

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Diversidad genética de una colección de hongos entomopatógenos mediante marcadores moleculares AFLP

Armando Nicolás Bastidas Torres

Tesis de grado presentada como requisito para la
Obtención del título de B. S. en Biotecnología

Quito

Febrero 2010

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Diversidad genética de una colección de hongos entomopatógenos
mediante marcadores moleculares AFLP**

Armando Nicolás Bastidas Torres

Venancio Arahana, **Ph.D.**

Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, **Ph.D.**

Miembro del Comité de Tesis

Carlos Ruales, **M. Sc.**

Miembro del Comité de Tesis

Decanato de Ciencias Biológicas y Ambientales

Stella de la Torre, **Ph.D.**

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, Febrero 2010

DERECHOS DE AUTOR
©Derechos de autor
Armando Nicolás Bastidas Torres
2010

DEDICATORIA

A mis padres y hermanas
por su incondicional apoyo
durante toda mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por haber hecho posible la realización de este proyecto, a Pedro González por haberme guiado técnicamente durante importantes etapas de este estudio y a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ por su compañía a lo largo de este trabajo. Especialmente a mis padres por ser mi modelo durante todos estos años.

RESUMEN

La diversidad genética de 42 aislamientos de hongos entomopatógenos facilitados por INIAP fue determinada por medio de marcadores AFLP, obteniéndose índices de similitud genética menores a 0.50, y un total de 121 bandas 100% polimórficas. El dendrograma generado usando el coeficiente de similitud genética de Jaccard exhibe doce grupos, siete de los cuales están agrupados por género. De los siete grupos anteriores, cinco están agrupados por el hospedador del cual provinieron. El análisis de Bootstrap muestra 12 relaciones filogenéticas fiables con valores superiores al 70% de confianza. El Análisis de Coordenadas Principales produjo seis agrupaciones, cuatro de las cuales se correlacionan por géneros. Los resultados sugieren la existencia de una considerable diversidad genética en la colección de hongos entomopatógenos del INIAP, y un agrupamiento relacionado con el hospedador. No se hallaron regiones genómicas comunes que agrupen a los aislamientos por su nivel de entopatogenicidad. La elevada diversidad genética presente en la colección de hongos estudiada constituye una fuente potencial de adaptabilidad de estos organismos a condiciones agroecológicas diversas, y una fuente potencial de fenotipos con potente efecto bioinsecticida.

ABSTRACT

The genetic diversity of 42 entopathogenic fungi strains were determined using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. We obtained genetic similarity indexes lower than 0.50 and 121 bands that showed 100% of polymorphism. The dendrogram built using Jaccard genetic coefficient shows twelve groups, seven of them clustered by genera. From these seven groups, five of them are clustered by the host from which they were isolated. The Bootstrap analysis shows twelve trustworthy phylogenetic relations with values higher than 70% of confidence. The Principal Coordinate Analysis produced six clusters; four of them are associated by genera. The results suggest the existence of a considerable genetic diversity among the INIAP entopathogenic fungi collection, and a clustering tendency related by the host from which they were isolated. We did not find common genomic regions among virulent entopathogenic fungi strains. The high genetic diversity found among this entomopathogenic fungi collection represents a potential source of adaptation within the analyzed strains to diverse agroecologic environments, and also a potential source of phenotypes with potent bioinsecticide activity.

