Scientia Fungorum vol. **47**: 73-77 **2018**

Reporte del estado sexual de *Lecanicillium longisporum* en *Melanaphis sacchari*

Report of the sexual stage of *Lecanicillium longisporum* in *Melanaphis sacchari*

Angélica María Berlanga-Padilla, Miguel Ángel Ayala-Zermeño, Adrien Gallou, María Guadalupe Serna-Domínguez, Roberto Montesinos-Matías, Hugo César Arredondo-Bernal

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, SENASICA-DGSV-CNRF. Km 1.5 Carretera Tecomán – Estación FFCC, C.P. 28110, Tecomán, Colima, México.

Miguel Ángel Ayala Zermeño, e-mail: miguelangel.ayalazermeo@yahoo.com.mx

Resumen

Antecedentes: Durante la búsqueda de enemigos naturales de *Melanaphis sacchari* en Tecomán, Colima, México, se observaron poblaciones micosadas de pulgón amarillo en sorgo; tres meses después se encontraron estructuras fúngicas de reproducción sexual desarrollándose en la región dorsal abdominal de algunos pulgones.

Objetivo: Dar a conocer por primera vez el estado teleomorfo de *Lecanicillium longisporum*, desarrollado sobre *M. sacchari* en Colima, México.

Métodos: Se utilizaron técnicas de microscopía para el análisis morfológico de los peritecios encontrados sobre *M. sacchari*. Para la caracterización molecular se utilizó la región ITS y el gen RPB1.

Resultados y conclusiones: Los peritecios encontrados en los pulgones momificados con *L. longisporum* son morfológicamente diferentes a *Cordyceps confragosa* y otras especies reportadas como teleomorfos de *Lecanicillium*. Las secuencias ITS y RPB1 mostraron 100% de similitud con las secuencias del anamorfo CHE-CNRCB 620 (ITS: KX426564; RPB1: KX426566) de *L. longisporum*. La identificación molecular confirmó que los peritecios corresponden al teleomorfo de la misma especie, siendo el primer reporte del estado sexual de *L. longisporum*.

Palabras clave: teleomorfo, anamorfo, peritecios, pulgón amarillo, Colima, México

Abstract

Background: During the search for natural enemies of *Melanaphis sacchari* in Tecoman, Colima, Mexico, mycosed populations of yellow aphid in sorghum were observed; three months later, fungal structures of sexual reproduction were found developing in the abdominal dorsal region of some aphids.

Objective: To make known for the first time the teleomorphic state of *Lecanicillium longisporum* developed on *M. sacchari* in Colima, Mexico.

Methods: Microscopy techniques were used for the morphological analysis of the perithecia found on *M. sacchari*. ITS region and the RPB1 gene were used for molecular characterization.

Results and conclusions: Perithecia found in mummified aphids with *L. longisporum* are morphologically different from *Cordyceps confragosa* and other species reported as *Lecanicillium* teleomorphs. ITS and RPB1 sequences showed 100% similarity to the sequences of the anamorph CHE-CNRCB 620 (ITS: KX426564; RPB1: KX426566) of *L. longisporum*. The molecular identification confirmed that the perithecia correspond to the teleomorph of the same species being the first report of the sexual stage of *L. longisporum*.

Keywords: teleomorph, anamorph, perithecia, yellow aphid, Colima, Mexico

Recibido / Received: **08/02/2018**
Aceptado / Accepted: **24/04/2018**

Los Ascomicetos pueden reproducirse asexualmente (anamorfo) o sexualmente (teleomorfo), fases diferenciadas que se presentan generalmente desfasadas una de la otra; no obstante, ocasionalmente y bajo ciertas condiciones, el holomorfo es observado de manera conjunta (Vega *et al*., 2012). Los factores extrínsecos al organismo necesarios para promover la formación de uno u otro estado son específicos, y dependen principalmente de las características del nicho ecológico que ocupa el hongo, en cuanto a nutrientes, luz, temperatura, aireación, pH y presencia de huéspedes (Pöggeler *et al*., 2006).

