



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Caracterización morfológica, biológica y molecular de 20 cepas
de *Metarhizium anisopliae*”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA AGRÍCOLA Y BIOLÓGICA

Presentada por:

Audrey Stephanie Machado Alvarez

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2013

AGRADECIMIENTO

A Dios, mi madre, mis mejores amigos, pero uno muy especial al Ing. Jorge Mendoza, Ing. Alexandra Gómez, Ing. Patricia Gómez, Bióloga Mayra Valdez, Dr. Raúl Castillo y Dr. Freddy Garcés del Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador que con sus enseñanzas y guía hicieron posible la culminación de este trabajo.

Audrey Stephanie Machado Alvarez.

DEDICATORIA

A Dios que me dio fuerza y determinación para enfrentar las adversidades que se presentaron en mi vida, a mi madre quien paso noches incontables en vela para que sus hijos sean hombres y mujeres de provecho el día de hoy. Este logro es más tuyo que mío. A mis hermanos y Rocío quienes no solo me guiaron con palabras de sabiduría para tomar buenas decisiones, también me dieron el ejemplo de cómo ser una persona fuerte y luchadora, ustedes se convirtieron en la voz, en mi cabeza que me impulsa a hacerlo mejor cada día. A mis mejores amigos Francesca, Belén, Roberto y Paúl quienes me dieron una palabra de aliento cuando la necesite, jamás me fallaron, los quiero con todo mi corazón.

Audrey Stephanie Machado Alvarez.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Dr. Kleber Barcia V. Ph.D.
PRESIDENTE

MSc. Jorge Mendoza M.
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Efrén Santos O. Ph.D.
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

Audrey Stephanie Machado Alvarez

RESUMEN

El cultivo de la caña de azúcar provee un ecosistema que ofrece un ambiente favorable para el desarrollo de numerosos insectos y roedores, los cuales pueden llegar a convertirse en plagas muy perjudiciales. El efecto destructivo de estos organismos puede causar pérdidas significativas en la producción y el rendimiento azucarero y, en algunos casos, transmitir enfermedades muy importantes que afectan al cultivo (Mendoza et al., 2013). En la zona azucarera de la costa ecuatoriana existen varias especies de insectos que causan daños al cultivo de caña de azúcar, siendo los más importantes el saltahojas, *Perkinsiella saccharicida* Kirk., el áfido amarillo, *Sipha flava* Forbes; y el barrenador del tallo, *Diatraea saccharalis* Fabr. (Mendoza et al., 2013).

El saltahojas, *P. saccharicida*, puede ocasionar pérdidas de hasta 40 % en la producción de caña de azúcar. Además, este insecto es vector del virus que causa el Mal de Fiji, enfermedad aún no reportada en el país ni en el continente americano. Hasta ahora el manejo de esta plaga está basado en las labores culturales, el control natural y el uso racional de insecticidas (Mendoza et al., 2013). En la actualidad, los estudios en el área de la biología se están dirigiendo hacia un trato más amigable con el ambiente mediante el uso de agentes biocontroladores como los hongos

entomopatógenos, con el fin de solucionar los problemas que afectan este cultivo (Echeverría, 2006).

Debido a la importancia del saltahojas como plaga de la caña de azúcar en el Ecuador, se propone una solución de interés ecológico utilizando *Metarhizium anisopliae* para el control de esta plaga. El CINCAE ha procedido a recolectar y aislar varias cepas de este entomopatógeno procedentes de diferentes zonas cañeras e importadas de otros países, las cuales no han sido diferenciadas más que por su localización. Para la caracterización se emplearon cepas de la misma especie, en la que el grado de similitud genética es una limitante a la hora de diferenciar subpoblaciones; por ello, se utilizaron marcadores microsatélites que permiten estimar mejor la variación genética porque tienen alto polimorfismo y reproducibilidad. En este sentido, el objetivo general de esta investigación fue seleccionar cepas de *M. anisopliae* que por sus características morfológicas, biológicas y moleculares puedan ayudar al control biológico del saltahojas, *P. saccharicida*.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Entomología y Biología Molecular del Centro de investigación de la caña de azúcar del Ecuador (CINCAE), en Cantón El Triunfo de la provincia del Guayas; donde se caracterizó 20 cepas de *M. anisopliae*. Para la caracterización morfológica y

biológica se evaluaron los siguientes parámetros: el tamaño de conidias, la esporulación, el crecimiento radial de las colonias, la germinación después de la exposición a los rayos ultravioleta y la patogenicidad sobre *P. saccharicida*. En la caracterización molecular se utilizaron 8 iniciadores o marcadores SSR para determinar los perfiles genéticos de cada una de las cepas. Con los datos moleculares obtenidos se elaboró un dendograma utilizando el coeficiente de Dice en programa NTSYS-pc versión 2.0.

De acuerdo a la caracterización morfológica se concluye que todas las cepas evaluadas pertenecieron a *M. anisopliae*. En cuanto a la caracterización biológica la esporulación de las cepas fue igual a partir de los 10DDI; sin embargo, las cepas CMa 03, CMa 12, Metazeb y CMa 13 presentaron mayor esporulación a los 20DDI; las cepas que mostraron el mayor crecimiento radial fueron CMa 10 y CMa 08; las cepas más resistentes a la exposición a los rayos UV fueron CMa 01, CMa 02, CMa 03, CTC y Yara; y, las cepas más patogénicas a *P. saccharicida* fueron CMa 01, CMa 03 y CMa 11.

En la caracterización molecular se concluye que con un coeficiente de similitud de 0.6 las cepas se dividieron en dos grupos. En el grupo I se encontraron dos duplicados S1: CMa 01 y CMa 02 y, S2: CMa 05 y CMa 06, ambos con 1.0 de coeficiente de similitud; es decir, son genéticamente iguales. El grupo II mostró más variabilidad genética con un coeficiente de

similitud de 0.64 respecto al grupo I, esto se puede explicar debido a que en el grupo I se agruparon la mayoría de las cepas que fueron recolectadas en las cercanías del cantón El Triunfo; mientras que, en el grupo II se encontraban agrupadas casi todas las cepas extranjeras. Además, dentro de los subgrupos del grupo I hubo una tendencia de agrupación de acuerdo al origen geográfico de las cepas y al hospedero. Con éste avance se podrá reducir el número de cepas en el cepario del CINCAE, probar en campo las cepas más patogénicas que resultaron ser más resistentes a la luz UV y se podría realizar en futuras investigaciones la selección de las cepas que posean características biológicas de interés de cada subgrupo para la multiplicación de entomopatógenos.

INDICE GENERAL

RESUMEN	II
INDICE GENERAL.....	VI
ABREVIATURAS	X
SIMBOLOGÍA	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	4
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1.El saltahoja de la caña de azúcar, <i>Perkinsiella saccharicida</i>	4
1.1.1.Descripción del insecto	5
1.1.2.Hábitos	5
1.1.3.Daños e Importancia económica.....	6
1.2.Control.....	7
1.2.1.Control cultural	7
1.2.2.Control biológico	8
1.2.3.Control mecánico	8
1.2.4.Control químico	9
1.3. <i>Metarhizium anisopliae</i>	10
1.3.1.Características	11
1.3.2.Modo de acción	13

1.4.Caracterización de entomopatógenos	15
1.4.1.Caracterización morfológica	15
1.4.2.Caracterización biológica	15
1.4.3.Caracterización molecular	16
1.4.3.1.Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	16
1.4.3.2.Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	17
1.4.3.3.Polimorfismo de ADN Amplificados al azar (RAPD)...	18
1.4.3.4.Microsatélites (SSR)	18
1.5.Aplicación de marcadores SSR en estudios de cepas de <i>Metarhizium</i>	19
CAPÍTULO 2	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1.Localización	22
2.2.Caracterización morfológica	23
2.3.Caracterización biológica	24
2.3.1.Grado de Esporulación	25
2.3.2.Evaluación del crecimiento radial	27
2.3.3.Evaluación de la resistencia de las conidias de <i>Metarhizium</i> a la exposición a los rayos UV	28
2.3.4.Evaluación de la patogenicidad	30
2.4.Caracterización molecular	31

2.4.1.Extracción de ADN.....	31
2.4.2.Cuantificación y Calidad del ADN	34
2.4.3.Condiciones de Amplificación de la PCR	35
2.4.4.Separación electroforética de los productos de amplificación.....	37
2.4.5.Revelado del geles de poliacrilamida	38
2.4.6.Lectura de geles de poliacrilamida	38
2.4.7.Elaboración del dendograma	39
CAPÍTULO 3.....	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1.Caracterización morfológica	41
3.2.Caracterización biológica.....	46
3.2.1.Grado de esporulación.....	46
3.2.2.Evaluación del crecimiento radial.....	50
3.2.3.Evaluación de la resistencia de las conidias de <i>Metarhizum a</i> la exposicion los rayos UV	52
3.2.4.Evaluación de la patogenicidad.....	57
3.3.Caracterización molecular	60
3.3.1.Cuantificación y Calidad del ADN	60
3.3.2.Separación electroforética de los productos de amplificación.....	61
3.3.3.Tipificación	64

CAPÍTULO 4.....	68
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	68
ANEXOS.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	79

ABREVIATURAS

1X=una vez concentrado

2X= dos veces concentrado

10X=diez veces concentrado

ADN=ácido desoxirribonucleico

ADE=agua destilada estéril

EDTA=ácido etilendiaminotetraacético

AUP=agua ultra pura

ADEVA=Análisis de varianza

TE=buffer de lavado

TNS=buffer de lisis

cm =centímetros

cc./ha=centímetro cubico por hectárea

conidias/g=conidias por gramo

col: columna

Cl=Cloro

MgCl₂=Cloruro de Magnesio

DE=Desviación estándar

DDI=días después de la inoculación

conidias/ml=conidias por mililitro

ha=hectárea

H=Hidrogeno

HR=humedad relativa

Kg./ha=Kilogramos por hectárea

Mg=Magnesio

MC=medio completo

msnm=metros sobre el nivel del mar

μm =micras

μl =microlitro

ml =mililitro

mm=milímetros

mM=milimolar

M=molar

nm=nanómetro

ng/ μl =nanogramo por mililitro

dNTPs=nucleótidos

L./ha=Litro por hectárea

lb/pulg²=libra por pulgada cuadrada

PDA=Papa Dextrosa Agar

pb=pares de bases

AFLP= Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados)

pH=Potencial de Hidrógeno

RAPD=Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (Random Amplified Polymorphic DNA)

RFLP= Polimorfismos de Fragmentos de Tamaños Restringidos (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

PCR= Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerasa Chain Reaction)

rpm=revoluciones por minuto

RNAse=Ribonucleasa

Na=Sodio

SDS=Sodio dodecil sulfato

SSR=Simple Sequence Repeats (Repeticiones de Secuencias simples)

TBE =Tris Base, Ácido Bórico, Ácido etilendiaminotetraacético pH8

TEMED= Tetramethylethylenediamine

U=unidad

UV=ultravioleta

V=voltio

W=watts

SIMBOLOGÍA

°=grados

°C=grados centígrados

"=minutos

Nº.=número

%=porcentaje

\bar{x} =promedio

®=registrado

'=segundos

™=trademark (marca registrada)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de <i>Metarhizium anisopliae</i> : (a) Conidióforo (b) Conidias (12).....	12
Figura 2 Modo de acción de <i>Metarhizium anisopliae</i> (31).....	14
Figura 3 Sector del hemocitómetro utilizado para el conteo de las conidias. CINCAE Enero-Marzo, 2012.....	26
Figura 4 Medición del crecimiento radial de las colonias de <i>Metarhizium anisopliae</i> . CINCAE, Abril 2012.	28
Figura 5 Germinación de conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> después de 30 segundos de exposición a la luz ultravioleta. CINCAE, Mayo 2012.	30
Figura 6 Micelio de <i>Metarhizium anisopliae</i> en medio completo. CINCAE Octubre-Noviembre, 2012.....	32
Figura 7 Tipos de borde de las colonias de <i>Metarhizium anisopliae</i> . CINCAE Diciembre, 2011.....	42
Figura 8 Promedio de esporulación de 20 cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> a los 30 días después de la inoculación. CINCAE, 2012	48

Figura 9 Promedios de germinación de conidias que presentaron las cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> más susceptibles a la exposición de luz ultravioleta. CINCAE, 2012	54
Figura 10 Promedios de germinación de conidias que presentaron las cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> más tolerantes a la exposición de luz ultravioleta. CINCAE, 2012.	55
Figura 11 Promedios de mortalidad de adultos de <i>Perkinsiella saccharicida</i> tratados con 20 cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> . CINCAE, 2012.....	60
Figura 12 Análisis electroforético de la calidad de ADN visualizado en gel de agarosa al 1.5% teñido en SYBRR® Gold Nucleic Acid gel Stain de 20 muestras de ADN de cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> . CINCAE Enero, 2013.....	61
Figura 13 Gel de poliacrilamida que muestra los resultados con el primer AY842949 en el análisis de 20 cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> . MP contiene el marcador de peso molecular para referencia. La col 1 presenta el patrón de la cepa CMa 01, col 2: CMa 02, col 3: CMa 03, col 4: CMa 04, col 5: CMa 05, col 6: CMa 06, col 7: CMa 07, col 8: CMa 08, col 9: CMa 09, col 10: CMa 10, col 11: CMa 11, col 12: CMa 12, col 13: CMa 13, col 14: Dieca, col 15: CTC, col 16: CG93-3, col 17: PL 43, col 18: CG01-05, col 19: Metazeb, col 20: Yara...	63

Figura 14 Dendograma que muestra la similitud genética de 20 cepas de *Metarhizium anisopliae*, de acuerdo con la información obtenida por medio de marcadores moleculares microsátélites, según el índice de DICE. CINCAE Abril, 2013. 67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Identificación de las cepas utilizadas en el presente estudio. CINCAE, 2012.....	23
Tabla 2	Primers SSR utilizados para caracterizar 20 cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (22). CINCAE, 2012.	36
Tabla 3	Componentes de la reacción SSR (22). CINCAE, 2012.	36
Tabla 4	Características morfológicas del crecimiento de la colonia de diferentes aislamientos de <i>Metarhizium anisopliae</i> , a los 7 y 15 días de la siembra en medio de cultivo PDA. CINCAE, 2012.	44
Tabla 5	Dimensiones del tamaño de conidias (μm) de 20 cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> . CINCAE, 2012.	46
Tabla 6	Ecuaciones de regresiones y coeficiente de determinación para el grado de esporulación de 20 cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> . CINCAE, 2012.....	50
Tabla 7	Promedios de germinación de conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> a diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta. CINCAE, 2012.	53

INTRODUCCIÓN

En la zona azucarera de la costa ecuatoriana existen varias especies de insectos que causan daños al cultivo de caña de azúcar, siendo las más importantes el saltahojas, *Perkinsiella saccharicida* Kirk., el áfido amarillo *Sipha flava* Forbes; y el barrenador del tallo, *Diatraea saccharalis* Fabr., (Mendoza et al., 2013).

El saltahojas, *P. saccharicida*, puede ocasionar pérdidas de hasta 40 % en la producción de caña de azúcar, debido al daño directo e indirecto que ocasionan al cultivo. Además, este insecto es vector del virus que causa el Mal de Fiji, enfermedad aún no reportada en el país ni en el continente americano. Hasta ahora el manejo de esta plaga está basado en las labores culturales, el control natural y el uso de insecticidas (Mendoza et al., 2013). En la actualidad, los estudios en el área de la Biología se están dirigiendo hacia un trato más amigable con el ambiente para aprovechar las interacciones con los enemigos naturales de las plagas de este cultivo, mediante el uso de agentes biocontroladores como los hongos entomopatógenos, con el fin de solucionar los problemas que afectan este cultivo (Echeverría, 2006).

Los hongos entomopatógenos constituyen una alternativa para el control biológico de plagas agrícolas, el grupo más estudiado e importante está

constituido por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. En el caso de *M. anisopliae* es un patógeno que ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diferentes órdenes, entre los cuales se encuentra el saltahoja, *P. saccharicida*, diversas especies de salivazos, entre ellas *M. andigena*; y, el barrenador del tallo, *D. saccharalis*, que afectan la caña de azúcar (Alves, 1998).

Las caracterizaciones morfológica y biológica han sido utilizadas para la descripción de hongos entomopatógenos, determinando las características de las colonias, variaciones morfológicas entre aislamientos de una misma especie de diferentes orígenes geográficos y valores de mortalidad que permiten conocer la agresividad de las cepas (Romero et al., 1997; Guerrero et al., 1999). Sin embargo, es necesario que éstos métodos sean complementados con datos moleculares, para determinar el nivel de diversidad genética e identificar posibles patrones de bandas que permitan discriminar entre aislamientos (Bridge et al., 1993) y ofrezcan una mayor precisión en la identificación entre cepas de una misma especie o posibles aislamientos duplicados de una misma cepa (Becerra et al., 2007).

La aplicación de Microsatélites o SSR (Simple Sequences Repeats) en estudios de *M. anisopliae* es reciente. De acuerdo a Enkerli et al., (2005), estos estudios permitieron identificar marcadores Microsatélites a partir de

genotecas de *Metarhizium* diseñando 14 pares de primers, concluyendo que son muy útiles para estudios ecológicos y genotipaje de cepas de *M. anisopliae*, aplicadas como agentes de biocontrol.