TABLA DE CONTENIDOS

Derechos de Autor	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	v
Abstract	vi
1. Introducción	1
1.1. Control biológico de plagas.....	1
1.1.1. Hongos Entomopatógenos.....	2
1.1.1.1. El género entomopatógeno <i>Beauveria</i>	3
1.1.1.2. El género entomopatógenos <i>Metarhizium</i>	4
1.1.1.3. <i>Verticillium lecanii</i>	6
1.2. Marcadores Genéticos.....	6
1.2.1. Marcadores Moleculares AFLP.....	8
1.2.2. Investigación en hongos entomopatógenos mediante marcadores genéticos.....	9
1.3. Investigación de Hongos Entomopatógenos en el Ecuador.....	10
2. Objetivo General	13
3. Objetivos Específicos	13
4. Justificación	13
5. Área de estudio	14
6. Materiales y Métodos	15
6.1. Materiales.....	15
6.1.1. Material Biológico.....	15
6.1.1.1 Subcultivo de aislamientos fúngicos.....	15
6.1.2. Extracción de DNA fúngico.....	15
6.1.2.1. Cuantificación de DNA.....	16
6.1.3. Amplificación con kit AFLP® Analysis System 1, Invitrogen™.....	16
6.1.3.1. Restricción y Ligación.....	16
6.1.3.2. Preamplificación.....	16
6.1.3.3. Amplificación Selectiva.....	17
6.1.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	17
6.1.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	17
6.1.6. Tinción con Plata (Halima Benbouza, et. al.).....	18
6.1.1.1. Solución fijadora y de Parada.....	18
6.1.1.2. Solución de Plata.....	18
6.1.1.3. Solución Reveladora.....	18
6.1.7. Análisis de datos.....	18
6.2. Metodología.....	19
6.2.1. Cultivo de hongos entomopatógenos.....	19
6.2.1.2 Códigos de aislamientos de hongos entomopatógenos.....	19
6.2.2. Extracción de DNA fúngico.....	20
6.2.2.1. Cuantificación de DNA.....	21
6.2.3. Análisis de DNA fúngico mediante la técnica AFLP.....	22
6.2.3.1. Restricción y Ligación.....	22
6.2.3.2. Preamplificación.....	23
6.2.3.3. Screening de primers selectivos.....	23
6.2.3.4. Doble Preamplificación.....	24

6.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	25
6.2.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	26
6.2.6. Tinción con plata.....	27
6.2.7. Análisis de datos.....	27
7. Resultados.....	28
7.1. Extracción y cuantificación de DNA.....	28
7.2. Restricción y Ligación.....	29
7.3. Preamplificación.....	30
7.4. Screening de primers.....	30
7.5. Doble Preamplificación.....	31
7.6. Determinación de diversidad genética.....	31
7.7. Análisis de Bootstrap.....	36
7.8. Análisis de coordenadas principales.....	37
7.9. Marcadores de patogenicidad y marcadores característicos de aislamientos.....	38
8. Discusión.....	39
9. Conclusiones.....	47
10. Recomendaciones.....	47
11. Bibliografía.....	49
12. Tablas.....	53
13. Figuras.....	67
14. Anexos.....	68

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

12. Tablas.....	53
Tabla 1. Aislamientos de <i>Beauveria spp.</i> , <i>Metarhizium spp.</i> , <i>Verticillium spp.</i> , y otros empleados en el estudio de diversidad genética mediante marcadores AFLP...	53
Tabla 2. Composición del medio de cultivo de hongos PDA (Potato Dextrose Agar)	54
Tabla 3. Proceso de tinción con nitrato de plata (Benbouza H., 2006).....	55
Tabla 4. Concentraciones de DNA de hongos entomopatógenos obtenidas mediante el uso de un fluorómetro Qubit™ (Invitrogen).....	56
Tabla 5. Tabla de similitud entre genotipos de los aislamientos entomopatógenos analizados (23 – 26).....	57
Tabla 6. Tabla de similitud entre genotipos de los aislamientos entomopatógenos analizados (28 – BJHL).....	58
Tabla 7. Tabla de similitud entre genotipos de los aislamientos entomopatógenos analizados (SAL B4 – 13).....	59
Tabla 8. Tabla de similitud entre genotipos de los aislamientos entomopatógenos analizados (14 – 60).....	60
Tabla 9. Tabla de similitud entre genotipos de los aislamientos entomopatógenos analizados (38 – 43).....	60
Tabla 10. Tabla de similitud entre genotipos de los aislamientos entomopatógenos analizados (32 y HC).....	60
13. Figuras.....	61
Figura 1. Gel de agarosa 1.5% donde se observan varios DNAs extraídos de diferentes muestras de micelio de hongos entomopatógenos.....	61
Figura 2. Gel de agarosa 1.5% donde se observa los productos de la digestión de DNAs fúngicos con las enzimas de restricción <i>Eco R 1</i> y <i>Mse 1</i>	61
Figura 3. Gel de agarosa 1.5% donde se observa los productos de la ligación del DNA fúngico previamente digerido, con adaptadores específicos.....	62
Figura 4. Gel de agarosa al 1.5% en donde se observa productos de preamplificación de DNAs fúngicos.....	62
Figura 5. Amplificación selectiva con 5 combinaciones distintas de primers en un mismo set de muestras visualizada en gel de poliacrilamida al 6%.....	63
Figura 6. Preamplificación doble con la combinación de primers (EA/MC) visualizada en gel de poliacrilamida al 6%.....	64
Figura 7. Dendrograma generado mediante el software NTSYSpc 2.11 con el uso de primers de preamplificación (EA/MC) en donde se observan las relaciones filogenéticas más probables entre los aislamientos que conformaron la colección estudiada.....	65
Figura 8. Análisis de Bootstrap generado mediante el software Winboot con el uso de primers de preamplificación (EA/MC) en donde se observan las relaciones filogenéticas más probables entre los aislamientos de la población estudiada y sus respectivos valores de confiabilidad.....	66
Figura 9. Análisis de coordenadas principales generado mediante el software NTSYSpc 2.11 con el uso de primers de preamplificación (EA/MC) en donde se observan 6 agrupaciones diferentes de hongos entomopatógenos.....	67
14. Anexos.....	68
Anexo 1. Tabla de datos binarios obtenida con la combinación de primers de preamplificación (EA/MC).....	68