En el caso del género *Lecanicillium,* los teleomorfos conocidos son: *Cordyceps confragosa* (Mains) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Zimm.) para *L. lecanii,* por su parte *C. militaris* (L.: Fr.) Fr., *C. pseudomilitaris* Hywel-Jones & Sivichai, *C. khaoyaiensis* Hywel-Jones (Sung *et al*., 2007; Kepler *et al*., 2012; Shrestha *et al*., 2017) y *Cordyceps piperis* (J.F. Bisch. & J.F. White) D. Johnson, G.H. Sung, J.F. Bisch. & Spatafora, (≡ *Torrubiella piperis* J.F. Bischoff & J.F. White) (Bischoff y White, 2004; Johnson *et al*., 2009) han sido asociados con el grupo *Lecanicillium*. La especie *Lecanicillium longisporum* fue descrita en 2001 por Zare y Gams, la fase asexual del hongo presenta fiálides verticiladas con dimensiones de 32.46 ± 6.21 (21.6 – 47.19) × 1.90 ± 0.33 (1.32 – 2.72) µm (n = 30), los conidios en el ápice de la fiálides forman cabezas globosas, de forma elipsoidal a oval-oblonga de 7.05 ± 1.22 (5.62 – 12.18) × 2.45 ± 0.51 (1.63 – 3.56) µm (n = 30) (Berlanga-Padilla *et al*., 2016). Los hongos obtenidos se han encontrado en áfidos y cóccidos, cuya distribución geográfica incluye países como Reino Unido, Sri Lanka y Perú (Zare y Gams, 2001). A la fecha no existe información relacionada con el estado sexual de esta especie.

Durante la búsqueda de enemigos naturales de *Melanaphis sacchari* Zehntner en sorgo, se reportó la presencia de poblaciones de pulgón amarillo infectados con *L. longisporum* (Berlanga-Padilla *et al*., 2016). En el trimestre posterior a estas exploraciones en esa misma zona se encontraron pulgones con protuberancias que exhibieron una morfología similar a peritecios desarrollándose en la superficie de la región dorsal abdominal de algunos insectos. El objetivo de la presente investigación es dar a conocer por primera vez el estado teleomorfo de *L. longisporum,* desarrollado sobre *M. sacchari* en Colima, México.

El material se recolectó en la comunidad de Tecuanillo, Tecomán, Colima (18.85775° LN y 103.88159° LO, a 85 msnm), en abril de 2016, donde previamente se habían encontrado altas poblaciones del pulgón amarillo infectados con el estado anamorfo de *L. longisporum* (Berlanga-Padilla *et al*., 2016), en algunos de los insectos se desarrollaron peritecios sobre el dorso del abdomen (Figura 1A). Los peritecios fueron retirados del insecto con un micro-manipulador y se almacenaron en viales con alcohol al 70%. Las muestras del insecto con las estructuras sexuales se depositaron con el acrónimo CHE-CNRCB 620/T1 en la Colección de Hongos Entomopatógenos (CHE) del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), en Tecomán, Colima, México.

Se prepararon laminillas de estructuras sexuales y asexuales presentes en el insecto, con lactofenol/azul de algodón (10:1) y se examinaron con un microscopio óptico Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Microscopy GmbH, Gottingen, Germany), con los objetivos 20, 40 y 100 x. Para fotografiar las estructuras se utilizó una cámara digital modelo AxioCam ICc 1 (Carl Zeiss), utilizando el software AxionVision 4.9.1 (03 - 2013).