Debido a la importancia del saltahojas como plaga de la caña de azúcar en el Ecuador, el CINCAE ha procedido a recolectar y aislar varias cepas de *M. anisopliae* procedentes de diferentes zonas cañeras e importadas de otros países, las cuales no han sido diferenciadas más que por su localización. Por el momento se desconoce si corresponden a una misma cepa, o por el contrario, representan diferentes razas o biotipos. Para la caracterización se emplearon cepas de la misma especie, en la que el grado de similitud genética es una limitante a la hora de diferenciar subpoblaciones; por ello, se utilizaron marcadores microsatélites que permiten estimar mejor la variación genética porque tienen alto polimorfismo y reproducibilidad. El objetivo general de esta investigación fue seleccionar cepas de *M. anisopliae* que por sus características morfológicas, biológicas y moleculares puedan ayudar al control biológico del saltahojas, *P. saccharida*. Para cumplir el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1) Determinar la patogenicidad de 20 cepas de *M. anisopliae* sobre *P. saccharida*; 2) Determinar las características morfológicas de este grupo de cepas; y 3) Caracterizar molecularmente las cepas en estudio.

CAPÍTULO 1

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. El saltahojas de la caña de azúcar, *Perkinsiella saccharicida*

El saltahojas, *Perkinsiella saccharicida* Kirkaldy (Hemiptera, Delphacidae), es una de las plagas más importante de la caña de azúcar en la cuenca baja del río Guayas, principal zona azucarera del Ecuador (1).

Este insecto es probablemente nativo de Papúa Nueva Guinea, pero con el movimiento de la caña de azúcar se ha dispersado hacia otros países y regiones de Asia, África, América y Oceanía. El primer registro de esta plaga en el Ecuador, y a su vez en el continente americano, ocurrió en 1966 (2).

1.1.1. Descripción del insecto

Los adultos son pequeñas chicharritas o saltahojas, de unos 5 mm de largo, de color marrón claro. La mayoría de ellos presentan alas normales (macrópteros) y un pequeño porcentaje de hembras poseen un solo par de alas cortas (braquípteras). Las hembras llegan a ovipositar alrededor de 500 huevos, en grupos de 3 a 6. Son incrustados en la nervadura central de la hoja, preferentemente en el haz (lado arriba de la hoja) y cerca de la base de la hoja. Después de 12 a 15 días de la ovoposición nacen las ninfas, las cuales pasan por cinco instares, cada uno de los cuales dura de 4 a 7 días. Los adultos tienen una longevidad de 18 a 50 días (3).

1.1.2. Hábitos

Las ninfas son gregarias (permanecen agrupadas), se congregan en el envés y en la base de las hojas bajas; mientras que, los adultos se ubican preferentemente en la parte superior de la planta, cerca del cogollo. Los adultos tienen hábitos migratorios, pudiendo desplazarse a distancias considerables. De esta manera se produce la infestación inicial de las cañas jóvenes. Generalmente, la migración ocurre

cuando hay poblaciones altas de adultos en las cañas maduras o cuando son perturbados por alguna labor agronómica de cultivo, como la cosecha e inclusive la aplicación de insecticidas. La velocidad y dirección del viento tiene una marcada influencia sobre la dispersión de esta plaga (3).

1.1.3. Daños e Importancia económica

Las ninfas y los adultos succionan la savia y las hembras adultas hacen incisiones en la nervadura central de la hoja para incrustar sus huevos. A través de esas heridas entran otros microorganismos (*Colletotrichum falcatum*, *Physalospora tucumanensis* y *Glomerella sp.*) que ocasionan la pudrición roja. Además, las ninfas y adultos producen una secreción azucarada que se deposita sobre las hojas inferiores, sobre la cual se desarrolla el hongo *Capnodium sp.* causante de la fumagina, lo que le da una apariencia negruzca al follaje. Los efectos de la fumagina sobre la planta pueden ser mayores que los causados por el insecto, al interferir en el proceso fotosintético de la misma. Sin embargo, el daño más importante que se atribuye a este insecto es la capacidad de transmitir el virus causante del “mal de Fiji”, enfermedad no reportada aun en el continente americano (4).

Cuando la infestación es elevada y persistente provocan un debilitamiento de la planta que se manifiesta por un amarillamiento, crecimiento lento, acortamiento de los entrenudos, secamiento prematuro de las hojas y muerte de brotes jóvenes. Todo esto puede causar una reducción de hasta 36% de la producción (TCH) (5). Según Gaviria (1997), en 1995 ocurrieron pérdidas de hasta 58 toneladas de caña por hectárea (TCH), con incrementos significativos de azúcares reductores (4).

1.2. Control

El manejo de esta plaga implica un buen manejo agronómico del cultivo, la preservación y aumento de enemigos naturales, el uso de capturadores mecánicos y el uso racional de insecticidas.

1.2.1. Control cultural

El control cultural debe ser entendido como la manipulación deliberada del ambiente para hacer éste menos favorable para las plagas y más favorable para el cultivo. Este método comprende el control de malezas, fertilización y, riegos oportunos y adecuados. Las malezas de porte bajo, que

florece y no compite con la caña y, que no sean hospederos de plagas o enfermedades, sirven como fuente de alimentación y refugio de algunos insectos benéficos. De allí que se debe procurar un manejo racional de ellas, especialmente en los bordes de los canteros (4).

1.2.2. Control biológico

Los enemigos naturales son el factor más importante de regulación natural de las poblaciones de *Perkinsiella*. Los más comunes son las avispidas del género *Aprostocetus* (= *Ootetrastichus*) sp. y *Anagrus* sp., que parasitan los huevos de *Perkinsiella*, siendo el primero el más predominante; *Pseudogonatopus* sp. que parasita ninfas; *Tytthus parviceps*, *Zelus pedestris*, crisopas, arañas y aves (golondrinas) que actúan como depredadores; y, los entomopatógenos *M. anisopliae*, *Hirsutella tompsoni*, *Entomophthora* sp. y *Verticillium* sp. que son causantes de epizootias muy marcadas en la época lluviosa. Los trabajos efectuados hasta ahora con *M. anisopliae*, como insecticida biológico, no han sido exitosos a nivel de campo (4).

1.2.3. Control mecánico

Este método consiste en el uso de un capturador mecánico (“vaca loca”), construido con una armazón metálica, forrada de tul y con frascos recolectores de insectos. Este capturador se pasa sobre los brotes de caña para perturbar los adultos y atraparlos en los frascos recolectores. Esta medida de control puede ser utilizada sobre caña pequeña (hasta 70 cm de altura) y sobre poblaciones adultas de *Perkinsiella*. Su eficacia a nivel de campo en el ingenio San Carlos ha sido de hasta 75% (4).

1.2.4. Control químico

Es posible que todos los brotes poblaciones de *Perkinsiella* puedan llegar a estar bajo control de sus enemigos naturales dentro de pocos meses; pero, la persistencia de la plaga durante este periodo puede causar tanto daño que se hace necesario el control químico. Esta decisión debe ser basada en el nivel de infestación, el estado biológico de la plaga, la edad del cultivo y las condiciones agronómicas del mismo. Para determinar el nivel de infestación se debe hacer una observación rápida en varios puntos del cantero, fijándose en el estado de desarrollo de la plaga y en la presencia o ausencia de fumagina. El momento ideal para la aspersion del insecticida

es cuando la mayor parte de la población se encuentra en el estado de ninfa, que es el estado más vulnerable a los insecticidas. Los huevos no son eliminados por las aplicaciones normales de insecticidas y los adultos muestran una tendencia a emigrar hacia campos vecinos después de la aplicación del insecticida. Por otra parte, en caña grande y con abundante follaje es difícil lograr un control eficiente de esta plaga. Los productos recomendados son: Malathion 57 CE (Malathion), de 0.75 a 1.0 L. /ha.; Orthene 75 PS (acefate), de 0.75 Kg. /ha. ; o Regent 200 SC (fipronil), 350 cc./ha (4).

1.3. *Metarhizium anisopliae*

Los hongos son los primeros patógenos de insectos en ser utilizados en el control microbiano. Aproximadamente el 80% de las enfermedades tienen como agentes etiológicos a los hongos, pertenecientes a 90 géneros y más de 700 especies. La mayoría de los géneros de hongos entomopatógenos reportados ocurren en Brasil; de éstos, más de 20 inciden sobre plagas de importancia económica. El grupo más importante de hongos entomopatógenos, con fines prácticos de manejo, está constituido por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (6).

M. anisopliae es un hongo entomopatógeno imperfecto de la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae (7). Se caracteriza por presentar una reproducción asexual y por atacar a un gran número de especies de insectos (6). Esta ampliamente distribuido en la naturaleza y, puede ser encontrado fácilmente en los suelos, donde sobrevive por largos periodos (8). Este hongo fue uno de los primeros microorganismos en ser usado para el control biológico. Es uno de los hongos entomopatógenos más comunes con una distribución a nivel mundial (9).

Este patógeno ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes (10), entre los cuales se encuentra el saltahoja, *P. saccharicida*, y diversas especies de salivazo que atacan la caña de azúcar (6; 11). Los insectos atacados por este hongo se tornan duros y son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco y posteriormente cuando esporula se torna de color verde oliva (10).

1.3.1. Características

Las colonias son pegadas al medio, completamente redondas, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro,

dependiendo del aislamiento. La pigmentación del medio es de incoloro a marrón, a veces verdoso citrino.

El conidióforo es irregularmente ramificado con dos a tres ramas en cada septa, de 4-14 μm de longitud y 1.5-2.5 μm de diámetro. Las fiálides son cilíndricas en forma de clava, adelgazadas en el ápice. Miden 6-13 μm de longitud y 2-4 μm de diámetro. Las conidias son generalmente uninucleadas, hialinas o débilmente coloreadas, miden usualmente de 3-9 μm de longitud y de 1.5-3.5 μm de ancho (12). La temperatura y humedad son importantes para la infección y esporulación del hongo. En condiciones de laboratorio, la germinación puede ocurrir a partir de las 12 horas, a una temperatura de 23 a 30°C y humedad relativa mayor al 90% (6)(Figura 1).

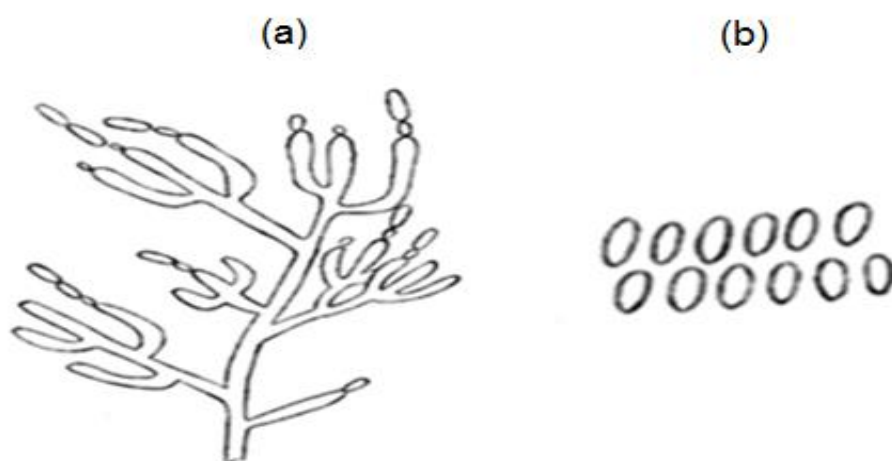


Figura 1 Estructura de *Metarhizium anisopliae*: (a) Conidióforo (b) Conidias (12).

1.3.2. Modo de acción

Los hongos entomopatógenos pueden causar infección en cualquier etapa de desarrollo del insecto. En general, las fases que desarrollan los hongos sobre sus hospedantes son: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. El inoculo o unidad infectiva está constituida por las estructuras de reproducción sexual y asexual, es decir las esporas y conidios.

El proceso se inicia cuando la espora o conidio se adhiere a la cutícula del insecto; luego emite un tubo germinativo y un apresorio, con este se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita la penetración física.

Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido infectado, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto (Figura 2). Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de mucha actividad toxica sobre insectos, ácaros y nematodos (10).

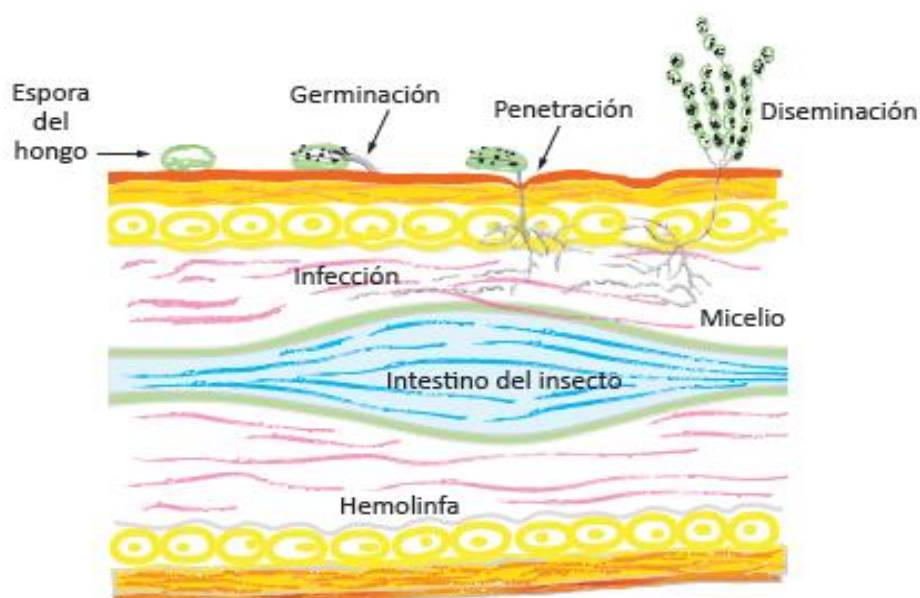


Figura 2 Modo de acción de *Metarhizium anisopliae* (13).

1.4. Caracterización de entomopatógenos

El uso del control biológico contribuye con el manejo ambientalmente más amigable de la agricultura. Sin embargo, la eficiencia de este método depende básicamente de hacer una mejor selección de las cepas en base a la caracterización. Entre las caracterizaciones más usadas para hongos entomopatógenos se pueden mencionar la morfológica, biológica y molecular (14; 15; 16).

1.4.1. Caracterización morfológica

Consiste en el análisis de aspectos morfológicos a nivel microscópico, es decir, formas, colores y dimensiones de las estructuras reproductivas (cuerpos fructíferos, conidias, esporas, conidióforos, fiálides) o células vegetativas (estomas, cuerpos hifales, rizoides, cistídios). A nivel macroscópico, son analizados caracteres, tales como: capacidad de formar sinemios, la apariencia de los cultivos en medios definidos, la forma, la coloración y el olor de las colonias (6).

1.4.2. Caracterización biológica

Otro método utilizado para diferenciar aislamientos de hongos entomopatógenos de la misma especie, es la caracterización

biológica mediante la evaluación de la patogenicidad, la virulencia y los aspectos de comportamiento que ayudan a determinar el potencial del hongo como controlador biológico (14).

1.4.3. Caracterización molecular

A pesar de la información que se obtiene de las caracterizaciones morfológica y biológica no siempre proporcionan diferencias a nivel de subespecie. Por ello es necesario complementar con la utilización de técnicas moleculares que ayuden a ampliar el conocimiento de la variabilidad intraespecífica de los hongos entomopatógenos más comúnmente utilizados en el control biológico (6). La clasificación taxonómica de los hongos se ha beneficiado enormemente de las posibilidades ofrecidas por la caracterización molecular y esto ha sido particularmente cierto para *Metarhizium* (17).

1.4.3.1. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Los AFLP son una combinación de las técnicas de RFLP y PCR, se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción mediante PCR. Es un método muy sensible para caracterizar ADN de cualquiera que sea su origen y complejidad. Permite una exploración rápida del polimorfismo del genoma completo (18).

1.4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica poderosa, que se basa en el apareamiento y polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizados como iniciadores o *primers* que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena, “blanco” de amplificación.

Estos iniciadores son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región “blanco”. Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización de las cadenas de ADN, hibridación del ADN con la cadena complementaria y polimerización o síntesis del producto de amplificación. Este ciclo se repite de 35 a 40 veces (19).

1.4.3.3. Polimorfismo de ADN Amplificados al azar (RAPD)

RAPD es básicamente una variación del protocolo de PCR, con dos características distintivas: utiliza un *primer* único en vez de un par de iniciadores, y el iniciador único tiene secuencia arbitraria, por lo tanto, su “secuencia blanco” es desconocido (19). Debido a esto no se necesita conocimiento previo del genoma que se está analizando (17).

1.4.3.4. Microsatélites (SSR)

Los SSR son arreglos de repeticiones de secuencias de ADN en tándem di-, tri-, tetra- y pentanucleótidos que se encuentran dispersas en el genoma de todos los eucariotas investigados hasta la fecha. Estos motivos repetidos están flanqueados por una única secuencia (20). Las regiones que contienen secuencias sencillas repetidas son amplificadas individualmente a través de PCR a partir de un par de iniciadores específicos (20 a 30 pares bases) complementarios a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite.