1. Introducción:

1.1. Control Biológico de Plagas

El control biológico clásico puede definirse como la introducción inoculativa de un agente vivo previamente no presente en un determinado lugar para mitigar el efecto de una plaga. En aquellos casos donde esto representa una nueva asociación entre un agente de control biológico efectivo y una peste, es denominado control biológico neoclásico (Lomer et al., 2001). También existen otras estrategias de control biológico como la aumentación inoculativa, que consiste en la aplicación de un agente nativo del lugar que tenga capacidad como controlador biológico de la plaga de interés, para promover un aumento de su población *in-situ*; así como también la aumentación inundativa, que se refiere a la aplicación masiva de un agente con el objetivo primario de inducir una elevada muerte inicial de la plaga (Lomer et al., 2001).

En lo que respecta específicamente a plagas de insectos, el control biológico puede definirse como el empleo de “controladores biológicos”, entre los que se incluyen: parásitos, agentes patógenos y/o predadores para mantener el equilibrio de poblaciones, así como también reducir y/o mitigar el efecto deletéreo de plagas (Torres et al., 1993). Una de las fortalezas de este método de control frente a estrategias químicas, es que su efecto tiende a ser permanente y su acción puede ejercerse sobre grandes extensiones agrícolas, además de no dejar residuos tóxicos sobre las plantas ni contaminar el ambiente (De Bach, 1964). Uno de los grupos de organismos más aceptados como controladores biológicos de plagas de artrópodos son los hongos entomopatógenos.

1.1.1. Hongos Entomopatógenos

La expresión hongo entomopatógeno hace referencia a aquellos hongos que pueden actuar como parásitos de insectos, matándolos o provocándoles serios daños. Generalmente, la infección de tales hospedadores comienza con la adhesión de conidios (forma asexual esporulada del hongo) en la superficie del exoesqueleto. Si se presentan condiciones de temperatura y humedad adecuadas (elevada humedad), dichas esporas germinan, crecen en forma de hifas y colonizan la cutícula del insecto; eventualmente las hifas viajan a través del insecto y alcanzan la cavidad corporal (hemocele) del mismo (Zimmermann, 2007). Posteriormente, las células del hongo proliferan en el hemocele del hospedador, usualmente en forma de hifas con pared celular o de protoplastos carentes de pared celular en algunas especies. Usualmente, luego de cierto tiempo el insecto muere (a veces por acción de toxinas), y nuevas esporas se forman dentro y fuera del insecto si las condiciones ambientales son permisivas (Zimmermann, 2007).

Los hongos entomopatógenos no conforman un grupo monofilético, sino que incluyen taxones de varios grupos del reino Fungi. Muchos de ellos pertenecen al grupo Hypocreales de los Ascomycetos: las fases asexuales *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Hirsutella*, así como el estado sexual *Cordyceps* son algunos ejemplos. Otros representantes como *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Pandora*, *Entomophaga*, pertenecen al orden Entomophthorales de los Zygomycetos (Lomer et al., 2001).

Debido a que estos organismos se consideran ambientalmente seguros, existe interés global en el empleo y manipulación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas de insectos y otros artrópodos. Particularmente, las fases asexuales de varios Ascomicetos (*Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* y otros) se encuentran bajo intenso estudio por sus favorables características para ser usadas como bioinsecticidas (Lomer et al., 2001).