La caracterización molecular se realizó a partir de peritecios encontrados en campo sobre individuos momificados de *M. sacchari.* Se utilizaron alrededor de 20 cuerpos fructíferos que previamente fueron limpiados con un micro-manipulador retirando las hifas adyacentes, posteriormente se extrajeron las ascas y sus ascosporas en un reloj de vidrio con 20 µL de agua destilada estéril grado de biología molecular. A partir de esta muestra se realizó directamente la amplificación de la región ITS (ITS5/ITS4) (White *et al*., 1990) y RPB1 (CRPB1A/RPB1CR) (Castlebury *et al*., 2004) con el kit Phire™ Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific™, California, EU) acorde al método de dilución y almacenamiento para tejidos animales especificado en el protocolo del fabricante. La purificación de los amplicones se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, Madison, EU) y los amplicones fueron enviados a secuenciación con los primers sentido y antisentido a Macrogen (Seúl, Corea del Sur). La edición y ensamble de las secuencias se realizó en el programa BioEdit 7.2.0. (Hall, 1999). Las secuencias se compararon por el 'Basic Logic Alignment Tool' (BLAST) en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

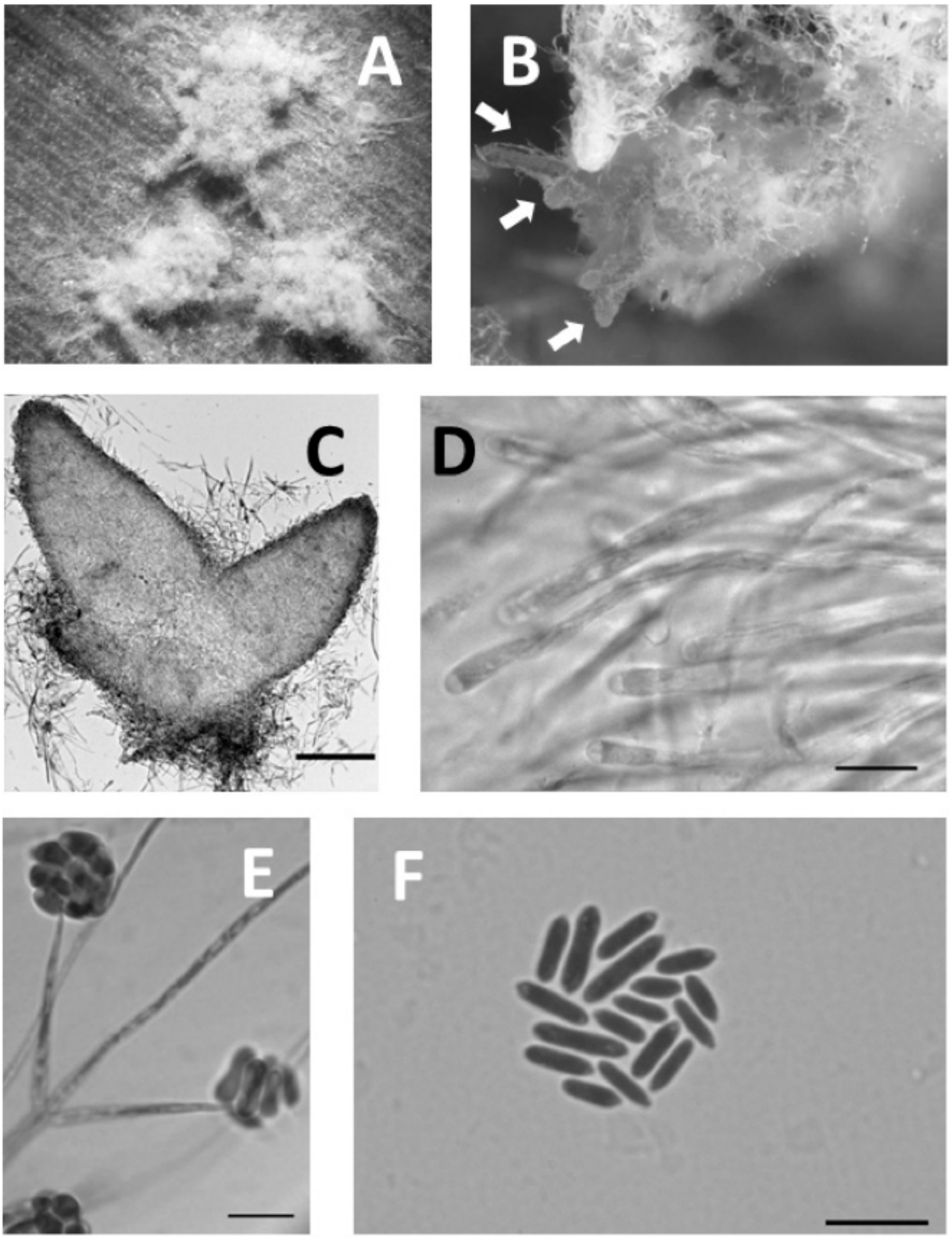

Figura 1. *Lecanicillium longisporum*. A: micelio en la superficie de adulto de *Melanaphis sacchari*. B: peritecios subinmersos creciendo sobre el abdomen de *M. sacchari* (flechas). C: micrografía de peritecios. D: ascas unitunicadas e inoperculadas. E: verticilos y conidióforos con cabezuelas de conidios. F: conidios. C = 100 µm, D, E, F = 10 µm.

Los alineamientos múltiples se efectuaron con el algoritmo MAFFT (Katoh *et al*., 2002).

Los peritecios de *L. longisporum* carecen de estromas, subinmersos en el micelio que cubre a los insectos, piriformes, ostiolados, con pigmentación amarillo claro (Figura 1B), de hasta 352 × 158 µm (Figura 1C). Ascas unitunicadas de hasta 136 × 3.43 µm con un poro inoperculado (Figura 1D); ascosporas filiformes claras.