La detección de secuencias SSR vía PCR se realiza en geles de poliacrilamida o agarosa especial de alta resolución, siendo necesario un gel adecuado para la separación de segmentos que difieren en pocos pares de bases, dependiendo del número de nucleótidos del elemento repetido en el microsatélite (19). Son extremadamente útiles para la identificación personal, genética poblacional, evolución y mapeo genético (21). Por lo tanto, son altamente polimórficos (multialélicos) entre cepas debido a la variación del número de repeticiones, son codominantes y altamente reproducibles comparados con otros marcadores (22).

1.5. Aplicación de marcadores SSR en estudios de cepas de *Metarhizium*

Recientemente, los marcadores SSR han sido utilizados como un marcador molecular eficaz para el estudio de la población genética de hongos. Enkerli et al (23), diseñaron 14 pares de iniciadores microsatélite a partir de 34 cepas de *M. anisopliae* colectadas en diferentes localidades en Suiza. Con esto se pudo concluir que son muy útiles para estudios ecológicos y análisis de diversidad dentro de

una población así como para monitoreo y genotipaje de cepas de *M. anisopliae*.

Becerra et al (22) analizaron 39 aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* seleccionados al azar de la colección del Instituto de Investigaciones agropecuarias (INIA) en Quilamapu-Chile, recolectados de diferentes orígenes geográficos usando RAPD, SSR y ITS. Los datos obtenidos con los marcadores RAPD revelaron un alto grado de diversidad genética para *M. anisopliae* con un promedio de 41.0% de similitud; mientras que el análisis con SSR detectó 45.2% y los marcadores ITS 70.2% de similitud. Para los tres marcadores moleculares, la diversidad no estuvo asociada al origen geográfico de los aislamientos.

Oulevey et al (24) aislaron tres colecciones de cepas de *M. anisopliae* de la región de Suiza. Utilizaron 41 iniciadores de los cuales 14 ya habían sido diseñados previamente por Enkerli et al (23). Los resultados de Oulevey y colaboradores permitieron detectar 25 genotipos en la colección muestreada a través de la región de Suiza, 30 y 11 genotipos diferentes en cada una de las colecciones aisladas del campo; esto indicó una alta diversidad genética a nivel regional y en condiciones de campo. Este estudio mejoró también la

eficiencia de detección de los genotipos, escogiendo 16 iniciadores comunes para proveer máxima resolución en las tres colecciones. Se concluyó que los microsatélites permitieron analizar la estructura genética poblacional de *M. anisopliae* en diferentes hábitats, tanto a nivel de región como en un campo (24).

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización

Los estudios de caracterización morfológica, biológica y molecular de *Metarhizium anisopliae* se llevaron a cabo en los laboratorios de Entomología y Biología Molecular del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE), en el período comprendido entre octubre del 2011 y abril del 2013. El CINCAE está ubicado en el Km 49.6 vía Durán-El Triunfo, cuyas coordenadas geográficas son 79°26'83" longitud este y 02°19'33" latitud sur, a una altitud de 45 msnm.

Nº	Código	Procedencia	Aislamiento de:
1	CMa 01	Hacienda cañaveral, Naranjito	<i>Mahanarva andigena</i>
2	CMa 02	Ingenio San Carlos, Marcelino Maridueña	<i>Mahanarva andigena</i>
3	CMa 03	Ingenio San Carlos, Marcelino Maridueña	<i>Mahanarva andigena</i>
4	CMa 04	Puyo, Pastaza	<i>Mahanarva andigena</i>
5	CMa 05	CINCAE, EL Triunfo, Guayas	<i>Perkinsiella saccharicida</i>
6	CMa 06	Ingenio Ecudos, la Troncal	<i>Perkinsiella saccharicida</i>
7	CMa 07	Ingenio Valdez, Milagro	<i>Perkinsiella saccharicida</i>
8	CMa 08	Ingenio Valdez, Milagro	<i>Perkinsiella saccharicida</i>
9	CMa 09	Ingenio San Carlos, Marcelino Maridueña	<i>Perkinsiella saccharicida</i>
10	CMa 10	Pinas, El Oro	<i>Mahanarva andigena</i>
11	CMa 11	Ingenio San Carlos, Marcelino Maridueña	<i>Diatraea saccharalis</i>
12	CMa 12	Ingenio Ecudos, la Troncal	<i>Diatraea saccharalis</i>
13	CMa 13	Ingenio Valdez, Milagro	<i>Diatraea saccharalis</i>
14	Dieca	Dieca, Costa Rica	<i>Aeneolamia postica</i>
15	CTC	COPERSUCAR, Brasil	<i>Mahanarva posticata</i>
16	Yara	Guatemala	<i>Aeneolamia postica</i>
17	CG93-3	Guatemala	<i>Aeneolamia postica</i>
18	PL43	Guatemala	<i>Aeneolamia postica</i>
19	CG01-05	Guatemala	<i>Aeneolamia postica</i>
20	Metazeb	Ecuabiológica-Quito	-----

Tabla 1 Identificación de las cepas utilizadas en el presente estudio. CINCAE, 2012.

2.2. Caracterización morfológica

A partir de cultivos monospóricos de las 20 cepas de *M. anisopliae*, se tomó un disco de la colonia con un sacabocado de 5 mm de diámetro, se sembraron en cajas petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar) y, se incubaron por 15 días a 27.1 ± 1.0 °C y $66.8 \pm 3.8\%$ de humedad relativa. Se realizaron dos observaciones del crecimiento del hongo, a

los 7 y 15 días después de la siembra. A los 7 días se describió la colonia en cuanto a diámetro, color, borde y pigmentación del medio. A los 15 días se consideró el color de la esporulación (16). Para la descripción del color de la colonia se empleó la escala de colores Mussel® Soil Color Charts.

Para medir el tamaño de las conidias se preparó una suspensión con 10 ml de agua destilada estéril (ADE) a la que se agregó una pequeña cantidad de polvo de conidias y una gota de Tween 20, y, se agitó en el vortex durante 1 minuto hasta que la suspensión este homogénea y sea de un verde muy claro. Posteriormente se colocó 5 μ l de la suspensión en un portaobjeto adicionándole una gota de lactofenol, se cubrió y se flameó por 3 segundos.

Para que las conidias puedan ser medidas con mayor facilidad se utilizó un micrómetro incorporado al ocular del microscopio con el que se evaluó un total de 30 conidias por cepa, usando un objetivo de 100x (Glare e Inwood 1998, Vélez *et al.*, 1999. citados por Vélez *et al.* (25)).

2.3. Caracterización biológica

Para contar con información sobre el comportamiento de los diferentes aislamientos se realizaron otras pruebas en las que se evaluaron, los siguientes parámetros: grado de esporulación, crecimiento radial, resistencia a la luz ultravioleta y patogenicidad (14).

2.3.1. Grado de Esporulación

Se prepararon matrices sólidas para aumentar la producción del hongo y se procedió a inocular el sustrato de arroz siguiendo la metodología indicada por Gómez y Mendoza (26). Las fundas inoculadas con el hongo se evaluaron desde los 5 hasta 30 días después de la inoculación. Para ello se pesó 1 g de arroz-hongo de cada cepa y se mezcló con 10 ml de ADE mediante agitación en vortex durante 1 minuto. Luego, de cada suspensión madre se tomó 1ml y se colocó en un segundo frasco con 9 ml de ADE, con lo que quedó preparada la dilución 1×10^{-1} . Se repitió este procedimiento hasta obtener una dilución de 1×10^{-3} , de la que se tomó 10 μ l para cada cámara del hemocitómetro y se utilizó el objetivo de 40x para la observación, siguiendo el procedimiento para el conteo de conidias propuesto por Cañedo y Ames (12) (Figura 3).

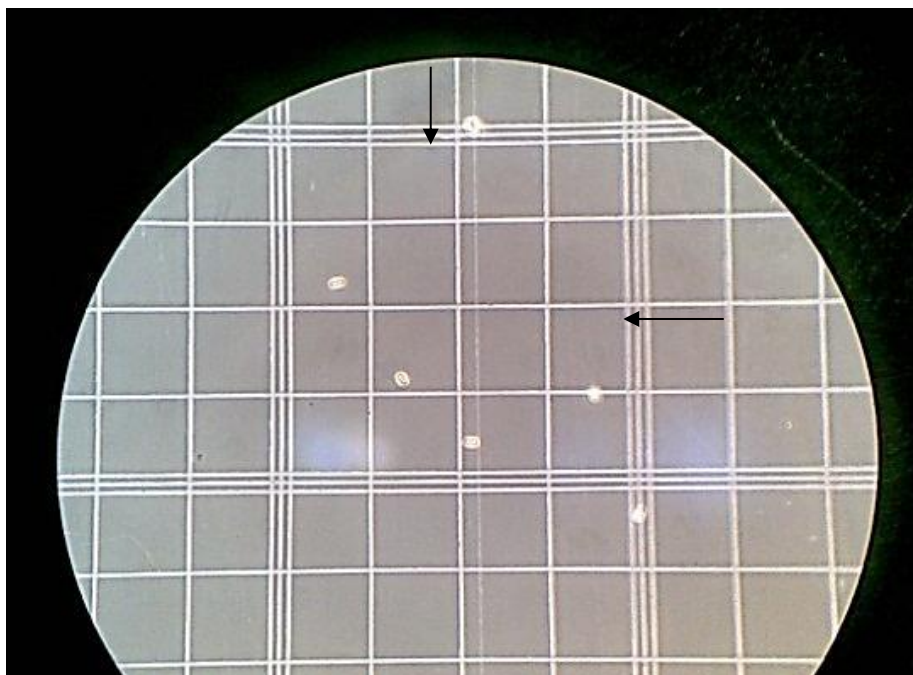


Figura 3 Sector del hemocitómetro utilizado para el conteo de las conidias.
CINCAE Enero-Marzo, 2012.

Con esto se calculó el número de conidias totales por un gramo de arroz para cada cepa. Para este experimento se utilizó un diseño de parcelas divididas, usando las 20 cepas de *M. anisopliae* como el factor A y 6 tiempos de evaluación (5 a 30 días después de la inoculación) como el factor B, con dos repeticiones.

Para el análisis estadístico los datos fueron transformados a $\text{Log}_{10}(x+1)$ y para la separación de medias de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey ($p=0.05$). Adicionalmente se efectuaron regresiones cuadráticas con cada una de las cepas.

Las cepas de *M. anisopliae* se mantuvieron en crecimiento a $25.2 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ y $68.4 \pm 12.5\%$ de Humedad Relativa (HR). Se manejó un porcentaje de humedad relativa bajo, para evitar que el hongo produjera nuevamente micelio y disminuyera la concentración de conidias. De esta manera se pudo evaluar la producción de conidias durante los 30 días después de la inoculación.

2.3.2. Evaluación del crecimiento radial

En la cámara de flujo laminar, a partir de los aislamientos en cajas Petri, se tomaron discos de 5 mm de diámetro de los bordes de la colonia con la ayuda de una pipeta Pasteur. Estos se sembraron, con un alfiler adaptado a un asa bacteriológica en el centro de las cajas Petri de plástico con PDA más ácido láctico.

Se incubaron durante 15 días y cada 3 días se determinó el crecimiento radial. Para esto se trazaron dos líneas perpendiculares al punto inicial de crecimiento del hongo, midiendo el diámetro con una regla y tomando dos mediciones en cruz. Para este experimento se realizó un análisis de regresión lineal con cada una de las cepas (Figura 4).

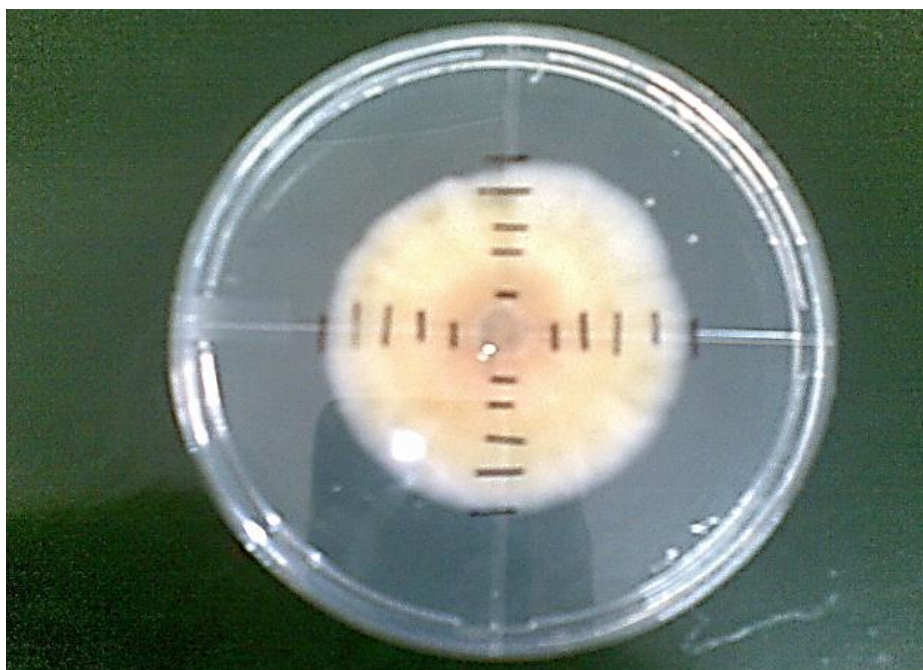


Figura 4 Medición del crecimiento radial de las colonias de *Metarhizium anisopliae*. CINCAE, Abril 2012.

2.3.3. Evaluación de la resistencia de las conidias de *Metarhizium* a la exposición a los rayos UV

A partir del arroz-hongo se hicieron diluciones seriadas de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-3} , con la finalidad de contar el número de conidias en hemocitómetro. Estos datos de conteo sirvieron para los cálculos de ajuste del volumen necesario para obtener de cada cepa 10 ml de solución a una concentración de 1×10^6 conidias/ml, mediante la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, donde: C_1 corresponde a la concentración conidias por mililitro determinadas según conteo en hemocitómetro; C_2 es la

concentración que se deseaba obtener (1×10^6 conidias/ml) en un volumen V_2 (10 ml); y V_1 el volumen a tomar de la solución madre. De esta solución se tomaron 2 alícuotas de 5 μ l y se inocularon en cajas Petri con agar agua, posteriormente se colocaron destapadas en una cámara de aislamiento con luz ultravioleta a una distancia de 55 cm de altura con respecto a la lámpara de 254 nm y a 115 watt de potencia (Spectroline, modelo B-100A).

Los tiempos de exposición fueron: 0, 30, 60, 90 y 120 segundos. La inoculación y exposición de los tratamientos se realizó en forma descendente de manera que el tratamiento 1 (0 segundos) fue el último en ser inoculado. Luego de transcurrir el tiempo de exposición de cada tratamiento, se sellaron las cajas Petri y se incubaron durante 20 horas. Después se evaluó la germinación sobre un total de 150 conidias (Figura 5).

Para este experimento se utilizó un arreglo factorial, constituido por las 20 cepas de *M. anisopliae* (Tabla 1) y cinco tiempos de exposición a la luz ultravioleta (0, 30, 60, 90, 120 segundos), dispuestos en un diseño completamente al azar, con dos repeticiones. Para el análisis estadístico los datos fueron

transformaron según la expresión Arcoseno ($\sqrt{x/100}$) y para la separación de medias de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey ($p=0.05$).



Figura 5 Germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae* después de 30 segundos de exposición a la luz ultravioleta. CINCAE, Mayo 2012.

2.3.4. Evaluación de la patogenicidad

Se evaluó la patogenicidad de las cepas de *M. anisopliae* sobre adultos de *P. saccharicida* provenientes del campo y del insectario. Previo a la inoculación los adultos se colocaron en el congelador por espacio de 45 segundos para paralizarlos momentáneamente y facilitar la aplicación del hongo. Para la inoculación se utilizó una concentración de 1×10^8 conidias/ml mediante una pulverización con un aerógrafo a una presión de

20 lb/pulg². Finalmente se colocaron en jaulas entomológicas a razón de 25 individuos/jaula. Las jaulas estaban constituidas por un cilindro acrílico de 38 cm de altura por 16 cm de diámetro, con hojas frescas de caña de azúcar paradas sobre una esponja orgánica húmeda cubierta con papel toalla para facilitar el proceso de recolección de los insectos muertos. Diariamente se realizaron observaciones hasta 10 días después de la inoculación para determinar la causa de mortalidad. Los individuos muertos fueron acondicionados en cámara húmeda para verificar la presencia del patógeno en prueba.

Para este ensayo se utilizó un diseño completamente al azar, con 21 tratamientos (las 20 cepas más un testigo absoluto constituido por agua destilada estéril) y cuatro repeticiones. Previo al análisis de varianza (ADEVA) los datos fueron transformados a raíz cuadrada ($x+0.5$) y para la separación de medias de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey ($p=0.05$).

2.4. Caracterización molecular

2.4.1. Extracción de ADN

Para producir suficiente cantidad de micelio se utilizó medio completo (MC) (Anexo1), empleando una modificación del método descrito por Enkerli et al (23). En un frasco se colocó 50 ml de MC a un pH 6.7 y se esterilizó a una presión de 1 atmosfera y 115 °C durante 15 minutos. Al MC se añadió 1 gota de ácido láctico después de esterilizar. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar se realizó un raspado de esporas de la colonia y se colocó dentro del frasco que contenía 50 ml de MC estéril. Este medio se incubó entre 3 a 5 días a temperatura ambiente (Figura 6).