Se ha señalado que el relativo éxito que se obtenga aplicando hongos entomopatógenos como agentes controladores de plagas, dependerá en gran medida del conocimiento de epizootiología, de la selección del patógeno, del método de producción del inóculo infectivo, de la adecuada formulación del patógeno y de su oportuna aplicación en los sitios de interés (Dorta & Arcas, 2003).

1.1.1.1. Género Entomopatógeno *Beauveria*

Uno de los géneros más estudiados dentro del grupo de hongos entomopatógenos es *Beauveria*. Éste es un género cosmopolita de hifomicetos haploides transmitidos desde el suelo, cuya importancia radica en que parasita a más de 200 especies de insectos de distintos órdenes y produce metabolitos biológicamente activos, de manera que varias de sus especies constituyen potenciales controladores biológicos de plagas (Rehner & Buckley, 2005). Las especies dentro de este género son mohos blancos que forman conidios unicelulares blancos típicamente hidrofóbicos y muy pequeños. Dichos conidios son formados holoblásticamente a partir de células conidiógenas infladas basalmente. Luego de producir conidios, la célula conidiógena se alonga produciendo otro conidio que forma un pequeño denticulo. El resultado es la

formación de distintivos conidióforos en zig-zag insertos en el micelio, que dejan cicatrices cuando se desprenden de él. *Beaveria bassiana* es la especie más representativa del género; éste es un hongo de amplia distribución geográfica proveniente del suelo, que parasita varias especies de insectos, causando la enfermedad denominada muscardina blanca. Al ser un hongo entomopatógeno, es utilizado como bioinsecticida para controlar plagas como: áfidos, termitas, saltamontes, trips, moscas blancas, diferentes especies de escarabajo, orugas, ácaros, etc. (Rehner & Buckley, 2005). Debido al amplio rango de artrópodos a los que parasita *B. bassiana* debe ser considerado como un bioinsecticida no selectivo y no debería ser aplicado a flores que son visitadas por insectos polinizadores.

Actualmente se conoce que *Beauveria bassiana* es el anamorfo (forma reproductora asexual) del teleomorfo (forma reproductora sexual) *Cordyceps bassiana*, la cual solamente ha sido colectada en Asia oriental (Li et al, 2001). Algunos estudios han revelado que *B. bassiana* debería considerarse como un conjunto de distintas especies filogenéticas, ya que está constituida por distintos linajes (Rehner & Buckley, 2005).

1.1.1.2. Género Entomopatógeno *Metarhizium*

De igual manera, *Metarhizium* es otro de los géneros representativos dentro del grupo de hongos entomopatógenos. Éste pertenece a la familia Moliniaceae, y se caracteriza por el color de sus esporas, que son blancas al principio pero cambian a un color verde olivo a medida que se desarrollan; tales estructuras se forman al final de los conidióforos y continúan de esta forma hasta formar cadenas de esporas. Durante la

germinación de las esporas se forman uno o dos tubos germinativos, que se desarrollan hasta dar lugar al micelio. En alrededor de una semana, el micelio da lugar a conidióforos que formarán nuevas esporas.

Metarhizium anisopliae es la principal especie del género. Formalmente conocido como *Entomophthora anisopliae*, es un hongo del suelo ampliamente distribuido. Pertenece a la clase de hongos Hyphomycetes, y está categorizado como un hongo causante de murcardina verde, debido al color verde que presentan las colonias esporulantes. Se ha reportado que infecta aproximadamente 200 especies de insectos y otros artrópodos. En mamíferos éste no es infeccioso o tóxico, pero la inhalación de sus esporas puede provocar reacciones alérgicas en individuos sensibles (Cloyd, 2002).

Metarhizium anisopliae generalmente ingresa en los insectos a través de los espiráculos y poros de los órganos sensoriales. Una vez dentro del insecto, el hongo produce una extensión lateral de hifas, las cuales eventualmente proliferan y consumen su contenido interno. El crecimiento de hifas continúa hasta que el insecto se llena de micelios. Cuando el contenido interno ha sido consumido, el hongo rompe la cutícula y esporula, lo cual hace que el insecto tome un aspecto algodonoso (Cloyd, 2002). Esta especie entomopatógena puede liberar esporas (conidios) en condiciones de baja humedad (<50%), y adicionalmente, puede nutrirse de los lípidos de la cutícula. Estos hongos pueden también producir metabolitos secundarios, tales como destruxina, la cual posee propiedades insecticidas sobre polillas y larvas de moscas. *M. anisopliae* es sensible a temperaturas extremas; la viabilidad de las esporas decrece conforme la temperatura de almacenamiento se eleva y la virulencia decrece a bajas temperaturas (Cloyd, 2002).

