

Presencia natural de *Metarhizium* en suelos agrícolas de aguacate (*Persea americana* Mill.) en Colima, México

Natural occurrence of *Metarhizium* in agricultural avocado soils (*Persea americana* Mill.) in Colima, Mexico

José C. Rodríguez-Rodríguez¹; Miguel A. Ayala-Zermeño²; Cecilia Neri-Luna¹; Beatriz Rodríguez-Vélez²; Adrien Gallou³; José P. Castruita-Domínguez^{1, *}

1 Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco. México.

2 Departamento de Control Biológico, CNRF-DGSV, Tecomán, Colima, México.

3 Departamento de Biociencias y Agrotecnología, Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coahuila, México.

*Autor correspondiente: jose.castruita@academicos.udg.mx (J. P. Castruita-Domínguez).

J. C. Rodríguez-Rodríguez  <https://orcid.org/0000-0001-5941-2905> M. A. Ayala-Zermeño  <https://orcid.org/0000-0003-0172-7124>

C. Neri-Luna  <https://orcid.org/0000-0002-8941-2305> B. Rodríguez-Vélez  <https://orcid.org/0000-0003-1950-3487>

A. Gallou  <https://orcid.org/0000-0002-0004-5052> J. P. Castruita-Domínguez  <https://orcid.org/0000-0002-7350-2314>

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) se ha convertido en uno de los frutos más importantes en el mundo, donde México es el principal productor y exportador a nivel mundial, esto ha provocado un acelerado crecimiento en el establecimiento de plantaciones de monocultivo de aguacate, favoreciendo el incremento de plagas de insectos y ácaros, lo que ha dirigido la búsqueda de estrategias de control biológico para un manejo integrado de plagas. El objetivo de este estudio fue aislar hongos entomopatógenos del suelo, e identificar mediante el factor de elongación de la traducción 1- α (5'TEF), las especies presentes en un huerto convencional de aguacate. Durante el muestreo se obtuvo un total de 34 aislados, pertenecientes al género *Metarhizium*, 23 aislados identificados como *Metarhizium robertsii* y 11 como *Metarhizium guizhouense*. Estos resultados muestran la escasa diversidad de especies de hongos entomopatógenos asociados a la rizosfera del cultivo del aguacate, y sugieren que, su presencia podría estar asociada a su capacidad para resistir las prácticas agronómicas, las cuales inducen su actividad endófito. Es necesario comprender el papel que desempeña *Metarhizium* en la rizosfera, esto permitirá desarrollar programas de control biológico específicos para cada cultivo, y así garantizar su éxito en el control de plagas.

Palabras clave: Aguacate; identificación molecular; hongo entomopatógeno; control biológico; *Metarhizium robertsii*; *Metarhizium guizhouense*.

ABSTRACT

Avocado (*Persea americana* Mill.) has become one of the most important fruits in the world, being Mexico the main producer and exporter worldwide, it has led to an accelerated growth in the establishment of monoculture avocado plantations, promoting the increase of insect and mite pests, which has led to the need for biological control strategies for integrated pest management. The objective of this study was to isolate entomopathogenic fungi from the soil of a conventional avocado orchard and identify them by translation elongation factor 1- α (5'TEF). During the sampling, a total of 34 isolates were obtained, belonging to the genus *Metarhizium*, 23 isolates identified as *Metarhizium robertsii* and 11 as *Metarhizium guizhouense*. These results show the low diversity of entomopathogenic fungi species associated with the rhizosphere of the avocado crop and suggest that their occurrence could be associated with their ability to survive agronomic practices that induce their endophytic activity. It is necessary to understand the role of *Metarhizium* in the rhizosphere, this will allow the development of biological control programs specific for each crop, and thus guarantee its success in pest control.

Keywords: Avocado; molecular identification; entomopathogenic fungi; biological control; *Metarhizium robertsii*; *Metarhizium guizhouense*.

Recibido: 13-01-2023.

