (Zygomycètes). Entomophaga. 1993;38:299-312.
3. Valle AC, Wanke B, Lazéra MS, Monteiro PC, Viegas ML. Entomophthoromycosis by *Conidiobolus coronatus* report of a case successfully treated with combination of itraconazole and fluconazole. Inst Med Trop São Paulo. 2001;43:233-6.
4. Wieloch W, Sacharczuk M, Bogus MI, Jaszczak K. A study for minisatellite markers of *Conidiobolus coronatus* pathogenicity to *Galleria mellonella* larvae. J Invertebr Pathol. 2004;85:63-9.
5. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. Clin Microbiol Rev. 2000;13:236-301.
6. O'Connor L, Keil CB. Mushroom host influence on *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) life cycle. J Econ Entomol. 2005;98:342-9.
7. Vedder PJC. Cultivo moderno del champiñón. 4.<sup>a</sup> reimpresión Madrid, España: Mundi Prensa; 1996.
8. Karp A, Seberg O, Buiatti M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. Ann Bot. 1996;78:143-9.
9. Fargues J, Bon MC, Manguin S, Couteaudier Y. Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on the rDNA-ITS regions. Mycol Res. 2002;106:1066-74.
10. Ho SY, Chen F. Genetic characterization of *Mortierella alpina* by sequencing the 18S-28S ribosomal gene internal transcribed spacer region. Lett Appl Microbiol. 2008;47:250-5.
11. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. Evol Bioinform. 2008;4:193-201.
12. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS. 2012;109:6241-6.
13. Thakur R, Sandhu SS. Species confirmation of fungal isolates by molecular analysis. Indian J Microbiol. 2010;50:280-91.
14. Papierok B, Hajek AE. Fungi: Entomophthorales In: Manual of techniques in insect pathology. Biological Techniques. San Diego, EE. UU.: Academic Press; 1997. p. 178-212.
15. Guzmán-Franco AW, Atkins SD, Alderson PG, Pell JK. Development of species-specific diagnostic primers for *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*; two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Mycol Res. 2008;112:1227-40.
16. Ahrens U, Seemüller E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S RNA gene. Phytopathol. 1992;82:828-32.
17. Ayala-Escobar V, Yáñez-Morales MJ. *Cercospora agavicola*-a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. azul from Mexico. Mycetaxon. 2005;93:115-21.
18. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editores. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Nueva York, EE. UU.: Academic Press; 1990. p. 315-22.
19. Farooq S, Azam F. Molecular markers in plant breeding-I: concepts and characterization. Pak J Biol Sci. 2002;5:1135-40.
20. Hsiang T, Wu C. Genetic relationships of pathogenic *Typhula* species assessed by RAPD, ITS-RFLP and ITS sequencing. Mycol Res. 2000;104:16-22.
21. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev. 2000;13:332-70.
22. Nielsen C, Sommer C, Eilenberg J, Hansen K, Humber RA. Characterization of aphid pathogenic species in the genus *Pandora* by PCR techniques and digital image analysis. Mycol. 2001;93:864-74.
23. Sierotzki H, Camastral F, Shah PA, Aebi M, Tuor U. Biological characteristics of selected *Erynia neopaphidis* isolates. Mycol Res. 2000;104:213-9.
24. Morton CO, Mauchline TH, Kerry BR, Hirsh PR. PCR-based DNA fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. Mycol Res. 2003;107:198-205.
25. Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. J Clin Microbiol. 2006;44:2186-90.
26. Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MIG, Mayayo E, et al. *Fusarium oxysporum* as multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. Infect Immun. 2004;72:1760-6.
27. Casadevall A. Cards of virulence and the global virulome for humans. Microbe. 2006;1:359-64.
28. Hall RA, Zimmermann G, Vey A. Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides. Entomophaga. 1982;27:121-7.
29. Mier T, Toriello C, Casamitjana M, García-Maynez AM, López-Martínez R. Efecto de diferentes factores físicos y nutricionales sobre el crecimiento de dos cepas de *Conidiobolus coronatus*. Bol Soc Mex Mic. 1980;14:69-79.
30. López-Martínez R, Toriello C, Mier T, Ximénez-García C, Martínez A, Fernández-Díez J. Estudio de la patogenicidad de *Conidiobolus coronatus* en animales de experimentación. Mycopathol. 1978;66:59-65.
31. Khan A, Williams K, Nevalainen H. Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. FEMS Microbiology Letters. 2003;227:107-11.