Figura 6 Micelio de *Metarhizium anisopliae* en medio completo. CINCAE
Octubre-Noviembre, 2012.

Se efectuó una modificación del protocolo de extracción de Cenni (27) en cada una de las cepas en estudio. Procediéndose de la siguiente manera: El micelio del hongo se enjuagó con ADE y se secó en una toalla de papel, posteriormente se cortó aproximadamente 200 mg de micelio y se colocó en un tubo Ependorf de 1.5 ml con 500 μ l buffer de lavado TE (Tris-HCl pH 8, EDTA pH 8). El micelio del hongo fue centrifugado durante 5 minutos a 14000 rpm, descartando el TE. Para la lisis se agregó 300 μ l de buffer TNS (Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS), la homogenización se realizó con la ayuda de un pistilo por 2 minutos, posteriormente se añadió 150 μ l de acetato de sodio 3 M y los tubos fueron incubados a -20°C por 10 minutos. Para finalizar este proceso, cada muestra se colocó brevemente en el vortex y posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm. Esto permitió recuperar 800 μ l de sobrenadante que fue transferido a un nuevo tubo Ependorf agregando la misma cantidad de isopropanol. El ADN fue precipitado por incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. El pellet fue recuperado por centrifugación durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, seguido de un lavado con 800 μ l de etanol al 70% por centrifugación durante 5 minutos a 14000 rpm. A continuación se eliminó el etanol y se

voltearon los tubos Ependorf sobre una tolla de papel durante 1 minuto para descartar residuos de etanol en el pellet y se resuspendió el ADN con 50 μ l TE. Finalmente se realizó un tratamiento con ARNasa adicionando 25 μ l en cada muestra, incubando a 65°C por 15 minutos.

2.4.2. Cuantificación y Calidad del ADN

Las muestras de ADN fueron cuantificadas en el espectrofotómetro NANODROP-2000. Para calibrar el NANODROP, se usó 2 μ l de TE. A continuación, se añadió 2 μ l de ADN de cada una de las 20 muestras. Finalmente, a partir de las concentraciones de ADN obtenidas, se diluyeron a una concentración final de 25 ng/ μ l que constituye la concentración necesaria para realizar la amplificación de microsatélites. Las diluciones se realizaron con TE estéril y fueron mantenidas a -20°C.

Para la evaluación de la calidad y pureza del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (UltraPure Agarose, Invitrogen, Life Technologies) tomando 4 μ l de ADN y 1 μ l de Blue juice 2X (65% Sucrosa, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8, 0.3% Azul de Bromofenol). Posteriormente se

migró a 100 V, durante 25 minutos. Con esta técnica se visualizó el ADN extraído por tinción con SYBR[®] Gold nucleic acid gel stain. Se mezcló 10 µl del SYBR[®] Gold por cada 100 ml de TBE 1X, se colocó el gel en esta solución y se dejó en agitación durante 25 minutos. La visualización de los ADN se realizó en el transiluminador BioDoc-It[™] System UV.

2.4.3. Condiciones de Amplificación de la PCR

Los iniciadores SSR utilizados en esta investigación fueron seleccionados de la publicación de Enkerli et al (23) (Tabla 2). Para las condiciones de amplificación de los productos SSR se siguió el procedimiento por Maldonado (15) con ciertas modificaciones. Para cada par de iniciadores, se determinó la temperatura de hibridación adecuada; así, los iniciadores fueron evaluados individualmente de acuerdo a la reacción descrita en la Tabla 3, que consistió en una fase de desnaturalización a 94°C durante 7 minutos, 35 ciclos de amplificación y una fase de extensión final de 7 minutos a 72°C. El ciclo de amplificación consistió en una fase de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una fase de hibridación a 50°C por 30 segundos, y una fase de extensión final de 72°C por 30 segundos.

N°.	N°. Accesión	Secuencia 5'3'
1	AY842937 F/R	AGGAAGTCAAATAGAATACGTACCG/ CCTTTTGTGCGCTTGCTTG
2	AY842938 F/R	CAAGTTTACGCATATTGGTTACGATA/TCACCGGCCATC TCATTAGAT
3	AY842939 F/R	GACGGTATATTTATGATCAGCTCG/TCGGGAACTAGACT TTAAGTATCAC
4	AY842940 F/R	CCGTACTIONGGTACATATTCCTGATG/ GGGATGTCCGCATTTCGAA
5	AY842942 F/R	CGACATTTACCGTTGTACATATG/ GGACTGGGAGTTTGGAGCTC
6	AY842943 F/R	AATTATAAACTGAAGAACAGAAA/ GTGTTCCCTAGTGACCTCCTTACT
7	AY842944 F/R	CCCGAGGCCTGTAGTCTACG/ TTTCCTGGAAAGGCAAGAACTT
8	AY842945 F/R	CATGCTCCGCCTTATTCCTC/ GGGTGGCGAAGAAGTAGACG
9	AY842946 F/R	TTTATTGTGGTTGGAGATGCCA/ CATGATAAAAGGTCATGTTTGCC
11	AY842949 F/R	GTCAGTAGCTGCAAATCCTTGAG/AATTAAGGGAGAGA GGCGAAG
12	AY842950 F/R	TTGTTCCATTCGTCTCATCGG/AGTCGGAATCAGAGCC AGAAGTA

Tabla 2 Primers SSR utilizados para caracterizar 20 cepas de *Metarhizium anisopliae* (23) CINCAE, 2012.

Componentes	Concentración del stock	Concentración por reacción	Volumen por reacción
AUP	1X	1X	10.7 µl
Buffer de PCR	10X	1X	2.0 µl
MgCl ₂	50 Mm	2.5 mM	1.0 µl
dNTPs	10 mM	200 µM	0.4 µl
Primers R/F	10 µM	0.2 µM	0.8 µl
Taq polimerasa	5 U/µl	0.5 U	0.1 µl
ADN		5 ng/µl	5.0 µl
Total			20.0 µl

Tabla 3 Componentes de la reacción SSR (23) CINCAE, 2012.

2.4.4. Separación electroforética de los productos de amplificación

La separación de las bandas se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6% y urea 5 M. Para el armado de la cámara se limpió previamente los vidrios con 6 ml de alcohol al 95% y 6 ml de cloroformo. El vidrio repelente se trató con 1.6 ml de Sigmacote y el vidrio adherente se trató con una solución que contenía 2 ml alcohol, 10 μ l Ácido acético y 6 μ l Silane.

Se utilizaron separadores de 0.4 mm de grosor y una peineta de dientes de tiburón del mismo grosor. Se colocaron 90 ml de la solución de poliacrilamida adicionándole 475 μ l de Persulfato de amonio al 10% y 76 μ l de TEMED. Se dejó polimerizar por 30 minutos.

Al producto de amplificación de cada muestra (20 μ l) se le agregó 6 μ l de Buffer de desnaturalización 10X. Se tomó 5 μ l el marcador de peso molecular ladder 30-330pb (Invitrogen) y se colocó 1.5 μ l de Buffer de desnaturalización 10X, ambas mezclas fueron sometidas a 95°C durante 2 minutos.

Una vez armada la cámara se colocó TBE 1X a 50°C como buffer de corrida y se realizó una precorrida durante 10 minutos para que el gel alcance una temperatura entre 40° y 45°C. Al finalizar la precorrida se limpiaron los posillos de restos de urea y acrilamida, y se cargó 6 µl de las muestras previamente desnaturalizadas. La corrida se realizó en el equipo BIORAD modelo Sequi Gen® GT System durante 80 minutos a 80 watts.

2.4.5. Revelado de geles de poliacrilamida

Una vez finalizada la corrida se procedió a desarmar la cámara. Para iniciar el proceso de revelado se separó el vidrio atrayente del vidrio repelente. A continuación se trató el vidrio atrayente, con las siguientes soluciones y tiempos: solución fijadora, 20 minutos; solución de tinción, 30 minutos; agua desionizada fría, 10 segundos; solución de revelado, 5 minutos; y, solución de parada, 5 minutos. Finalmente, se lavó el vidrio con agua durante 1 minuto y se lo dejó secar.

2.4.6. Lectura de geles de poliacrilamida

El vidrio atrayente con el gel, ya revelado, fue colocado en el transiluminador con luz blanca. Con una regla se midió la

migración de las bandas del marcador de peso molecular y las muestras (alelos) desde el posillo donde se colocaban las muestras. Las medidas de migración de cada banda fueron transferidas a un computador donde, mediante una regresión lineal en Microsoft Office Excel, se obtuvo el peso en pares de bases (pb) de cada alelo (28).

El patrón de las bandas de cada muestra y de cada primer, fue interpretado según la presencia o ausencia de bandas, y se dieron prioridad a aquellas que fueron altamente reproducibles y mostraron fuerte intensidad y fácil distinción.

2.4.7. Elaboración del dendograma

Se construyó una matriz de datos, asignando un valor de 1 cuando la banda estaba presente, y 0 cuando estaba ausente. Estos datos fueron empleados para calcular el coeficiente de similitud de Dice (1945), según la fórmula $S_{ij} = 2a/(2a+b+c)$, donde **a** es el número de bandas presentes tanto en *i* como en *j*, **b** es el número de bandas presentes en *i* y ausentes en *j* y **c** es el número de bandas presentes en *j* y ausentes en *i*, entre todos los posibles pares de entradas. Con base en la matriz, se

elaboró un dendograma aplicando mediante el método de la Media Aritmética No Ponderada o Unweighted Pair Group with Arithmetic Averages (UPGMA). Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa NTSYS-pc versión. 2.0 (29).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización morfológica

A los 7 y 15 días después de la siembra de 20 cepas de *M. anisopliae* se efectuaron observaciones para describir las características morfológicas en cuanto al color, forma del borde y diámetro de la colonia (Tabla 4).

Las cepas se ordenaron y agruparon según el tipo de borde. El grupo 1, integrado por las cepas CMa 03 y PL43 presentan un borde circular muy definido, con colores verde pálido y verde grisáceo muy oscuro respectivamente; el grupo 2, constituido por las cepas: CMa 01, CMa 02, CMa 04, CMa 05, CMa 06, CMa 07, CMa10, CMa 11, CMa 12, CMa 13, Dieca, CTC, Yara, CG93-3, CG01-05 y Metazeb poseen un borde circular definido, en el que predomina el color verde grisáceo; el

grupo 3, compuesto por las cepas CMa 08 y CMa 09 presentan un borde circular poco definido, con colores verde grisáceo claro y verde grisáceo muy oscuro respectivamente. Las colonias mostraron un borde circular con varios matices de verde, predominado el color verde grisáceo en las masas de esporas (Figura 7).



Figura 7 Tipos de borde de las colonias de *Metarhizium anisopliae*. CINCAE Diciembre, 2011.

Las diferentes tonalidades de verde observados en las colonias son características de *M. anisopliae*, de acuerdo a lo manifestado por algunos autores (6; 12; 16; 30). Debido a que *M. anisopliae* tiene una variabilidad morfológica en cuanto a tonos de la esporulación que varían entre verde, amarillo y negro verdoso, este parámetro no es un indicador morfológico para diferenciar entre aislamientos de una misma especie.

CEPAS	DESCRIPCIÓN
CMa 01	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con un diámetro de 15 mm a los 7 días y cambiando a verde grisáceo en el centro; alcanza 17 mm de diámetro a los 15 días, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CMa 02	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con un diámetro de 23 mm a los 7 días y cambiando a verde grisáceo en el centro; alcanza 30 mm de diámetro a los 15 días, abundante esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CMa 03	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con un diámetro de 17 mm a los 7 días y cambiando a verde pálido en el centro; alcanza 26 mm de diámetro a los 15 días, de borde circular muy definido. Reverso no pigmentado.
CMa 04	Colonia algodonosa, inicialmente blanca y cambiando a verde grisáceo en el centro, alcanza 18 mm de diámetro a los 15 días, poca esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CMa 05	Colonia pegada al medio, inicialmente amarilla con un diámetro de 17 mm a los 7 días y cambiando a verde grisáceo en el centro; alcanza 34 mm de diámetro a los 15 días, abundante esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CMa 06	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con un diámetro de 20 mm a los 7 días y cambiando a verde grisáceo en los bordes; a los 15 días alcanza 28 mm de diámetro, poca esporulación, de borde definido. Reverso no pigmentado.
CMa 07	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con un diámetro de 17 mm a los 7 días y cambiando a verde grisáceo en el centro; alcanza 19 mm de diámetro a los 15 días, poca esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CMa 08	Colonia algodonosa, inicialmente amarillo claro con un diámetro de 23 mm a los 7 días y cambiando a verde grisáceo en el centro; alcanza 28 mm de diámetro a los 15 días, abundante esporulación, de borde circular poco definido. Reverso no pigmentado.
CMa 09	Colonia algodonosa, inicialmente amarillo claro con un diámetro de 19 mm a los 7 días y cambiando en los bordes a verde grisáceo muy oscuro; alcanza 22 mm de diámetro a los 15 días, poca esporulación, de borde circular poco definido. Reverso no pigmentado.
CMa 10	Colonia algodonosa, inicialmente amarillo claro y cambiando a verde grisáceo en el centro, alcanza 20 mm de diámetro a los 15 días, poca esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.

CMa 11	Colonia algodonosa, blanca y cambiando a verde grisáceo en el centro, alcanza 17 mm de diámetro a los 15 días, poca esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CMa 12	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con tonalidades de amarillo claro presentó un diámetro de 16 mm a los 7 días y cambiando a verde grisáceo en el centro; alcanza 22 mm de diámetro a los 15 días, poca esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CMa 13	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con un diámetro de 19 mm a los 7 días y cambiando en los bordes a verde grisáceo; alcanza 20 mm de diámetro a los 15 días, poca esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
Dieca	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con un diámetro de 13 mm a los 7 días y cambiando en los bordes a verde grisáceo; alcanza 23 mm de diámetro a los 15 días, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CTC	Colonia pegada al medio, inicialmente blanca con tonalidades de amarillo claro presentó un diámetro de 20 mm a los 7 días y cambiando a amarillo en el centro; alcanza 34 mm de diámetro a los 15 días, abundante esporulación, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
Yara	Colonia algodonosa, inicialmente blanca y cambiando a verde grisáceo en el centro, alcanza 15 mm de diámetro a los 15 días, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
CG93-3	Colonia algodonosa, inicialmente amarillo claro con un diámetro de 25 mm a los 7 días y cambiando en los bordes a verde grisáceo muy oscuro; alcanza 44 mm de diámetro a los 15 días, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
PL43	Colonia algodonosa, inicialmente amarillo claro con un diámetro de 24 mm a los 7 días y en los bordes cambiando a verde grisáceo muy oscuro; alcanza 42 mm de diámetro a los 15 días, de borde circular muy definido. Reverso no pigmentado.
CG01-05	Colonia algodonosa, inicialmente blanca con un diámetro de 25 mm a los días y cambiando en los bordes a negro verdoso, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.
Metazeb	Colonia poco algodonosa, inicialmente amarillo claro con un diámetro de 14 mm a los 7 días y cambiando en los bordes a gris verdoso oscuro; alcanza 20 mm de diámetro a los 15 días, de borde circular definido. Reverso no pigmentado.

Tabla 4 Características morfológicas del crecimiento de la colonia de diferentes aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, a los 7 y 15 días de la siembra en medio de cultivo PDA. CINCAE, 2012.

El hongo se caracterizó por presentar conidias cilíndricas, hialinas de extremos redondeados. El tamaño promedio de las conidias de las cepas de *M. anisopliae* fue de 6.0 μm de largo (rango 5.2 μm a 7.5 μm) y de 2.3 μm de ancho (rango 2.0 μm a 3.0 μm) (Tabla 5). La cepa CG01-05, originaria de Guatemala, presentó las conidias más grandes con 7.5 μm de largo y 3.0 μm ancho.

Por otra parte, las cepas nativas que mostraron conidias de mayor tamaño fueron CMa 04 y CMa 06, con 7.0 μm largo y 2.4 μm de ancho; 6.3 μm y 2.9 μm , respectivamente. De acuerdo a estos resultados todos los aislamientos pertenecerían a *M. anisopliae* lo que coincide con lo manifestado por Alves (6) y Cañedo y Ames (12).