Aceptado: 26-03-2023.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un fruto tropical originario de Mesoamérica (Galindo-Tovar et al., 2008), reconocido por sus beneficios a la salud humana, debido a su composición nutricional, ya que cuenta con un alto porcentaje de fibra dietética, potasio, sodio y magnesio, además de vitaminas A, C, E, K1, B-6, ácido fólico, ácidos grasos insaturados, además de ser uno de los frutos con la menor cantidad de carbohidratos (Dreher & Davenport, 2013). A nivel mundial, México se ha convertido en el principal productor y exportador de aguacate (Araújo et al., 2018). No obstante, el acelerado crecimiento en el establecimiento de plantaciones de monocultivo de aguacate ha llevado a un proceso de conversión de bosques naturales en agroecosistemas (Barsimantov & Navia, 2012), favoreciendo el incremento de plagas en este cultivo (Wysoki et al., 2002). Asimismo, el desarrollo de resistencia a los insecticidas sintéticos, como los efectos dañinos de éstos al ambiente y a la salud humana, ha fomentado la investigación y el desarrollo de estrategias de control biológico para un manejo integrado de plagas (MIP) (Arthurs & Dara, 2018).

Dentro de las múltiples alternativas de control biológico que se han propuesto, el aislamiento de hongos entomopatógenos (HE) y su posterior selección, es fundamental para el desarrollo de micoinsecticidas (Thakur & Sandhu, 2010). Entre las especies de HE más estudiadas y con distribución cosmopolita, destacan *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin del orden Hypocreales (Ascomycota), ambos enemigos naturales de un amplio espectro de insectos y arañas (Roberts & St. Leger, 2004).

Uno de los hábitats donde se ha reportado la presencia de HE es el suelo (Pérez-González et al., 2014; Garrido-Jurado et al., 2015; Uzman et al., 2019), este ambiente natural sirve de resguardo para las esporas de los HE, las cuales encuentran protección contra factores bióticos y abióticos (Baydar et al., 2016), algunas especies de HE como *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Isaria fumosorosea* Wize han sido ampliamente detectadas en suelos agrícolas (Meyling & Eilenberg, 2006), forestales

(Thakur & Sandhu, 2010) y áreas no perturbadas (Botelho et al., 2019). Para aislar a estos hongos del suelo, la estrategia más efectiva es el método del "insecto trampa", en el cual se utilizan larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* L., 1756, o pupas del coleóptero *Tenebrio molitor* L., 1758 (Goble et al., 2010).

El incremento de materia orgánica en suelos de hábitats naturales favorece la diversidad y densidad de insectos que pueden ser huéspedes para los HE, lo cual ayuda en su multiplicación (Gebremariam et al., 2021), contrario a lo que ocurre con los agroecosistemas, donde las comunidades de insectos se ven reducidas por el uso de insecticidas y fertilizantes sintéticos y por consiguiente, la presencia y diversidad de HE (Goble et al., 2010; Uzman et al., 2019). Estas prácticas agrícolas convencionales limitan la aparición de múltiples especies de *Metarhizium* (Steinwender et al., 2014, Clifton et al., 2015), donde *M. anisopliae* suele ser el más persistente bajo estas condiciones (Uzman et al., 2019).

El conocer los factores responsables de la persistencia de algunas especies de HE en el ambiente, es un aspecto importante a considerar para el desarrollo de estrategias en programas de control biológico de conservación (Steinwender et al., 2014), ya que se requieren aislados tolerantes a varios factores abióticos (principalmente radiación UV, temperatura y humedad relativa), para su uso como agentes microbianos de control biológico de plagas agrícolas (Imoulan et al., 2011), por lo tanto, se considera que el aislamiento de HE endémicos, para su posterior aplicación como estrategia de control biológico en el ambiente donde fueron obtenidas, puede redituarse en una mayor eficacia y persistencia, así como en la reducción en los costos de aplicación (Goble et al., 2010; Fisher et al., 2011; Uzman et al., 2019).