1.1.1.3. *Verticillium lecanii*

Verticillium lecanii es un hongo entomopatógeno cosmopolita, que constituye el mayor agente biológico de control de moscas blancas y áfidos. Su patogenicidad involucra adhesión de esporas en la cutícula del insecto, su germinación, penetración y colonización interna, culminando en la muerte del hospedador. La elevada humedad es un requisito absoluto para la germinación, el establecimiento de la infección y la esporulación (Zare & Gams; 2008).

A pesar de que es factible caracterizar morfológicamente a géneros como *Beauveria* y *Metarhizium*, la indentificación de especies dentro de cada género resulta difícil a causa de su simplicidad estructural y a la carencia de variaciones fenotípicas distintivas (Rehner & Buckley, 2005). Esta uniformidad fenotípica no necesariamente significa baja diversidad genética, y una manera de determinar cuanta variabilidad genética existe dentro de estos géneros es mediante el uso de marcadores genéticos.

1.2. Marcadores Genéticos

Un marcador genético es cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético, por lo tanto, se lo puede definir como un locus marcador que tiene que presentar polimorfismo. Éstos pueden utilizarse con dos finalidades: señalar el locus que controla la diferencia fenotípica y/o marcar otro locus cercano que controle algún carácter de interés (Nuez et al., 2000). Para que un marcador genético sea considerado bueno, debe cumplir con los siguientes requisitos:

poseer polimorfismo (multialélico), ser codominante, no ser epistático (puede leerse el genotipo a partir del fenotipo independientemente del genotipo de otros loci), ser neutro (sus sustituciones alélicas no producen otros efectos fenotípicos) y ser insensible al medio ambiente (el genotipo se infiere a partir del fenotipo con independencia del ambiente en el que se halle) (Grattapaglia, 2000).

Los marcadores genéticos pueden ser de tres tipos: morfológicos, bioquímicos (isoenzimáticos) y moleculares. Los marcadores genéticos morfológicos son locus marcadores asociados a caracteres morfológicos, o en otras palabras fenotipos de fácil interpretación visual. Los marcadores genéticos bioquímicos o enzimáticos son locus marcadores que codifican isoenzimas, es decir grupos de múltiples formas moleculares de la misma enzima dentro de una especie, las cuales catalizan una reacción bioquímica específica (Grattapaglia, 2000). Finalmente, los marcadores genéticos moleculares son segmentos o porciones de ADN que pueden asociarse a distintas características en un organismo de interés. Estos fragmentos generalmente se visualizan a manera de bandas específicas en una matriz de separación y es factible hacer un seguimiento de ellas a través de generaciones sucesivas (Ramón et al., 2005).

Dentro de los marcadores genéticos moleculares es posible hacer una distinción entre dos tipos: los denominados *arbitrarios* y los *dependientes de secuencias específicas*. Los primeros son aquellos que no requieren información de secuencias genéticas del organismo de interés previamente al análisis, y en este grupo se debe mencionar a los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs), los ISSR (Intersimple sequence repeats), los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), los SAMPL (Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic

Loci) y los SSAP (Sequence Specific Amplified Polymorphism). Los segundos por el contrario son aquellos que requieren primers específicos diseñados a partir de la secuencia total o parcial del segmento de ADN amplificado; entre éstos tenemos a los SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), los CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), los SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism), Los SNP (Single Nucleotide Polymorphism) y los SSR (Single Sequence Repeats) también llamados Microsatélites (Ramón et al., 2005).