Al comparar con los telemorfos hasta ahora conocidos para *Lecanicillium*, es evidente con base en nuestras observaciones que la forma sexual de *L. longisporum* no forma peritecios estromáticos, diferenciándose de *C. militaris* (Gedminas *et al*., 2015), *C. pseudomilitaris, C. khaoyaiensis* (Hywel-Jones, 1994) y *C. piperis* (Johnson *et al*., 2009). Las estructuras morfológicas del teleomorfo de *L. longisporum* son similares a *C. confragosa* (≡ *Torrubiella confragosa*), ya que ambas carecen de un verdadero estroma produciendo los peritecios libres y ascosporas filiformes, no obstante la fase sexual aquí descrita, muestra mayores dimensiones que los peritecios de *C. confragosa*, cuyas estructuras asexuales presentan fiálides de 15-35 x 1 – 2 µm y conidios de 2.5 – 4.5 x 1.2 – 1.8 µm (Evans y Samson 1982; Sung *et al*., 2007) y difieren por ser menores a las observadas en *L. longisporum* (Figuras 1E y 1F). Las secuencias ITS (MF443867) y RPB1 (MF443868) obtenidas a partir de las ascosporas mostraron 100% de similitud con las secuencias del anamorfo CHE-CNRCB 620 (ITS: KX426564; RPB1: KX426566) de *Lecanicillium longisporum* (Berlanga-Padilla *et al*., 2016) confirmando que los peritecios corresponden al estado sexual de la misma especie.

El nombre del anamorfo de *L. longisporum* se conserva para la fase sexual, lo anterior de acuerdo al artículo 59 del Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas, donde se mencionan modificaciones importantes en la taxonomía de los hongos pleomórficos. Las reformas admiten un solo nombre para cualquier hongo pleomórfico, independientemente de la etapa del ciclo de vida. La nueva regla es reconocida como «un hongo = un nombre», o por sus siglas en inglés «1F = 1N» ("one Fungus = one Name") (McNeill *et al*., 2012).

En algunos Ascomicetes se ha observado que el desarrollo sexual puede tener beneficios potenciales, la formación de cuerpos fructíferos de paredes gruesas resistentes a condiciones ambientales desfavorables les permiten persistir hasta que se presenten condiciones óptimas para su desarrollo. Si consideramos los principios básicos de la reproducción sexual, esta sirve para limpiar el genoma de mutaciones deletéreas y producir progenie recombinante mejor adaptada (Pöggeler *et al*., 2006). Lo anterior puede favorecer la persistencia de organismos con mejores aptitudes en el control de plagas. Se describe por primera vez la caracterización morfológica y molecular del teleomorfo de *L. longisporum* en los restos momificados de individuos de *M. sacchari*.