El objetivo del presente estudio fue aislar HE mediante la técnica de insecto-trampa a partir de muestras de suelo de un huerto convencional de aguacate en Colima, México, así como identificar a nivel molecular la diversidad de especies presentes durante un ciclo anual.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio y recolección de muestras de suelo

Los muestreos fueron realizados en un huerto de aguacate (*Persea americana* var. Hass) de ocho años de edad, en las coordenadas 19°24.828'N y 103°36.991' W a 1552 msnm, en la localidad de Montitlán, municipio de Cuauhtémoc, en el norte del estado de Colima, México. La recolecta de suelo se realizó mensualmente de julio 2016 a junio 2017, donde se tomaron tres muestras de suelo de 500 g cada una. Las muestras se almacenaron y transportaron en una hielera para su posterior análisis en el Laboratorio de la Colección de Hongos Entomopatógenos (CHE) del Departamento de Control Biológico, en Tecomán, Colima, México.

Aislamiento de hongos entomopatógenos

Los HE fueron aislados del suelo mediante el método de insecto trampa utilizando larvas de *G. mellonella* (Zimmerman, 1986). Las larvas fueron sometidas a un tratamiento para reducir su producción de cera, evitando que entren en estado de pupa durante el periodo de contacto con las muestras de suelo, sumergiéndolas en agua a 56 °C entre 10-15 s, después, se colocaron en agua a 25 ± 2 °C durante 10 s. Posteriormente se pusieron en papel absorbente para retirar el exceso de humedad y se colocaron en una caja de plástico con tapa, donde se sometieron a un periodo de obscuridad de 5 h antes de ser empleadas en los ensayos (Meyling, 2007). Al mismo tiempo, se

tomaron 300 g de suelo de las muestras previamente colectadas en campo y se colocaron en un recipiente de plástico de 500 mL, cuando el suelo mostró un bajo porcentaje de humedad, se le agregó agua destilada estéril, evitando la saturación. A continuación, se transfirieron 10 larvas sobre la superficie de cada una de las muestras. Todas las cajas fueron incubadas a una temperatura de 25 ± 2 °C con un fotoperiodo 12:12 h luz/oscuridad, durante 10 días. Las cajas con las muestras de suelo fueron revisadas diariamente y se extrajeron las larvas que mostraban micosis aparente o síntomas de infección por HE. Todas las larvas fueron enjuagadas con agua destilada estéril para remover el suelo adherido. Los HE desarrollados sobre la superficie de las larvas se aislaron con ayuda de una aguja de disección y se sembraron con la técnica de puntos, en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (Bioxon®, México) adicionado con extracto de levadura (Bioxon®, México) al 1% (SDAY) [g.l.: dextrosa 40, peptona de carne 5, peptona de caseína 5, agar 15, extracto de levadura 10], además del antibiótico cloranfenicol (500 ppm). Todos los aislados se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C durante 15 días, para posteriormente determinar su morfología macroscópica y microscópica.

Identificación de hongos entomopatógenos

A partir de los HE aislados, se observó el desarrollo macroscópico de las colonias (anverso, forma, elevación, margen y consistencia), en el reverso de la colonia se registró la coloración. Para la identificación micromorfológica se observaron las estructuras reproductivas asexuales de los HE (conidios) mediante laminillas teñidas con lactofenol/azul de algodón (10:1 v/v), utilizando un microscopio AXIO SCOPE A1 (Carl Zeiss, Alemania). Finalmente, para determinar el género y/o especie, se tomó como referencia las claves taxonómicas de Humber (2012).

Extracción de ADN

Los diferentes aislados fúngicos se crecieron en medio de cultivo SDY [g.l.: dextrosa 40, peptona de carne 5, peptona de caseína 5, extracto de levadura 10] y se incubaron a una temperatura de 25 °C en agitación (125 rpm) durante 2 días. El micelio se recuperó mediante filtración al vacío y posteriormente se sometió a un proceso de liofilización. La extracción de ADN genómico se realizó pulverizando 10 mg de micelio liofilizado con nitrógeno líquido, empleando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, EUA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación y pureza del ADN fue analizada con el espectro-

fotómetro Epoch™ Microplate (Biotek, Winooski, USA) usando el índice de absorbancia A_{260}/A_{280} . Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Identificación molecular de los hongos

Para identificar los aislados del género *Metarhizium* a nivel de especie, se utilizó la secuencia parcial de la región rica en intrones del extremo 5' del factor de elongación de la traducción 1- α (5'TEF) (Rehner & Buckley, 2005). Este locus se seleccionó debido a su alto grado de diferenciación entre especies y a la congruencia de la topología con las especies del género *Metarhizium* (Bischoff et al., 2009). La región 5'TEF (~ 800 bp) se amplificó utilizando los cebadores EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') y EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (Rehner & Buckley, 2005).