Cepas	Longitud (μm)			Ancho (μm)		
	Mínimo	Máximo	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Mínimo	Máximo	$\bar{x} \pm \text{DE}$
CMa01	5	7	5.9 \pm 0.5	2	2	2.0 \pm 0.0
CMa02	5	6	5.7 \pm 0.4	2	3	2.2 \pm 0.4
CMa03	5	7	5.8 \pm 0.6	2	3	2.1 \pm 0.3
CMa04	6	8	7.0 \pm 0.5	2	3	2.4 \pm 0.5
CMa05	5	7	5.9 \pm 0.5	2	3	2.7 \pm 0.5
CMa06	6	7	6.3 \pm 0.5	2	4	2.9 \pm 0.6
CMa07	5	7	5.6 \pm 0.6	2	3	2.2 \pm 0.4
CMa08	5	7	5.8 \pm 0.6	2	3	2.1 \pm 0.3
CMa09	5	7	5.5 \pm 0.6	2	3	2.0 \pm 0.2
CMa10	5	6	5.2 \pm 0.4	2	3	2.1 \pm 0.3
CMa11	5	7	5.9 \pm 0.4	2	3	2.3 \pm 0.5
CMa12	5	7	5.9 \pm 0.4	1	3	2.1 \pm 0.4
CMa13	5	6	5.7 \pm 0.5	2	3	2.0 \pm 0.2
Dieca	5	8	6.2 \pm 0.6	2	4	3.0 \pm 0.5
CTC	5	7	6.1 \pm 0.7	2	3	2.3 \pm 0.4
Yara	5	7	6.4 \pm 0.6	2	3	2.5 \pm 0.5
CG93-3	5	7	5.9 \pm 0.5	2	3	2.4 \pm 0.5
PL43	5	6	5.7 \pm 0.5	2	3	2.2 \pm 0.5
CG01-05	6	9	7.5 \pm 0.7	3	4	3.0 \pm 0.2
Metazeb	5	6	5.8 \pm 0.5	2	3	2.2 \pm 0.4
Promedio	5.2	7.0	6.0 \pm 0.5	2.0	3.1	2.3 \pm 0.3

Tabla 5 Dimensiones del tamaño de conidias (μm) de 20 cepas de *Metarhizium anisopliae*. CINCAE, 2012.

3.2. Caracterización biológica

3.2.1. Grado de esporulación

El análisis estadístico de estos datos, mostró que todas las cepas fueron estadísticamente iguales entre sí a los 30 días después de la inoculación (DDI). Solo la cepa CMa 05 mostró la esporulación más baja, con 1.07×10^9 conidias/g, siendo estadísticamente diferente al resto de las cepas. La cepa CMa

03 y Metazeb obtuvieron las concentraciones mas altas con 4.86×10^9 conidias/g y 3.96×10^9 conidias/g, respectivamente, las cuales fueron estadísticamente iguales entre sí.

A los 5 días DDI, la concentración de conidias fue baja siendo todas las cepas estadísticamente iguales. Sin embargo, a partir de los 10 DDI el 65% de las cepas presentaron una esporulación mayor a 1.50×10^9 conidias/g, siendo las más altas en las cepas CMa 09, Metazeb, CTC, Yara, CMa 13 y CMa 12, con 5.32×10^9 , 5.25×10^9 , 4.07×10^9 , 3.69×10^9 , 3.69×10^9 y 3.57×10^9 conidias/g, respectivamente, las cuales fueron estadísticamente iguales entre sí. A los 15 DDI, solo las cepas CMa 13, CMa 01, CMa 03 obtuvieron concentraciones superiores a 3.50×10^9 conidias/g.

A los 20 DDI, ocurrió un pico en la esporulación de las cepas CMa 03, CMa 12, Metazeb y CMa 13 con concentraciones superiores a 6.00×10^9 conidias/g, siendo estadísticamente iguales entre sí. La cepa CMa 03 obtuvo la concentración más alta con 9.44×10^9 conidias/g. A los 25 DDI solo las cepas CMa 03 y Metazeb presentaron concentraciones superiores a 4.00×10^9 conidias/g. Finalmente a los 30 DDI, solo la cepa CMa 03

alcanzó una concentración de 7.00×10^9 conidias/g. Durante todas las evaluaciones la cepa CMa 10 mantuvo una concentración baja, menor a 1.00×10^9 conidias/g.

En la Figura 8, se observa la separación de las cepas en dos grupos. El uno que agrupa a las cepas CMa 03, Metazeb, CMa13, CMa 09, CTC, CMa 01, CMa 12, CMa 07 con alto grado de esporulación (mayor a 2.50×10^9 conidias/g); y el otro grupo integrado por las cepas CMa 02, Yara, CMa 08, Dieca, CMa 11, CMa 06, CG93-3, CMa 05, CG01-05, CMa 04, CMa 10, PL43 con bajo grado de esporulación (menor a 2.50×10^9 conidias/g).

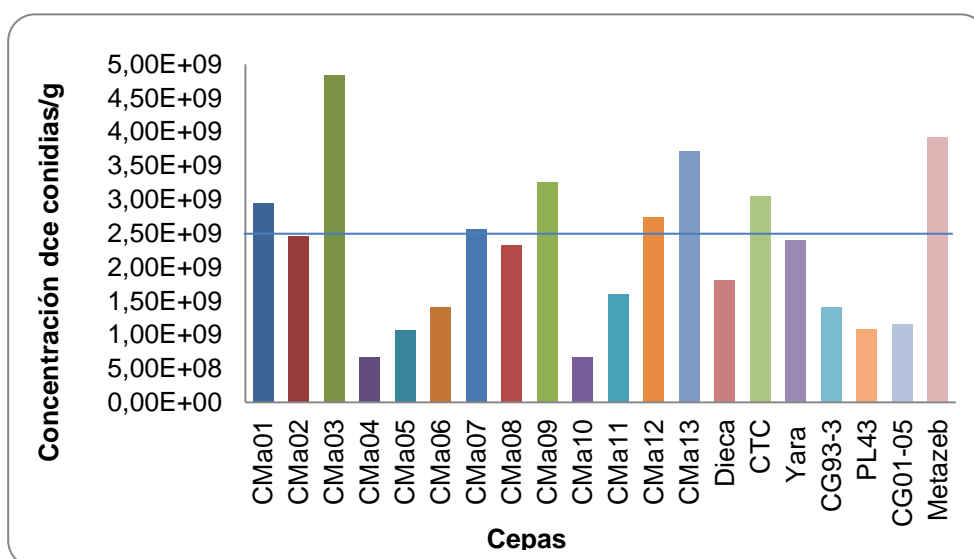


Figura 8 Promedio de esporulación de 20 cepas de *Metarhizium anisopliae* a los 30 días después de la inoculación. CINCAE, 2012

La esporulación de todas las cepas fue estadísticamente igual a partir de los 10 DDI, obteniéndose la mayor concentración de conidias en las cepas CMa 03, CMa 12, Metazeb y CMa 13 a los 20 DDI. Estos resultados indican que el hongo alcanza su máxima esporulación en este periodo. Sin embargo, Barajas et al (31) manifiestan que a los 12 días de incubación el aislamiento Ma-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, proveniente de México, logró un rendimiento superior a 10^9 conidias/g de arroz colonizado por el hongo. A partir de ese momento se alcanzó la fase meseta de la curva microbiológica, en que los valores obtenidos fueron estadísticamente similares. Este aislamiento se desarrolló a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad relativa de $70 \pm 5\%$ y con fotoperiodo natural en el laboratorio.

En otros estudios se ha sugerido un periodo de hasta 21 días para obtener la mayor producción de conidios en procesos de producción masiva con hongos entomopatógenos. Respecto a esto Arana (32), expresa que la cosecha de conidias de *M. anisopliae* debe realizarse a los 18 después de la inoculación en arroz precocido. Según Vélez et al., 2000 citados por Echeverría (14), la producción de esporas a nivel de laboratorio depende del sustrato de crecimiento. Es posible que tanto las

interacciones nutritivas del sustrato como el propio estado de desarrollo del hongo en estudio influyan en el grado de esporulación. Adicionalmente, en la Tabla 6, se pueden observar los coeficientes de determinación para cada una de las cepas de *M. anisopliae*. Solo el 45% de las cepas mostraron un coeficiente de determinación superior al 0.8, por lo que no es confiable para analizar la esporulación de las cepas.

Cepas	Regresión	R ²
CMa01	$y = -0.0014x^2 + 0.0636x + 8.867$	0.77
CMa02	$y = -0.0009x^2 + 0.0533x + 8.774$	0.89
CMa03	$y = -0.0018x^2 + 0.091x + 8.695$	0.85
CMa04	$y = -0.0025x^2 + 0.109x + 7.812$	0.95
CMa05	$y = -0.019x^2 + 0.8082x + 1.286$	0.83
CMa06	$y = -0.0021x^2 + 0.0892x + 8.352$	0.86
CMa07	$y = -0.0184x^2 + 0.797x + 1.631$	0.81
CMa08	$y = -0.0009x^2 + 0.0398x + 8.99$	0.44
CMa09	$y = -0.0019x^2 + 0.0783x + 8.792$	0.45
CMa10	$y = -0.0012x^2 + 0.0342x + 8.631$	0.46
CMa11	$y = -0.0023x^2 + 0.0819x + 8.609$	0.84
CMa12	$y = -0.0017x^2 + 0.055x + 9.07$	0.22
CMa13	$y = -0.0026x^2 + 0.106x + 8.658$	0.81
Dieca	$y = -0.001x^2 + 0.0406x + 8.869$	0.21
CTC	$y = 4E-05x^2 - 0,0054x + 9,578$	0.08
Yara	$y = -0.0015x^2 + 0.0432x + 9.152$	0.31
CG93-3	$y = -0.0026x^2 + 0.1044x + 8.242$	0.90
PL43	$y = -0.0023x^2 + 0.099x + 8.072$	0.69
CG01-05	$y = -0.0007x^2 + 0.0387x + 8.606$	0.66
Metazeb	$y = -0.0014x^2 + 0.0554x + 9.112$	0.36

Tabla 6 Ecuaciones de regresiones y coeficiente de determinación para el grado de esporulación de 20 cepas de *Metarhizium anisopliae*. CINCAE, 2012.

3.2.2. Evaluación del crecimiento radial

El crecimiento de las colonias en las cajas Petri fue de forma expansiva y homogénea alrededor del disco inoculado. La línea de regresión obtenida con los valores de crecimiento radial de cada una de las cepas, muestra que existe una relación lineal positiva entre el crecimiento radial y el tiempo de crecimiento, iniciando un aumento evidente a partir de los 3 DDI. El crecimiento radial de las cepas de *M. anisopliae* tiene un coeficiente de determinación del 0.99; es decir, que mas del 95% de la variación del crecimiento radial se atribuye a su asociación lineal con el tiempo de crecimiento, por lo que es confiable para analizar el crecimiento de las colonias (Anexo 2).

A los 15 DDI las colonias de *M. anisopliae* obtuvieron rangos de crecimiento de 22.0 mm a 61.0 mm. Las cepas que obtuvieron el mayor crecimiento radial fueron CMa 10 y CMa 08 con 61.0 mm y 53.3 mm, respectivamente. La cepa CMa 10 mostró el crecimiento más rápido a partir de los 3 DDI.

La mayoría de cepas de origen nativo obtuvieron un crecimiento radial superior a 40.0 mm de diámetro, excepto CMa 02, CMa 07 y CMa 03. Del grupo de cepas extranjeras solo PL43 mostró un crecimiento mayor a 40.0 mm de diámetro. La cepa CG01-05

proveniente de Guatemala presentó el menor crecimiento radial con 22.0 mm de diámetro.

Las colonias de *M. anisopliae* se incubaron a $26.6 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$ y $82.2 \pm 7.2\%$ HR. Esta temperatura es similar a la reportada por Mustafa y Gurvinder (33), indicando que el crecimiento radial de los aislamientos de *M. anisopliae* fue mejor a 28°C , pero disminuyó considerablemente cuando la temperatura aumento a 34°C . Sin embargo Toriello et al (34), manifiestan que las temperaturas óptimas para el crecimiento de los aislamientos de *M. anisopliae* provenientes México fueron 25°C y 30°C .

3.2.3. Evaluación de la resistencia de las conidias de *Metarhizum* a la exposicion a los rayos UV

Se pudo observar la disminución drástica de la germinación de las conidias cuando se exponen a la luz ultravioleta. Antes de la exposición (0 segundos), las cepas presentaron un porcentaje de germinación mayor al 85% y no se encontraron diferencias significativas entre ellas, por lo tanto fueron consideradas de buena calidad biológica. A partir de los 30 segundos de exposición se observaron diferencias altamente significativas en

la interacción entre cepas y el tiempo de exposición a la luz UV ($p < 0.05$) (Tabla 7).

Cepas	Tiempo (segundos)				
	0	30	60	90	120
CMa01	95.0 a	84.1 a-e	74.0 ab	51.0 a	20.0 a
CMa02	93.7 a	91.4 ab	91.4 ab	17.0 a-d	14.0 ab
CMa03	94.0 a	88.4 ab	65.7 bc	39.0 a-c	13.4 ab
CMa04	86.9 a	57.6 b-e	7.7 e	7.0 bc	1.3 bc
CMa05	90.0 a	87.0 a-d	78.8 ab	34.3 a-d	3.7 a-c
CMa06	94.3 a	91.4 a	63.0 bc	5.3 cd	1.0 bc
CMa07	93.3 a	76.8 a-e	17.4 e	1.7 d	0.7 bc
CMa08	95.3 a	91.5 ab	70.0 bc	9.3 a-d	1.3 bc
CMa09	94.0 a	71.8 a-e	9.0 e	3.0 cd	0.0 c
CMa10	88.1 a	72.8 a-e	21.0 de	6.9 a-d	1.0 bc
CMa11	96.8 a	80.7 a-e	56.2 bc	9.9 a-d	0.7 bc
CMa12	86.7 a	52.3 c-e	9.7 e	1.7 d	0.0 c
CMa13	95.7 a	92.5 a	55.9 bc	5.9 cd	2.6 bc
Dieca	89.4 a	50.9 de	16.3 e	4.7 cd	2.0 bc
CTC	97.3 a	93.5 a	71.0 a-c	23.0 a-d	11.4 ab
Yara	91.7 a	87.4 a-c	57.3 bc	50.2 ab	11.0 ab
CG93-3	96.0 a	93.7 a	71.4 a-c	9.0 a-d	5.0 a-c
PL43	95.0 a	93.0 a	64.3 bc	20.0 a-d	0.7 bc
CG01-05	84.9 a	48.1 e	12.8 e	4.4 cd	0.7 bc
Metazeb	88.8 a	80.4 a-e	45.7 cd	6.5 a-d	2.0 bc

Tabla 7 Promedios de germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae* a diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta. CINCAE, 2012.

A los 30 segundos de exposición, las cepas CMa02, CMa06, CMa 08, CMa 13, CTC, CG93-3 y PL43 mostraron una germinación mayor al 90%; mientras que, en el resto de cepas la germinación disminuyó entre 6.3% a 51.9%, siendo la cepa CG01-05 la más afectada en este tratamiento con solo 48.1% de conidias germinadas (Figura 9).

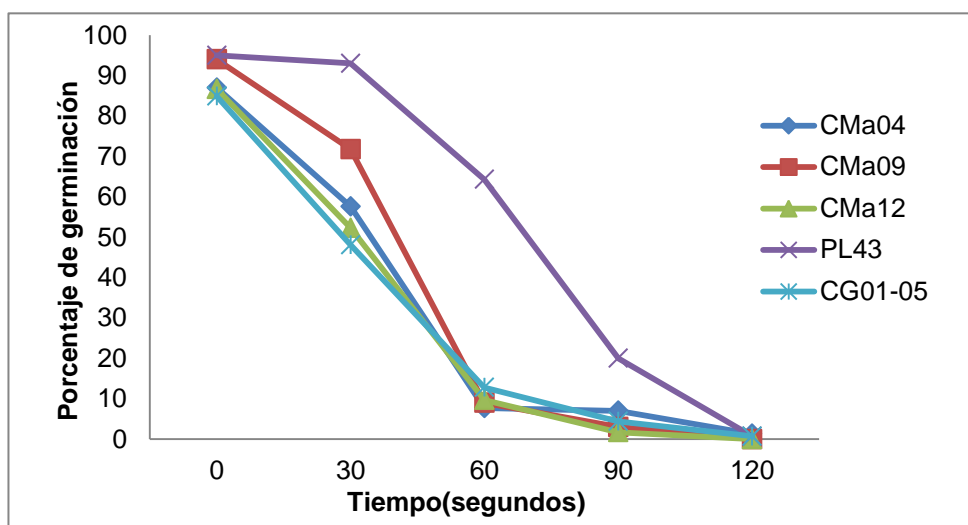


Figura 9 Promedios de germinación de conidias que presentaron las cepas de *Metarhizium anisopliae* más susceptibles a la exposición de luz ultravioleta. CINCAE, 2012

A los 60 segundos de exposición, las cepas CMa01, CMa03, CMa 05, CMa 06, CMa 08, CMa 13, CTC, Yara, CG93-3 y PL43 mostraron cierta tolerancia a la irradiación, con porcentajes de germinación mayores al 50%. Solo la cepa CMa02 mantuvo un porcentaje de germinación mayor al 90%. Por otra parte, las cepas CMa 04, CMa 09 y CMa 12 tuvieron un porcentaje menor al 10% de germinación.

A los 90 segundos de exposición solo las cepas CMa 01 y Yara mantuvieron un porcentaje de germinación mayor al 50%; mientras que, en el resto de las cepas continuó disminuyendo.

A los 120 segundos de exposición a la luz ultravioleta casi todas las cepas presentaron una germinación menor al 6%. Solo las

cepas CMa 01, CMa 02, CMa 03, CTC y Yara, presentaron porcentajes de germinación superiores al 10%, siendo estadísticamente iguales entre sí. La cepa CMa 01 fue la que mostró mayor tolerancia a la exposición de luz ultravioleta con 20% germinación (Figura 10).