Agradecimientos

Los autores agradecen la valiosa revisión de este manuscrito a la Dra. Margarita H. Villegas Ríos, profesora de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Dr. Richard Humber "Insect Mycologist and Curator" de la "ARSEF Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures", por sus acertados comentarios y recomendaciones para realizar este trabajo.

Literatura citada

Bischoff, J.F., J.F. White Jr., 2004. *Torrubiella piperis* sp. nov. (Clavicipitaceae, Hypocreales), a new teleomorph of the *Lecanicillium* complex. Studies in Mycology 50: 89-94.

Berlanga-Padilla, A.M., M.Á. Ayala-Zermeño, A. Gallou, M.G. Serna-Domínguez, R. Montesinos-Matías, H.C. Arredondo-Bernal, 2016. Identificación de *Lecanicillium longisporum* asociado a *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae), en sorgo. Revista Mexicana de Micología 41: 51-54.

Castlebury, L.A., A.Y. Rossman, G.-H. Sung, A.S. Hyten, J.W. Spatafora, 2004. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. Mycological Research 108: 864-872.

Evans, H.C., R.A. Samson, 1982. Entomogenous fungi from Galápagos Islands. Canadian Journal of Botany 60: 2325-2333.

Gedminas, A., J. Lynikienė, A. Povilaitienė, 2015. Entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris*: Distribution in South Lithuania, *in vitro* cultivation and pathogenicity tests. Baltic Forestry 21: 359-368.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Hywel-Jones, N.L., 1994. *Cordyceps khaoyaiensis* and *C. pseudomilitaris*, two new pathogens of lepidopteran larvae from Thailand. Mycological Research 98: 939-942.

McNeill, J., F.R. Barrie, W.R. Buck, V. Demoulin, W. Greuter, D.L. Hawksworth, P.S. Herendeen, S. Knapp, K. Marhold, J. Prado, W.F. Prud'Homme Van Reine, G.F. Smith, J.H. Wiersema, N.J. Turland (eds.), 2012. International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne code). Regnum Vegetabile 154. Koeltz Botanical Books, Oberreifenberg, Germany.

Johnson, D., G.-H. Sung, N.L. Hywel-Jones, J.J. Luangsa-ard, J.F. Bischoff, R.M. Kepler, J.W. Spatafora, 2009. Systematics and evolu-

tion of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota). Mycological Research 113: 279-289.

Katoh, K., K. Misawa, K. Kuma, T. Miyata, 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Research 30: 3059-3066.

Kepler, R.M., G.-H. Sung, S. Ban, A. Nakagiri, M.-J. Chen, B. Huang, Z. Li, J.W. Spatafora, 2012. New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps*. Mycologia 104: 182-197.

Pöggeler, S., M. Nowrousian, U. Kück, 2006. Fruiting-body development in Ascomycetes. En: Kües, U., F. Fischer (eds.), The Mycota I. Growth, Differentation and Sexuality. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. Pp. 325-355.

Sung, G.-H., N.L. Hywel-Jones, J.-M. Sung, J.J. Luangsa-ard, B. Shrestha, J.W. Spatafora, 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology 57: 5-59.

Shrestha, B., G.-H. Sung, J.-M. Sung, 2017. Current nomenclatural changes in *Cordyceps sensu lato* and its multidisciplinary impacts. Mycology 8: 293-302.

Vega, F.E., N.V. Meyling, J.J. Luangsa-ard, M. Blackwell, 2012. Fungal entomopathogens. En: Vega, F.E., H.K. Kaya (eds.), Insect Pathology. Elsevier Inc., San Diego. Pp. 171-220.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, J.W. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press Inc., New York. Pp. 315-322.

Zare, R., W. Gams, 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedwigia 73: l-50.