La mezcla de reacción de amplificación se preparó a un volumen final de 20 μ L con los siguientes reactivos: Phire™ reaction buffer 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), 0,2 mM de mezcla de dNTPs (Promega, Madison, EUA), 0,4 mM de cada oligonucleótido, 0,4 μ L de Phire™ Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) y 1 ng de ADN genómico.

El programa de amplificación se realizó mediante PCR "touchdown" (Don et al., 1991), bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s; seguido de 10 ciclos de 98 °C por 5 s, 66 °C (disminuyendo 1 °C por ciclo) por 5 s y 72 °C por 15 s; en seguida 30 ciclos de 98 °C por 5 s, 56 °C por 5 s y 72 °C por 15 s; y por último un ciclo de extensión final a 72 °C por 1 min. Los amplicones resultantes, se resolvieron en geles de agarosa al 1% y se visualizaron en un transiluminador de luz UV, después de teñir con 3X GelRed™ (Biotium, EUA), en el equipo Gel Doc XR+ Imaging System (BIO RAD, USA). La purificación de los productos de PCR se realizó con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, EUA). Los productos amplificados se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Análisis filogenético. Las secuencias de ADN fueron editadas y ensambladas en el programa BioEdit 7.2.0 (Hall, 1999). Posteriormente, para el análisis filogenético se utilizó el programa MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013). El alineamiento múltiple de las secuencias de ADN se realizó mediante el programa MUSCLE (Edgar, 2004) y el árbol filogenético se realizó por el método de máxima verosimilitud, basado en el modelo Kimura (1980) de 2 parámetros con valores de soporte de 1000 repeticiones de Bootstrap.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el muestreo anual se obtuvo un total de 34 aislados a partir del 9,72% de larvas utilizadas en el método de insecto-trampa; la mayor presencia de HE se presentó de julio a septiembre de 2016 con 18 aislados, mientras que se observó una

disminución de octubre (2016) a junio (2017), con un total de 16 aislados, con excepción de marzo, donde se registró un repunte en la presencia (8 aislados), y con una ausencia de HE durante los meses de abril y mayo (Tabla 1).

La identificación filogenética mediante la secuencia del 5´TEF permitió confirmar la identidad de los 34 aislados, reportados como *Metarhizium robertsii* (J.F. Bisch, Rehner & Humber) y *Metarhizium guizhouense* (Metchnikoff) Sorokin (1883). De éstos, 23 aislados se agruparon en el clado de la

especie *M. robertsii* con un valor de bootstrap de 98%, mientras que los otros 11 aislados fueron agrupados en el clado de la especie *M. guizhouense* con un valor de bootstrap de 85% (Figura 2). Las secuencias 5´TEF fueron depositadas en el GenBank (Tabla 1).