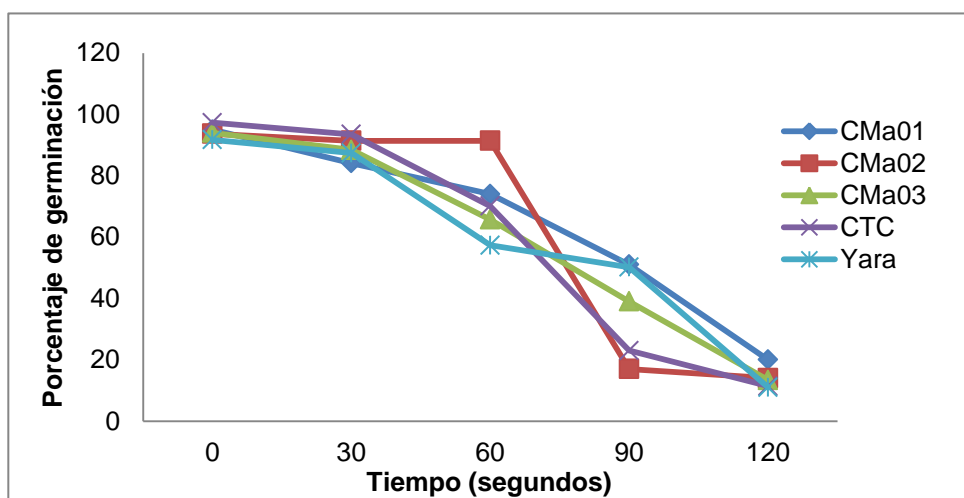


Figura 10 Promedios de germinación de conidias que presentaron las cepas de *Metarhizium anisopliae* más tolerantes a la exposición de luz ultravioleta. CINCAE, 2012.

De manera general, las conidias de *M. anisopliae* se mostraron susceptibles a la exposición de luz UV, siendo afectado progresivamente el porcentaje de germinación en la medida que aumentaba el tiempo de exposición a este factor. Estos resultados concuerdan con lo señalado por Mustafa y Gurvinder (33), quienes al evaluar los efectos de la radiación UV-B en aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* encontraron que los aislamientos de *B. bassiana* fueron más tolerantes que *M.*

anisopliae. Por otra parte Fargues et al (35), observaron que los aislamientos de *M. flavoviride* fueron más resistentes a la radiación UV-B seguidos por *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Las conidias de *P. fumosoroseus* fueron las más susceptibles.

La fotoinactivación es uno de los factores ambientales que más afecta a la persistencia y por tanto a la eficacia de los hongos entomopatógenos (36). Los efectos de la radiación UV demostraron ser nocivos ya que inactivaron completamente las conidias de *M. anisopliae* a los 120 segundos de exposición, causando daños en el ADN nuclear Krutmann 2001 citado por Grijalbab et al (37) provocando muerte y retraso en la germinación de las conidias sobrevivientes. En adición hubo una variabilidad intraespecie, indicando que la selección de cepas tolerantes a la radiación de la luz UV es importante en el desarrollo de agentes de control microbiales. El incremento a la persistencia en un ambiente de alta luminosidad, es necesario para que los hongos entomopatógenos tengan un mejor desempeño cuando se aplican en campo. Por lo tanto, la selección de dichas cepas debe tomar un enfoque ecológico que tenga en cuenta las características del entorno en el que será utilizado.

3.2.4. Evaluación de la patogenicidad

El hongo *M. anisopliae* demostró ser patogénico a *P. saccharicida*. Los adultos infectados por el hongo murieron adquiriendo una consistencia dura; después el cuerpo se tornó blanquecino debido al crecimiento de micelio; y, a partir del tercer día se observó esporulación sobre los adultos muertos.

De acuerdo al análisis estadístico hubo diferencias altamente significativas entre las cepas ($p < 0.05$), todas fueron estadísticamente diferentes al testigo. No hubo mortalidad por *M. anisopliae* en el testigo. Según la prueba de Tukey las mejores cepas fueron CMa01, CMa 03 y CMa11 con 73.0%, 71.3% y 68.0% de mortalidad, respectivamente, siendo a su vez estadísticamente iguales entre sí. El resto de cepas se ubicaron en rangos de 66.8% hasta 15.3%, siendo la cepa CMa05 la que mostró el menor porcentaje de mortalidad (Figura 11).

A pesar de que todas las cepas de *M. anisopliae* resultaron ser patogénicas para los adultos de *P. saccharicida*, se observaron diferencias en los porcentajes de mortalidad. Las cepas más virulentas fueron CMa 01, CMa 03, y CMa 11, de procedencia

nativa, las dos primeras aisladas de *M. andigena* y la última de *D. saccharalis*.

A su vez, estas cepas presentaron la mejor esporulación sobre el cuerpo de los insectos infectados. Estos resultados discrepan con lo reportado por Rodríguez et al (38), quienes manifiestan que las diferencias obtenidas en la patogenicidad pueden ser explicadas por el origen de los aislamientos; es decir, si la cepa es aislada de un hospedero y esta es usada para control biológico de dicho hospedero, será más virulenta que una cepa proveniente de un hospedero diferente.

Sin embargo Badilla et al (39) manifiestan que los aislamientos ECUSC-0192 de *M. anisopliae* y 447 de *B. bassiana*, aislados de *Perkinsiella saccharicida* y *Solenopsis invicta*, respectivamente, fueron patogénicas, siendo esta última la más virulenta sobre *P. saccharicida*.

En la prueba efectuada por Mendoza et al (40) encontraron que las cepas Yara, CMa 01 y CMa 08 de *M. anisopliae*, fueron las más patogénicas sobre *P. saccharicida* con 88.0%, 77.6% y

69.1% de mortalidad, siendo Yara la más virulenta aislada de *A. postica*.

Alves (6) y Mena et al (41) manifiestan que la patogenicidad es una característica genética de un microorganismo, que lo lleva a penetrar en un insecto y causar la enfermedad; en tanto que, la virulencia es el grado de patogenicidad de los aislamientos hacia un hospedero específico.

Así, para una misma especie de hongo puede haber diversas cepas o aislamientos con distintos grados de virulencia, cuando son aplicados en las mismas dosis y condiciones ambientales. Según Butt y Goettle (36) la virulencia es una de las características más importantes en la selección de cepas para un programa de control biológico.

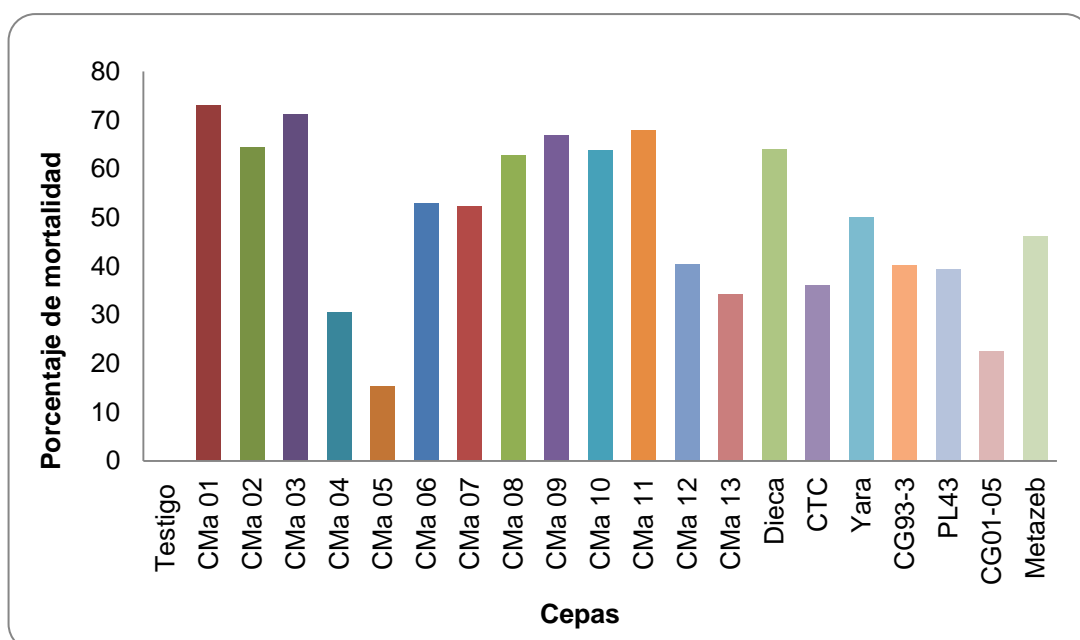


Figura 11 Promedios de mortalidad de adultos de *Perkinsiella saccharicida* tratados con 20 cepas de *Metarhizium anisopliae*. CINCAE, 2012.

3.3. Caracterización molecular

3.3.1. Cuantificación y Calidad del ADN

Para la extracción de ADN de *M. anisopliae* se utilizó el protocolo de Cennis (27) con ciertas modificaciones. Aproximadamente 200 mg de micelio, fue óptimo para la extracción de ADN. La concentración de ADN obtenida comprendió rangos de 194.2 ng/μl hasta 8797.8 ng/μl. Sin embargo, este mismo investigador obtuvo concentraciones de ADN fúngico con rangos de 150 hasta 300 ng. Se obtuvieron concentraciones superiores debido a que se utilizó más micelio de lo reportado por este investigador. Posteriormente se

procedió a preparar una solución stock de 100 ng/μl de las muestras de ADN. A partir de este stock se obtuvo una dilución de 25 ng/μl de ADN requerida en la concentración final de la reacción de PCR.

Para verificar una óptima calidad del ADN se corrieron las muestras en gel de agarosa al 1.5% teñidos con SYBRR® Gold nucleic acid gel stain. Los resultados mostraron un ADN de alta calidad; que se verifico con la presencia de bandas definidas en la parte superior del gel con ausencia de smear que indicaría problemas de degradación (Figura 12).

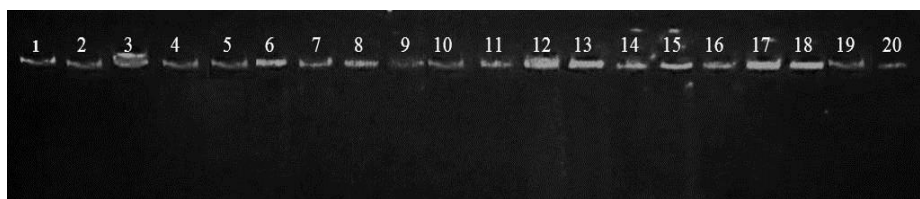


Figura 12 Análisis electroforético de la calidad de ADN visualizado en gel de agarosa al 1.5% teñido en SYBRR® Gold Nucleic Acid gel Stain de 20 muestras de ADN de cepas de *Metarhizium anisopliae*. CINCAE Enero, 2013.

3.3.2. Separación electroforética de los productos de amplificación

Se evaluaron un total de 11 primers de los cuales se seleccionaron 8 que permitieron obtener mayor información de polimorfismo en las 20 cepas. Sus resultados generaron 36

alelos. El número promedio de alelos por locus fue de 4.5. El tamaño de los alelos estuvo aproximadamente entre 42 y 330 pb (Anexo 3). Estos valores son similares a los obtenidos por Enkerli et al (23) en poblaciones de *M. anisopliae* colectadas en Suiza. La Figura 13, muestra un ejemplo de los perfiles SSR obtenidos con el primer AY842949; se destacan 5 alelos, el más pequeño aproximadamente de 68 pb, y el más grande de 100 pb.

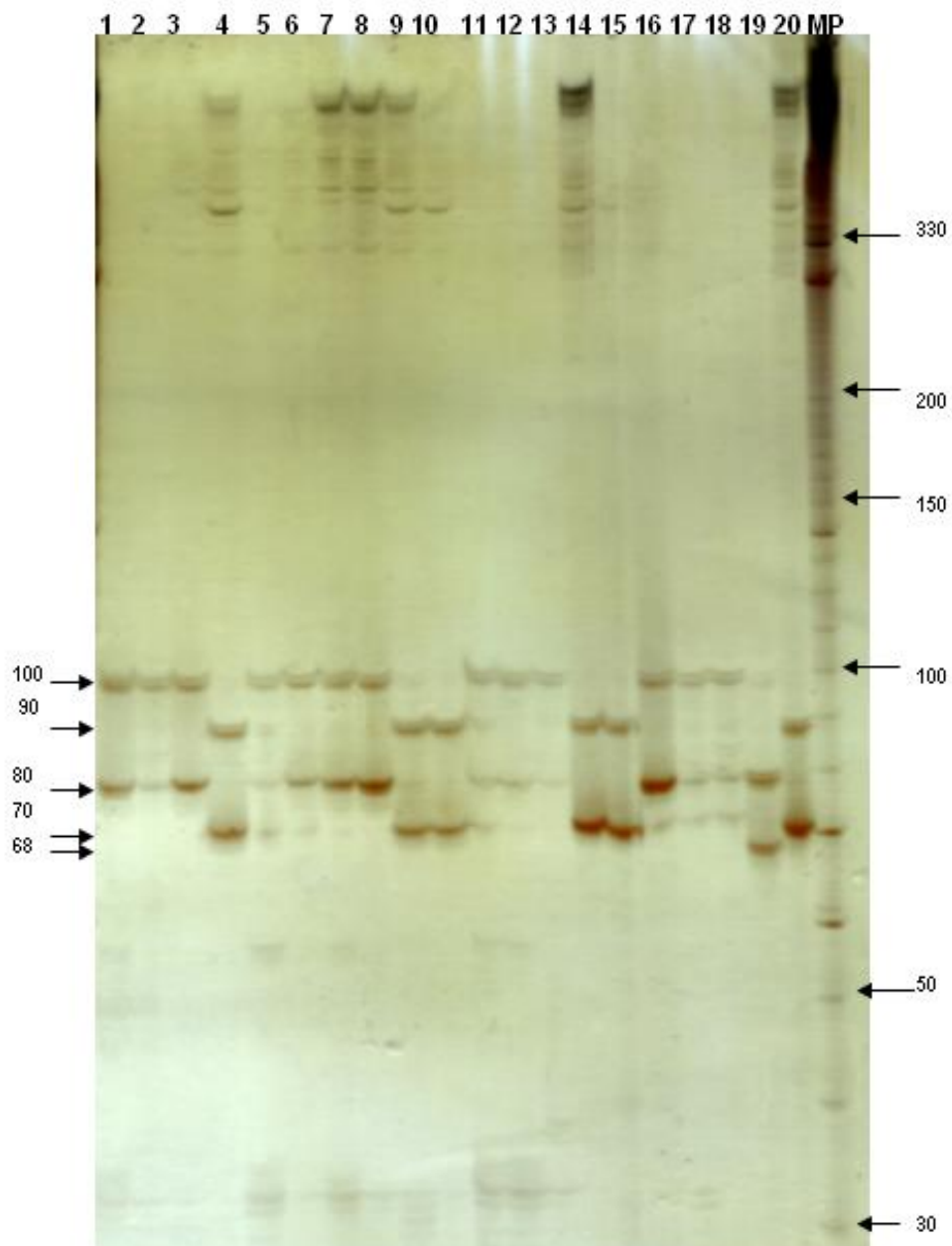


Figura 13 Gel de poliacrilamida que muestra los resultados con el primer AY842949 en el análisis de 20 cepas de *Metarhizium anisopliae*. MP contiene el marcador de peso molecular para referencia. La col 1 presenta el patrón de la cepa CMa 01, col 2: CMa 02, col 3: CMa 03, col 4: CMa 04, col 5: CMa 05, col 6: CMa 06, col 7: CMa 07, col 8: CMa 08, col 9: CMa 09, col 10: CMa 10, col 11: CMa 11, col 12: CMa 12, col 13: CMa 13, col 14: Dieca, col 15: CTC, col 16: CG93-3, col 17: PL 43, col 18: CG01-05, col 19: Metazeb, col 20: Yara.

3.3.3. Tipificación

Las diferencias encontradas en el dendograma, permitieron diferenciar las cepas y clasificarlas dentro de dos grupos con un coeficiente de similitud de 0.6, es decir, con un 60% de similitud lo que indicaría una variabilidad genética no muy alta. Sin embargo, Becerra et al (22) indicaron que el análisis con SSR detectó 45.2% de similitud, mostrando una alta diversidad genética entre los aislamientos chilenos de *M. anisopliae*. Otros estudios realizados por Maldonado (15), mostraron que 26 cepas de *M. anisopliae* provenientes de CENGICAÑA, Costa Rica y USA tuvieron un 80% de similitud, indicando que la mayoría de las cepas se mantienen distantes genéticamente. La cepa Metazeb presentó la mayor variabilidad genética con un coeficiente de similitud de 0.44, esta no se agrupó respecto al resto de las cepas analizadas.

El grupo I comprendió las cepas: CMa 01, CMa 02, CMa 03, CMa 05, CMa 06, CMa 07, CMa 08, CG93-3, PL43, CMa 11 y CMa 13, las cuales presentaron un coeficiente de similitud genética de 0.60. El grupo II comprendió las cepas: CMa 04, Dieca, Yara, CTC CMa 09, CMa 10 y CMa 12 las cuales formaron un conglomerado con un coeficiente de similitud de

0.64, siendo este último grupo el que presento una mayor variabilidad genética comparadas con las cepas del primer grupo (Figura 14).