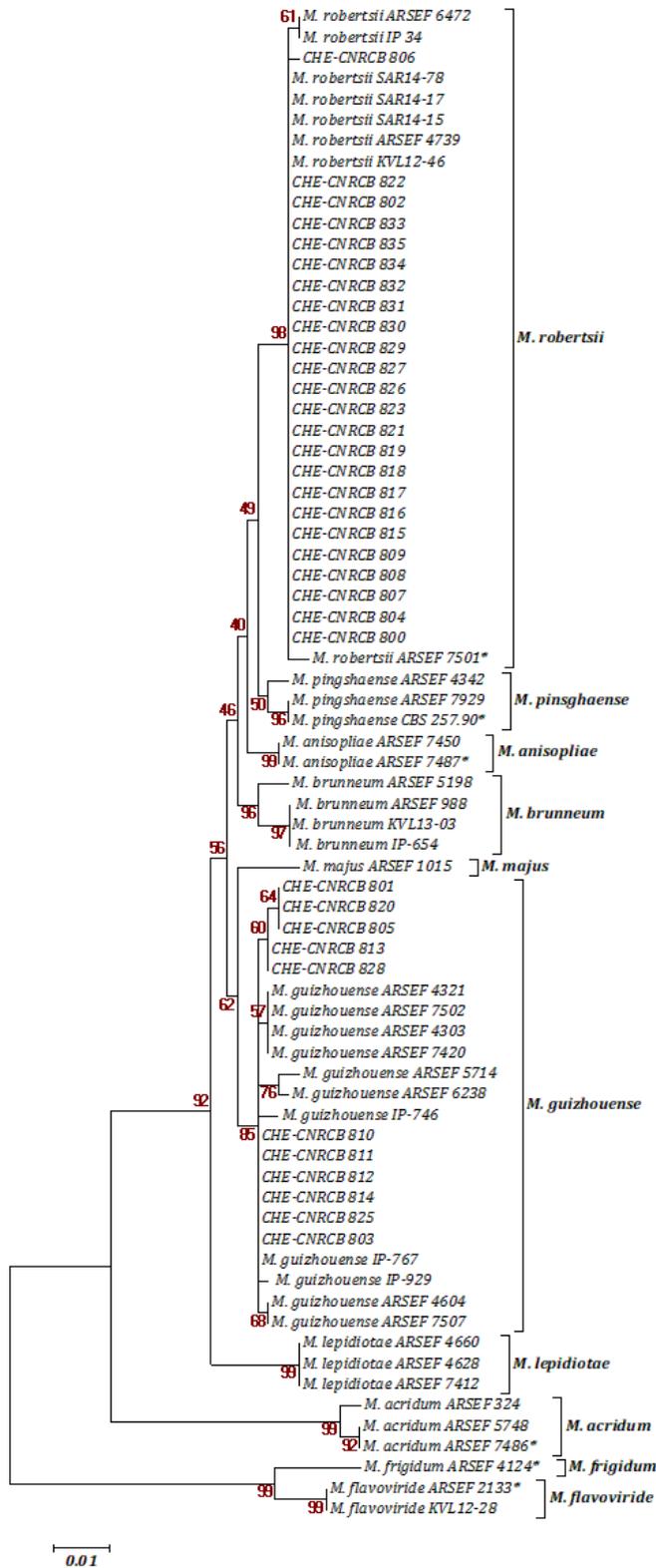


Figura 2. Árbol filogenético de *Metarhizium*, inferido mediante el método de máxima verosimilitud (ML) de la región del intrón 5´TEF (factor de elongación 1- α), basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. Utilizando los 34 aislados de HE (identificados con los acrónimos CHE-CNRCB) y 38 secuencias de referencia del GenBank, las cepas de referencia tipo se señalan con un (*). El soporte de la rama se midió a través de 1000 réplicas de bootstrap.

Este estudio es importante desde diferentes perspectivas; principalmente, para conocer las especies de HE que habitan de manera natural en un agroecosistema, aportar al conocimiento de la biodiversidad de microorganismos del suelo en un cultivo convencional de aguacate en el estado de Colima, y segundo, por la importancia económica que este grupo de organismos representa en la estrategia y desarrollo del control biológico de plagas en este cultivo. Los HE son importantes antagonistas de insectos plaga que habitan en el suelo (Uzman et al., 2019), y su presencia ha sido ampliamente estudiada en México en diversos cultivos como cítricos (Galán-Franco et al., 2011), hortalizas (Pérez-González et al., 2014), tejocote (Muñiz-Reyes et al., 2014) y maíz (Pérez-González et al., 2014).

No obstante, para el estado de Colima, este es el primer estudio realizado sobre HE asociados al suelo de cultivo del aguacate, donde se logró identificar las especies de *M. robertsii* y *M. guizhouense* mediante un análisis filogenético con el marcador altamente discriminante 5'TEF. Resultados similares, utilizando el mismo marcador molecular, fueron reportados en Suiza, donde encontraron la presencia del género *Metarhizium* en muestras de suelo de pastizales, tierra de labranza y bosques, identificando a *M. brunneum* en los tres sitios, mientras que *M. robertsii* y *M. guizhouense* solo fueron encontrados en tierra de labranza y pastizales (Fernández-Bravo et al., 2021). En Arkansas, EUA y utilizando como insecto trampa el ácaro *Amblyomma americanum* (Acarina: Ixodidae), lograron aislar e identificar molecularmente a las especies de *M. robertsii* y *M. guizhouense* (Goldsmith et al., 2021); lo que demuestra la capacidad de adaptación de estas dos especies a diferentes condiciones ambientales y hábitats.

En este estudio, la mayor abundancia de HE se presentó durante la temporada de lluvias, presentando el 64,7% de las larvas micosadas, seguramente favorecido por la humedad que se presenta en esa época del año, la cual beneficia la germinación de conidios y su propagación en el suelo (Ignoffo, 1992). Por otra parte, se ha

demostrado que el suelo es el sitio más común para el aislamiento de HE de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* (Clifton et al., 2015). En el caso del género *Beauveria*, no se registró en el área de estudio, posiblemente su ausencia se debe a que es menos común en suelos agrícolas (Barker & Barker, 1998), donde la presencia de *B. bassiana* se ve disminuida por la aplicación de plaguicidas (Muñiz-Reyes et al., 2014), confirmando que la diversidad de especies está inversamente relacionada con el grado de disturbio humano (Aung et al., 2008; Garrido-Jurado et al., 2015). Por el contrario, se ha indicado que *Metarhizium* es un género que resiste a las perturbaciones provocadas por la agricultura, además de ser el más común encontrado en suelos cultivados (Meyling & Eilenberg, 2007; Quesada-Moraga et al., 2007; Jabbour & Barbercheck, 2009; Keyser et al., 2015; Hernández-Domínguez et al., 2016; Uzman et al., 2019), esto debido a que sus conidios pueden sobrevivir por más tiempo aún sin hospederos (Vänninen, 1996), incluso, algunas especies del género *Metarhizium* pueden ser endófitas facultativas (Deaver et al., 2019), lo que les permite sobrevivir en las proximidades de las raíces de las plantas sin llegar a colonizarlas (Moonjely & Bidochka, 2019). La predominancia del género *Metarhizium* en el suelo del cultivo del aguacate, puede deberse a su capacidad para colonizar fácilmente la rizosfera de las plantas, formando asociaciones endofíticas (Behie et al., 2015), incluso, se ha reportado que especies como *M. robertsii* puede transferir nitrógeno derivado de insectos a las plantas (Botelho et al., 2019; Barelli et al., 2020).

En este estudio la abundancia de *M. robertsii* puede explicarse debido a su capacidad endófito, donde no solo tiene actividad patógena sobre insectos, también ha sido reportado como un promotor de crecimiento de raíces (Sasan & Bidochka, 2012), por lo que sugiere un mayor éxito en su capacidad de adaptación en la rizosfera del cultivo del aguacate, sugiriendo que evolutivamente las especies de *Metarhizium* han mantenido su nicho ecológico como simbioses de plantas (Moonjely & Bidochka, 2019).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos reflejan la escasa diversidad de especies de HE asociados al suelo en el cultivo del aguacate, posiblemente por el manejo convencional, que implica el uso de fungicidas, herbicida y aplicaciones de nitrógeno, lo que finalmente repercute negativamente sobre los microorganismos benéficos del suelo, es por esto,

que se deben establecer nuevos estudios sobre la presencia, taxonomía y ecología de *Metarhizium* en los agroecosistemas de México, lo cual contribuirá a comprender el papel que desempeñan en la rizosfera, permitiendo desarrollar programas de control biológico específicos para cada cultivo, y así garantizar su éxito en el control de plagas.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctorado en Ecofisiología y Recursos Genéticos (DERGE) perteneciente al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, México.