En el grupo I se encontraron cuatro subgrupos de cepas muy similares genéticamente entre ellas están S1: CMa1 y CMa 02, S2: CMa 05 y CMa 06, S3: CMa 07 y CMa 08, S4: PL3 y CG 01-05. Estas cepas tienen una tendencia de agrupación genética de acuerdo a su origen geográfico, es posible que esto se deba a la proximidad geográfica con que las cepas fueron recolectas para su posterior aislamiento. En su mayoría son nativas provenientes de las cercanías del cantón El Triunfo, provincia del Guayas. Además, estos subgrupos tienen una relación de agrupación por hospedero; S1: *Mahanarva andigena*, S2 y S3: *Perkinsiella saccharicida* y S4: *Aeneolamia postica*. Estos resultados no concuerdan con los investigados por Becerra et al (22) quienes concluyen que los estudios con *Metarhizium* muestran una débil asociación entre el rango de hospederos y el genotipo del aislamiento.

Los subgrupos S1 y S2 son duplicados, es decir, que son genéticamente iguales, corresponden a las cepas CMa1 y CMa

02, CMa 05 y CMa 06 respectivamente, con 1.0 de coeficiente de similitud.

En el grupo II se encontraron dos subgrupos compuesto por S5: Yara y Dieca y S6: CMa 09 y CMa 10, las cuales no mostraron una tendencia clara de agrupación. La cepa CMa 12 tuvo un coeficiente de similitud de 0.64, siendo la de mayor variabilidad genética dentro de este grupo.

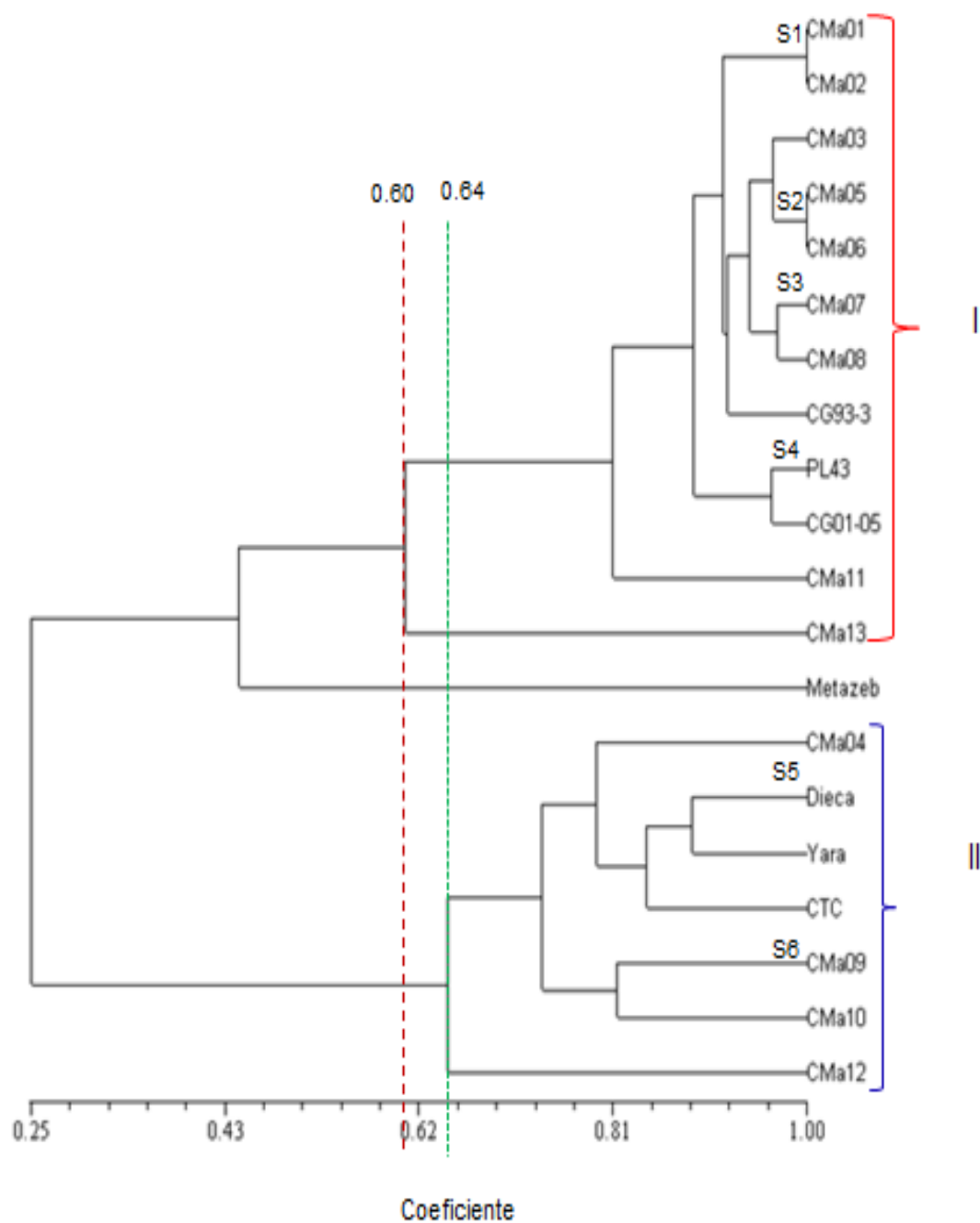


Figura 14 Dendrograma que muestra la similitud genética de 20 cepas de *Metarhizium anisopliae*, de acuerdo con la información obtenida por medio de marcadores moleculares microsatélites, según el índice de DICE. CINCAE Abril, 2013.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las cepas de *M. anisopliae* se destacaron por tener colonias circulares, en su mayoría con bordes definidos, predominando el color verde grisáceo en las masas de esporas.

El tamaño promedio de las conidias fue de 6.0 μm de largo por 2.3 μm de ancho, todas las cepas correspondieron a *M. anisopliae*.

La esporulación de todas las cepas fue estadísticamente igual a partir de los 10 DDI, obteniéndose la mayor concentración de conidias en las cepas CMa 03, CMa 12, Metazeb y CMa 13 a los 20 DDI.

Las colonias de *M. anisopliae* tuvieron un promedio de crecimiento radial en un rango desde 22.0 mm hasta 61.0 mm de diámetro. Las cepas que tuvieron el mayor crecimiento radial fueron la CMa 08 y CMa 10.

Las cepas más tolerantes después de 120 segundos de exposición a la luz ultravioleta fueron la CMa 01, CMa 02, CMa 03, CTC y Yara.

Todas las cepas de *M. anisopliae* fueron patogénicas sobre *P. saccharicida*, siendo las más virulentas las cepas CMa 01, CMa 03 y CMa 11; aisladas de diferentes hospederos.

Se estandarizó el protocolo de extracción de ADN a partir de micelio de *M. anisopliae* para el análisis de microsatélites.

Se obtuvo un protocolo de tipificación por microsatélites específico de *M. anisopliae*.

Se construyó un dendograma que permite diferenciar dos grupos con un coeficiente de similitud del 0.6.

Los SSR permitieron identificar dos duplicados de la colección de cepas del CINCAE que corresponden al S1 y S2. Estos duplicados genéticos tienen un comportamiento morfológico muy similar en resistencia a la exposición de los rayos UV.

Existe una tendencia de agrupación genética entre los subgrupos del grupo I de acuerdo a la ubicación geográfica y aislamiento del hospedero, salvo ciertas excepciones.

Recomendaciones:

Se recomienda realizar futuras investigaciones con el grupo I que reúne a las cepas que resultaron con mejores características biológicas para usar en el control biológico de *P. saccharicida*.

Realizar mayor cantidad de repeticiones para evaluar la resistencia a la luz ultravioleta de las conidias en laboratorio.

Evaluar la producción de esporas y el crecimiento radial luego de las irradiaciones a la luz UV.

Evaluar en campo las cepas más virulentas y resistentes a la luz ultravioleta con respecto a su establecimiento o permanencia identificando el patrón molecular de la cepa.

ANEXOS

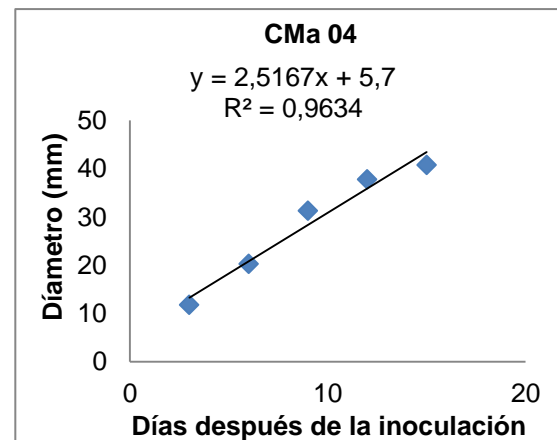
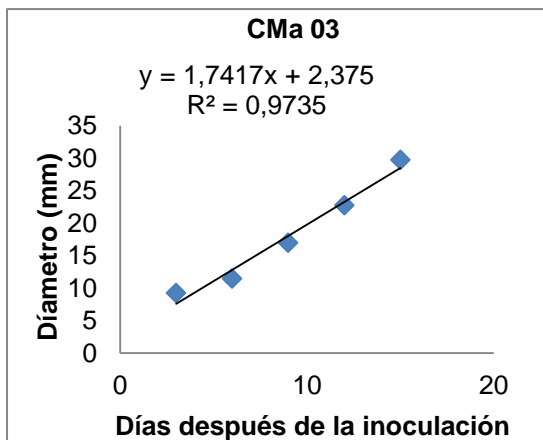
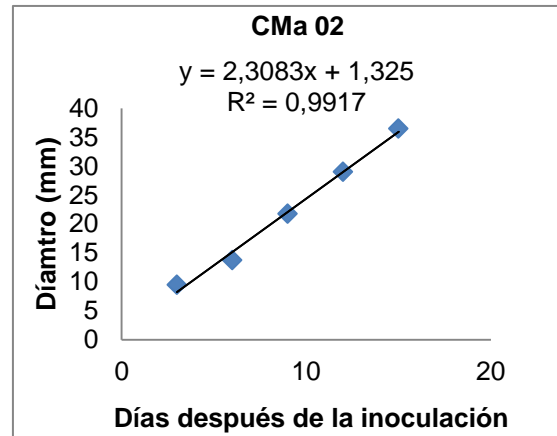
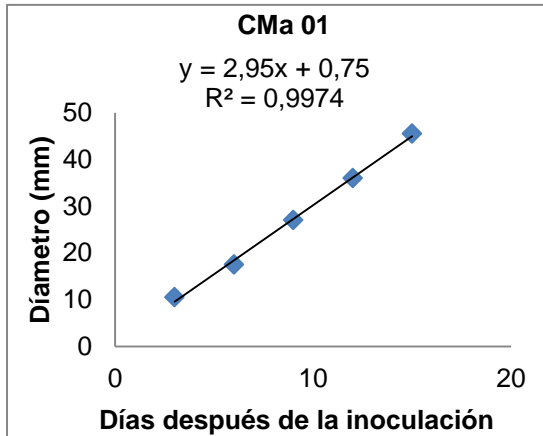
**ANEXO 1. MEDIO DE CULTIVO COMPLETO PARA EL
CRECIMIENTO DE MICELIO DE *Metarhizium anisopliae*.**

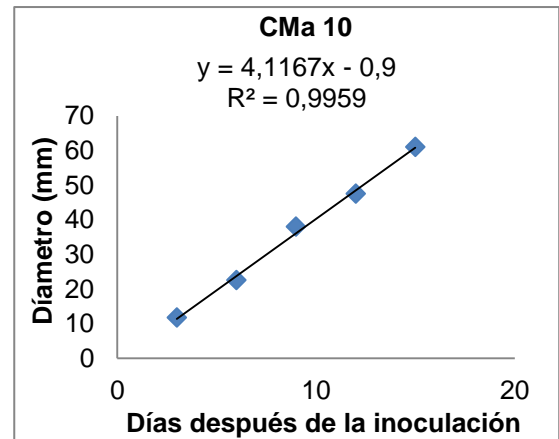
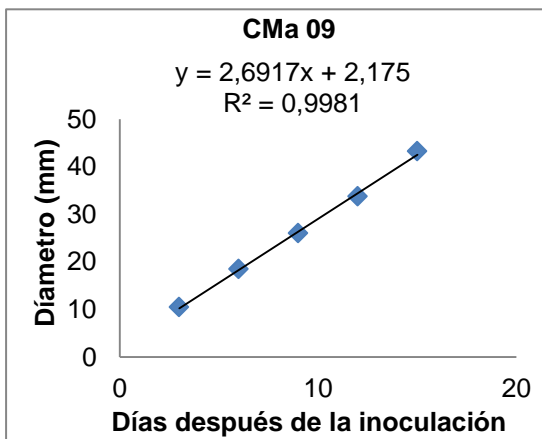
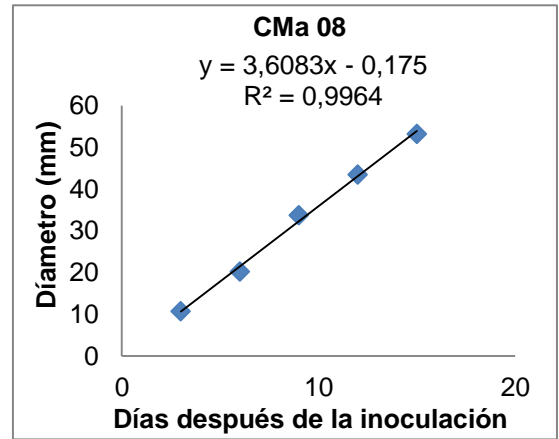
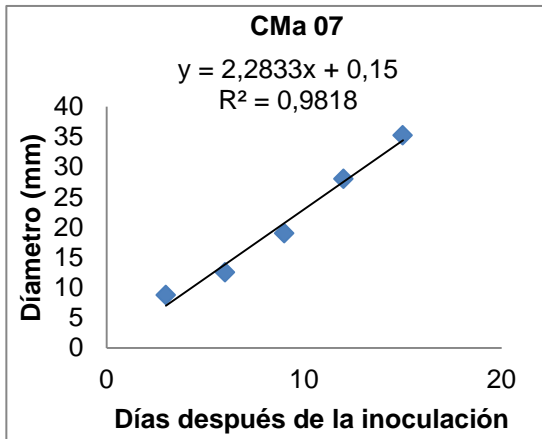
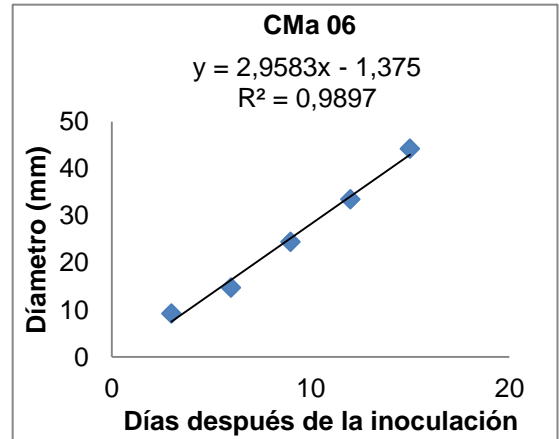
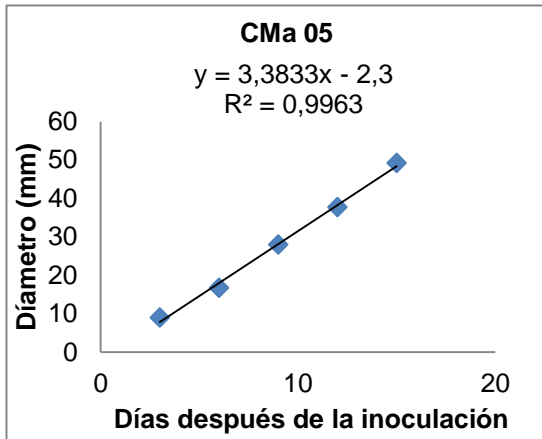
Mezclar con calor:

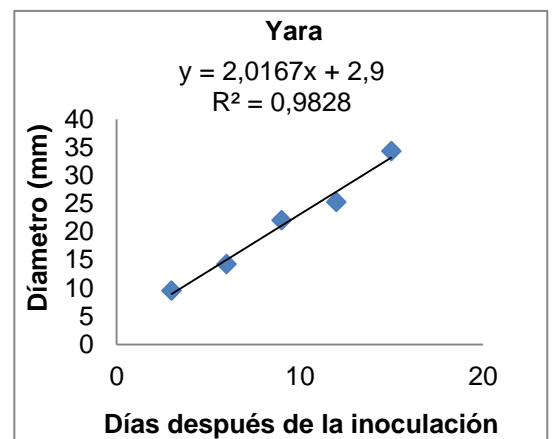
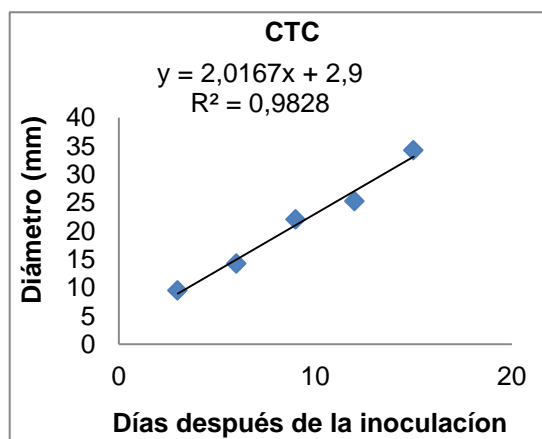
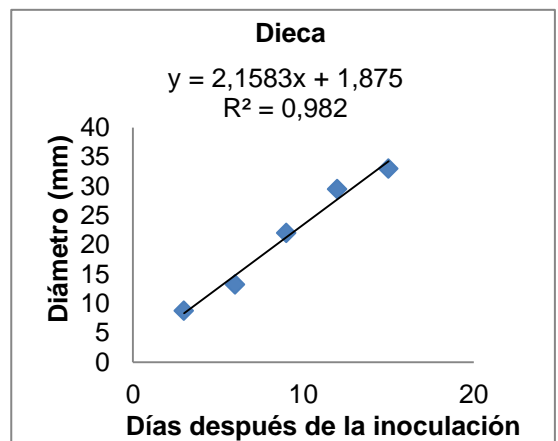
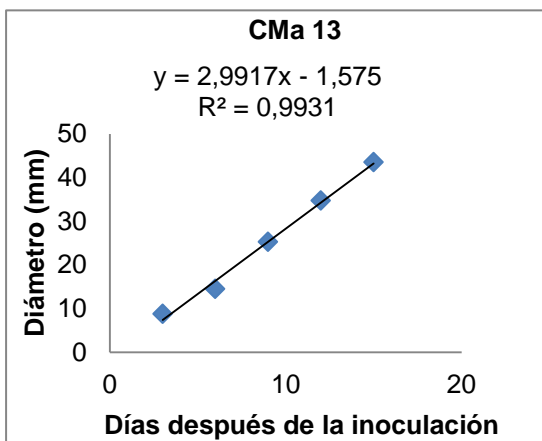
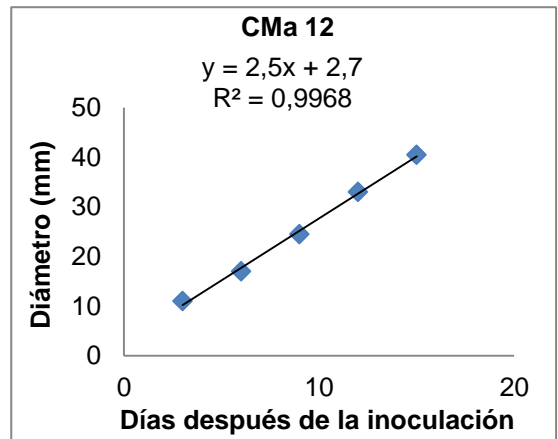
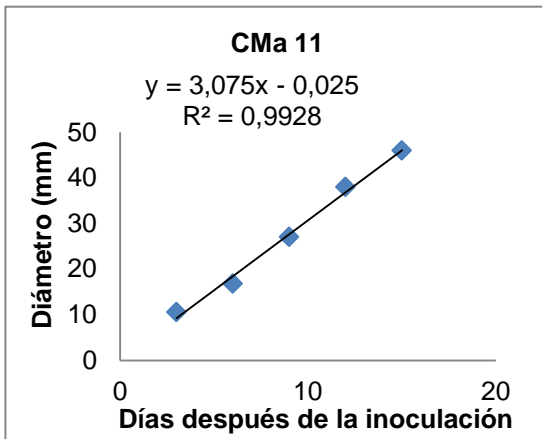
Reactivo	Gramos
KH ₂ PO ₄	0.36
Na ₂ HPO ₄	1.6
KCl	1
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.6
NH ₄ NO ₃	0.7
Extracto de levadura	5
Glucosa	10

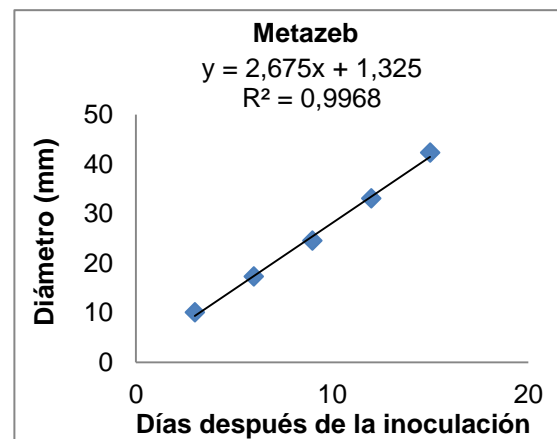
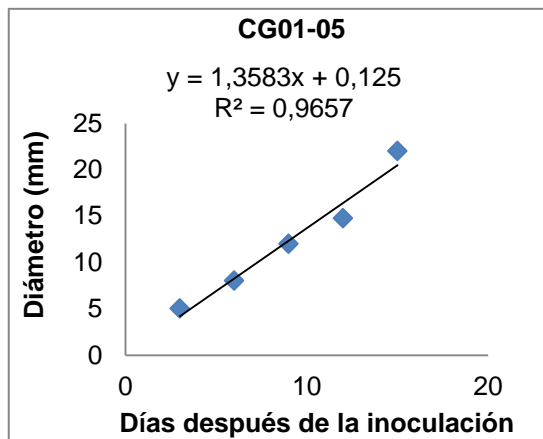
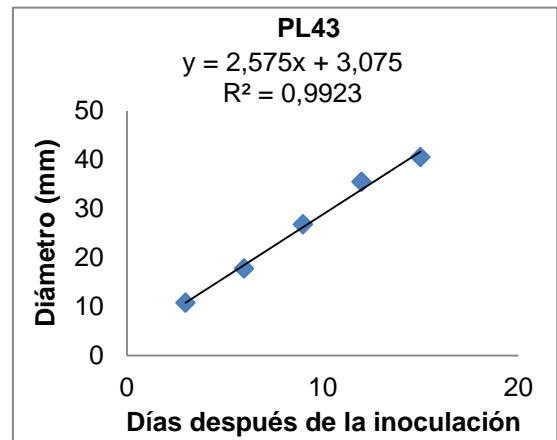
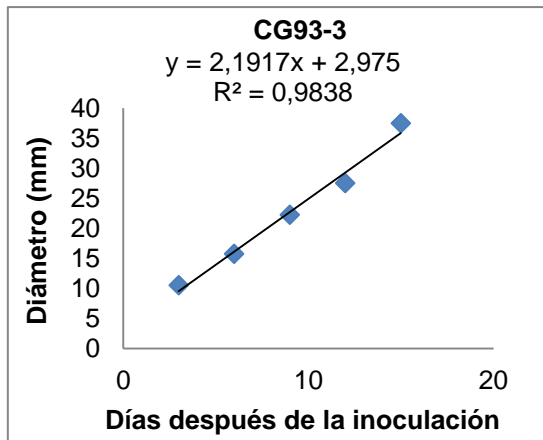
Aforar a un litro con Agua destilada estéril.

**ANEXO 2. GRAFICAS DE REGRESIONES LINEALES DEL
CRECIMIENTO RADIAL DE 20 CEPAS DE *Metarhizium*
anisopliae.**









ANEXO 3. MATRIZ DE DATOS DE LOS ALELOS SSR DE 20 CEPAS DE *Metarhizium anisopliae*.

Nº Accesiones	Código de primer	AY842937					AY842938					AY842939			AY842944				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5
	Nº alelos	190	170	90	80	74	123	100	70	60	56	80	72	69	93	70	60	43	42
1	CMa 01	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
2	CMa 02	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
3	CMa 03	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
4	CMa 04	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1
5	CMa 05	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
6	CMa 06	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
7	CMa 07	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
8	CMa 08	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
9	CMa 09	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	CMa 10	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
11	CMa 11	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
12	CMa 12	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	CMa 13	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
14	Dieca	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
15	CTC	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	CG93-3	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
17	PL43	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
18	CG01-05	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
19	Metazeb	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
20	Yara	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0

Nº Accesiones	Código de primer	AY842945					AY842946			AY842949					AY842950				
	Nº alelos	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	Nº pares de bases	190	180	122	87	80	150	116	100	100	90	80	70	72	330	240	220	174	140
1	CMa 01	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
2	CMa 02	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
3	CMa 03	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
4	CMa 04	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
5	CMa 05	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
6	CMa 06	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
7	CMa 07	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
8	CMa 08	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
9	CMa 09	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
10	CMa 10	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
11	CMa 11	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
12	CMa 12	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
13	CMa 13	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	Dieca	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1
15	CTC	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
16	CG93-3	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
17	PL43	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
18	CG01-05	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
19	Metazeb	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
20	Yara	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1

BIBLIOGRAFÍA

1. **MENDOZA J., GUALLE D., Y GÓMEZ P.** *Guía para el conocimiento y manejo de insectos plaga y roedores de la caña de azúcar en el Ecuador.* El Triunfo-Ecuador : Publicacion Tecnica No. 2, 2013. págs 33.
2. **RISCO, S.** *Notas adicionales sobre el "Saltahoja" de la Caña de azúcar Perkinsiella saccharicida Kirk.* Perú : s.n., 1966. Vol. 9. págs: 195-199.
3. **FLORES, R.** *"Biología y Dinámica poblacional de Perkinsiella saccharicida Kirkaldy (Homoptera:Delphacidae) en caña de azúcar"*. Milagro : Tesis de grado para obtener el Título de Ing. Agr., 2003. págs 90.
4. **MENDOZA J., FLORES R., Y GUALLE D.** *El Saltahojas de la caña de azúcar, Perkinsiella saccharicida.* El Triunfo : s.n., 2004.
5. **MENDOZA J., MARTÍNEZ I., Y AYORA A.** *Determinación del efecto de varias densidades poblacionales de Perkinsiella saccharicida sobre la producción y calidad de la caña de azúcar.* Guayaquil : C. Buenaventura, 2001. págs:17-21..

6. **ALVES, S.** *Controle microbiano de insetos*. Brazil : Piracicaba, 1998. págs 289-743.

7. **BHARADWAJ A., Y STAFFORD K.** Evaluation of *Metarhizium anisopliae* Strain F52 (Hypocreales:Clavicipitaceae) for Control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *PubMed*. [En línea] Septiembre de 2010. [Citado el: 10 de 12 de 2012.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20939382>.

8. **BAZÁN, M.** *Efecto de Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina:Hyphomycetes) en el control biológico de Boophilus microplus Canestrini (Acari:Ixodidae) en ganado bovino estabulado*". México : Tesis para obtener el título de Msc. en Cin. Univ.de Col., 2002.

9. **SCHOLTE E., KNOLS B., SAMSON R., Y TAKKEN W.** *Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review*. Austrial : Journal of insect Science, 2004. págs 24.

10. **MONZON, A.** *Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua*. Costa Rica : Manejo Integrado de plagas, 2001. págs: 95-103.

11. **MENDOZA, J.** *Guía para el reconocimiento y manejo de insectos plagas y roedores de la caña azúcar en el Ecuador.* El Triunfo : Publicacion técnica, 2004. págs 34.

12. **CAÑEDO V., Y AMES T.** *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos.* Perú : s.n., 2004. págs 62.

13. **BUSTILLO P., OBANDO B., MATABANCHOY S., Y CASTRO V.** *Uso del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin.* Colombia : CENICAÑA, 2011. págs 12.

14. **ECHVERRÍA, F.** *"Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin".* Costa Rica : Tesis para obtener el Título de Bachiller en Ing. Bio., 2006. págs 92.

15. **MALDONADO, A.** *Caracterización de cepas del hongo *Metrahizium anisopliae* Metschnikoff y determinación de su presencia en el suelo, a través de marcadores moleculares.* Guatemala : Proyecto Fodecyt 006-2006, 2009. págs 68.

16. **ROMERO M., ESTRADA M., CASTAÑEDA R., Y LUJÁN M.,.** *Caracterización morfológica y patogénica de Metarhizium anisopliae (metsch.) Sorokin.* Cuba : s.n., 1997. págs 17-25.

17. **ENTZ, S.** *Molecular methods and isolates of the entomopathogenic fungus metarhizium anisopliae for environmentally sustainable control of grasshoppers in Canada.* Canada : Thesis for de degre of Msc. of Sci. Univ. of Leg., 2005. págs 141.

18. **MUELLER U., Y WOLFENBARGER L.** *AFLP genotyping and fingerprinting.* USA : s.n., 1999. págs: 389-349.

19. **FERREIRA, M. y GRATTAPAGLIA, D.** *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético, Primera Edición, Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, p: 37-62. s.l.: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. págs:37-62.*

20. **MAHESWARAN, M.** *Molecular markers:History, Features, and Applications.* India : Tamil Nadu Agricultural University, 2004. págs:17-24.

21. **AYRA L., CABRERA I., GOMEZ M., Y HERNANDEZ D.** *Empleo de marcadores bioquímicos y de ADN en la caracterización molecular de hongos*

entomopatógenos. Cuba : Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. págs 18.

22. **BECERRA V., PAREDES M., ROJO C., ANDRÉS F., Y FRANCO J.** *Intraespecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSSR and ITS markers*. Chile : Genetics and Molecular Biology, 2007. págs:89-90.

23. **ENKERLI J., ROLAND K., SIEGFRIED K., Y FRANCO W.** *Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae**. Switzerland : Molecular Ecology notes, 2005. págs:384-386.

24. **OULEVEY C., WIDMER F., KÖLLIKER R., Y ENKERLI J.,.** *An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales*. Switzerland : Mycological Research, 2009. págs:1016-1024.

25. **VELEZ P., ESTRADA M., GONZALES M., VALDERRAMA A., Y BUSTILLO A.** *Caracterización de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café*. Costa Rica : Manejo Integrado de Plagas, 2001. págs 39.

26. **GÓMEZ P., Y MENDOZA J.** *Guía para la producción de Metarhizium anisopliae*. El Triunfo : FIADE/PROMSA, 2004. págs 11.
27. **CENNIS, J.** *Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification*. Spain : Nucleid Acids Research, 1992.
28. **NIETO, D.** *Evaluación preliminar de la diversidad genética del leoncillo Callithrix*. Quito : Tesis para obtener el título de Ing. en Pro. Bio., 2009. págs:24-28.
29. **PEREZ de la TORRE M., ZIRILLI P., SETTEN, L., ULRICH, N., ESCADÓN A.** *Caracterización molecular en el género Mecardonia Ruiz & Pav. (Plantaginaceae) utilizando marcadores ISSR*. Argentina : Revista de Facultad Agronomica, 2010. págs:23-30.
30. **GUERRERO J., CARRILLO R., Y AGULERA A.** *Caracterización morfológica y geminación de cepas del hongo entomopatógeno Metarhizium anisopliae var anisopliae, asociado a larvas de escarabaeidos y curculionidos*. Chile : Agro Sur, 1999. págs13.
31. **BARAJAS C., DEL POZO E., GARCÍA I.,Y MÉNDEZ A.** *Obtención de conidios del aislamiento ma-002 de Metarhizium anisopliae (metsch.) Sorokin*

mediante una alternativa de cultivo bifásico. Cuba : Revista de proteccion Vegetal, 2010.

32. **ARANA, E.** *Análisis del proceso de producción del plaguicida biológico *Metarhizium anisopliae**. Guatemala : Tesis para obtener el título de Ing. Qui. Univ. San Car., 2011. págs 170.

33. **MUSTFA U., Y GURVINDER K.** *Radiación UV-B y estrés térmico provoca la respuesta de crecimiento variable de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria Bassiana**. India : s.n., 2009.

34. **TORIELLO C., MONTOYA-SANSÓN E., ZAVALA-RAMÍREZ M., NAVARRO-BARRANCO H., BASILIO-HERNÁNDEZ D., HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ V., Y MIER T.** *Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (*Hemiptera: Cercopidae*)*. Xalapa : Revista mexicana de micología, 2008.

35. **FARGUES J., GOETTEL M., SMITS N., OUEGRAOGO A., VIDAL C., LACEY L., LOMER C., Y ROUGIER M.,.** *Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic *Hyphomycetes**. France : s.n., 1996. págs: 171-181.

36. **BUTT, T Y GOETTLE, M.** *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Israel : Agricultural Research Organization, 2000. págs:141-208.
37. **GRIJALBAB E., LAURA VILLAMIZAR L., Y COTES A.** *Evaluación de la estabilidad de Paecilomyces sp. y Beauveria bassiana*. Colombia : Revista Colombiana de Entomología, 2009. págs:1-6.
38. **RODRIGUEZ M., FRANCE A., Y GERDING M.** *Evaluación de dos cepas del hongo Metarhizium anisopliae var. anisopliae (Metsh.) para el control de larvas de gusano blanco Hylamorpha elegans burm. (Coleoptera: Scarabaeidae)* . Chile : Agric. Téc, 2004.
39. **BADILLA F., JARA W., Y GORDILLO W.** *Control del saltahojas de la caña de azúcar Perkinsiella saccharicida con los hongos Metarhizium anisopliae y Beauveria bassiana en el Ingenio San Carlos* . Costa Rica : Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, 2004. págs:29-34.
40. **MENDOZA J., GUALLE D., Y GÓMEZ P.** *Informe Cuatrimestral de Actividades Enero-Abril*. El Triunfo : CINCAE, 2011. págs 11.
41. **MENA J., PEÑA A., Y GONZÁLEZ R.** *CL50 y variación de la patogenicidad en aislamientos de Beauveria bassiana y Metarhizium*

anisopliae evaluados en poblaciones de *Premnotypes vorax*. Colombia :
Rev. Corpoica, 2003. págs: 49-54.