Mi agradecimiento al personal del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Colima

(CESAVECOL), particularmente al Ing. Celerino Rodríguez Arreola. A la Colección de Hongos Entomopatógenos del Departamento de Control Biológico, por las facilidades otorgadas para la realización de este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, R. G., Rodríguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E. & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51-60.
- Arthurs, S. & Dara, S. K. (2018). Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, 13-21.
- Aung, O. M., Soyong, K. & Hyde, K. D. (2008). Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai Province, Thailand. *Fungal Diversity*, 30, 15-22.
- Barelli, L., Waller, A. S., Behie, S. W. & Bidochka, M. J. (2020). Plant microbiome analysis after *Metarhizium* amendment reveals increases in abundance of plant growth-promoting organisms and maintenance of disease suppressive soil. *PLoS ONE* 15: e0231150.
- Barker, C. W. & Barker, G. M. (1998). Generalist entomopathogens as biological indicators of deforestation and agricultural land use impacts on Waikato soils. *New Zealand Journal of Ecology*, 22, 189-196.
- Barsimantov, J. & Navia, J. A. (2012). Forest cover change and land tenure change in Mexico's avocado region: Is community forestry related to reduced deforestation for high value crops? *Applied Geography*, 32, 844-853.
- Baydar, R., Güven, Ö. & Karaca, I. (2016). Occurrence of entomopathogenic fungi in agricultural soils from Isparta province in Turkey and their pathogenicity to *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26, 323-327.
- Behie, S. W., Jones, S. J. & Bidochka, M. J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13, 112-119.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101, 508-530.
- Botelho, A. B., Alves-Pereira, A., Prado, R., Zucchi, M. I. & Delalibera, I. (2019). *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. *Fungal Ecology*, 41, 289-300.
- Clifton, E. H., Jaronski, S. T., Hodgson, E. W. & Gassman, A. J. (2015). Abundance of soil-borne entomopathogenic fungi in organic and conventional fields in the midwestern USA with an emphasis on the effect of herbicides and fungicides on fungal persistence. *PLOS ONE*, 10, e0133613.
- Deaver, N. R., Hesse, C., Kuske, C. R. & Porras-Alfaro, A. (2019). Presence and Distribution of Insect-Associated and Entomopathogenic Fungi in a Temperate Pine Forest Soil: an Integrated Approach. *Fungal Biology*, 123, 864-874.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. & Mattick, J. S. (1991). Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19, 4008.
- Dreher, M. L. & Davenport, A. J. (2013). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 738-750.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792-1797.
- Fernández-Bravo, M., Gschwend, F., Mayerhofer, J., Hug, A., Widmer, F. & Enkerli, J. (2021). Land-Use Type Drives Soil Population Structures of the Entomopathogenic Fungal Genus *Metarhizium*. *Microorganisms*, 9, 1380.
- Fisher, J. J., Rehner, S. A. & Bruck, D. J. (2011). Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106, 289-295.
- Galán-Franco, L. A., Morales-Loredo, A., Álvarez-Ojeda, G., López-Arroyo, J. I., Arévalo-Niño, K., Sandoval-Coronado, C. & Quintero-Zapata, I. (2011). Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of Mexico. *Southwestern Entomologist*, 36, 443-449.
- Galindo-Tovar, M. E., Ogata-Aguilar, N. & Arzate-Fernández, A. M. (2008). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 441-450.
- Garrido-Jurado, I., Fernández-Bravo, M., Campos, C. & Quesada-Moraga, E. (2015). Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, 97-106.
- Gebremariam, A., Chekol Y. & Assefa, F. (2021). Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. *Heliyon* 7: e07091
- Goble, T. A., Dames, J. F., Hill, M. P. & Moore S. D. (2010). The effects of farming system, habitat type and bait type on the isolation of entomopathogenic fungi from citrus soils in the Eastern Cape Province, South Africa. *BioControl*, 55, 399-412.
- Goldsmith, A., Loftin, K., Steinkraus, D., Szalanski, A., Cleary, D. & Castrillo, L. (2021). Isolation of *Metarhizium guizhouense* and *Metarhizium robertsii* strains from soil-exposed *Amblyomma americanum* (Acarina: Ixodidae) from northwest Arkansas, USA. *Florida Entomologist*, 104, 205-212.
- 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.
- Hernández-Domínguez, C., Guzmán-Franco, A.W., Carrillo-Benítez, M.G., Alatorre-Rosas, R., Rodríguez-Leyva, E. & Villanueva-Jiménez, J. A. (2016). Specific diversity of *Metarhizium* isolates infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane plantations. *Neotropical Entomology*, 45, 80-87.
- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En Lacey, L. A. (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 151-186). Londres: Academic Press.
- Ignoffo, C. M. (1992). Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist*, 75, 516-525.
- Imoulan, A., Alaoui, A. & El Meziane, A. (2011). Natural occurrence of soil-borne entomopathogenic fungi in the Moroccan endemic forest of *Argania spinosa* and their pathogenicity to *Ceratitis capitata*. *World Journal of Microbiol and Biotechnology*, 27, 2619-2628.
- Jabbour, R. & Barbercheck, M. E. (2009). Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biological Control*, 51, 435-443.
- Keyser, C. A., De Fine, H. H. L., Steinwender, B. M. & Meyling, N. V. (2015). Diversity within the entomopathogenic fungal species *Metarhizium flavoviride* associated agricultural crops in Denmark. *BMC Microbiology*, 15, 249.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Meyling, N. V. & Eilenberg, J. (2006). Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 113, 336-341.
- Meyling, N. V. (2007). Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Department of Ecology. Frederiksberg Denmark University of Copenhagen, 1-18. <http://www.orgprints.org/11200.3>
- Meyling, N. V. & Eilenberg, J. (2007). Ecology of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43, 145-155.
- Moonjely, S. & Bidochka, M. J. (2019). Generalist and specialist *Metarhizium* insect pathogens retain ancestral ability to colonize plant roots. *Fungal Ecology*, 41, 209-217.
- Muñiz-Reyes, E., Guzmán-Franco, A.W., Sánchez-Escudero, J. & Nieto-Angel R. (2014). Occurrence of entomopathogenic fungi in tejocote (*Crataegus mexicana*) orchard soils and their pathogenicity against *Rhagoletis pomonella*. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 1450-1462.
- Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G. & Baverstock, J. (2014). Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 119, 54-61.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J. A., Maranhao, E.A., Ortiz-Urquiza, A. & Santiago Álvarez, C. (2007). Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological research*, 111, 947-966.
- Rehner, S.A. & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97, 84-98.
- Roberts, D. W. & St. Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 1-70.
- Sasan, R. K. & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte

- that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99, 101-107.
- Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J., Thorup-Kristensen, K. & Meyling, N. V. (2014). Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *Journal of Invertebrate Pathology*, 123, 6-12.
- Tamura, K., Stetcher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Thakur, R. & Sandhu, S. S. (2010). Distribution, occurrence and natural invertebrate hosts of indigenous entomopathogenic fungi of Central India. *Indian Journal of Microbiology*, 50, 89-96.
- Uzman, D., Pliester, J., Leyer, I., Entling, M. H. & Reineke, A. (2019). Drivers of entomopathogenic fungi presence in organic and conventional vineyard soils. *Applied Soil Ecology*, 133, 89-97.
- Vänninen, I. (1996). Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographic location, habitat type, and soil type. *Mycological Research*, 100, 93-101.
- Wysoki, M., Van Den Berg, M. A., Ish-Am, G., Gazit, S., Peña, J. E. & Waite, G. K. (2002). Pests and pollinators of avocado. En J. E. Peña, J. L. Sharp y M. Wysoki. (Eds.). *Tropical Fruits Pests and Pollinators: Biology, Economic Importance, Natural Enemies and Control* (pp. 223-293). Londres: CABI Publishing.
- Zimmermann, G. (1986). The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102, 213-215.