1.2.1 Marcadores Moleculares AFLPs

Los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) son un tipo de marcador genético que combina dos técnicas utilizadas para generar marcadores moleculares: la digestión con enzimas de restricción (técnica de RFLPs) y una amplificación mediante PCR tipo RAPD. Esta técnica consiste en producir una población de fragmentos de ADN, mediante la digestión del ADN genómico con una combinación de dos endonucleasas distintas: una de corte raro y otra de corte frecuente. Luego de la restricción, los fragmentos son ligados en sus extremos a dos adaptadores específicos de cada enzima empleada. Posteriormente, utilizando dos primers complementarios a la secuencia de cada uno de los adaptadores, se consigue la amplificación de los fragmentos de ADN digeridos (delimitados por los adaptadores), sin necesidad de tener conocimiento previo de las secuencias del genoma que se desea estudiar (Nuez et al., 2000). Finalmente, utilizando primers a los que se les ha añadido en el extremo 3' una o más "bases selectivas" (bases al azar), se logra la amplificación de solamente un subconjunto del total de fragmentos de ADN generados por la restricción doble. Esto ocurre debido a que cada base selectiva añadida reduce en una

cuarta parte el número de fragmentos amplificados durante este proceso; de tal forma que si se utiliza una combinación de dos primers con tres bases selectivas en cada uno de ellos, amplificaría 1/4096 de los fragmentos totales. Estos marcadores tienen la ventaja de obtener un número muy alto de polimorfismos, y de ser más reproducibles que otros marcadores arbitrarios como los RAPDs (Nuez et al., 2000).

1.2.2. Investigación en Hongos Entomopatógenos mediante Marcadores Genéticos

Existen algunas investigaciones realizadas usando marcadores bioquímicos y moleculares de hongos del género *Beauveria* realizadas en los últimos 25 años; la gran mayoría de las cuales se llevaron a cabo con la intencionalidad de lograr una identificación más precisa de diversas especies y cepas del género, habitualmente identificadas de acuerdo a rasgos morfológicos como el tamaño, forma y color de los conidios (Aquino de Muro et al., 2003). Entre las técnicas modernas empleadas hasta ahora se menciona: análisis de rRNA y con marcadores RAPD (Glare & Inwood, 1998), uso de ITS nucleares y secuencias EF1- α (Rehner & Buckley, 2005), análisis mediante marcadores RFLP y RAPD (Maurer et al., 1997), y estudios mediante las técnicas ITS-RFLP y AFLP (Aquino de Muro et al., 2003). Aparte de las investigaciones mencionadas, Glare & Inwood, (1998), también citan algunos estudios hechos en las décadas de los 80' y 90' con técnicas bioquímicas (isoenzimas) y moleculares (rDNA, SSCP, RAPD, RFLP) por otros autores. Pese a lo expuesto, ninguno de dichos estudios ha logrado establecer un método de identificación más preciso que las técnicas morfológicas clásicas, ni tampoco árboles filogenéticos concluyentes. Según dichos estudios, el uso de marcadores moleculares para relacionar a los organismos estudiados con su lugar de colecta y hospedador ha dejado entrever la naturaleza generalista de los

hongos entomopatógenos, al no existir un patrón distinguible, salvo raras excepciones (Glare & Inwood, 1998).

1.3. Investigación de Hongos Entomopatógenos en el Ecuador

En el Ecuador, se han realizado algunos estudios sobre hongos entomopatógenos por parte del INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias). Esta institución ha logrado aislar varias cepas pertenecientes a los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* en distintas localidades del país. Con dichos aislamientos se han llevado a cabo principalmente ensayos de agresividad *in vitro* y patogenicidad sobre plagas de interés (Ayala, 2006).

En el año 2003, la mencionada institución probó sustratos que favorezcan el crecimiento masivo de hongos entomopatógenos usados en laboratorio y se observó que el sustrato de arroz fue el mejor para este fin. También evaluaron la patogenicidad de *Beauveria brogniartii* y *Metarhizium anisopliae* provenientes de las principales zonas productoras de papa sobre *Premnotrypes vorax*, y hallaron diferentes grados de patogenicidad entre distintos aislamientos, siendo un aislamiento de *Beauveria brogniartii* aislado a partir de *P. vorax* en Chanchaló-Cotopaxi, y otro aislado a partir del mismo hospedador en Huacona San José-Chimborazo los más patogénicos (100% a los 10 días). En este mismo estudio se hicieron pruebas comparativas de efectividad y costo entre agentes biológicos (*Beauveria*) y químicos (carbofuran) de control de plagas, y encontraron un porcentaje de mortalidad promedio de 65.15% en el método biológico frente a 94.2% en el método químico; así como un costo por hectárea de 31 USD para el primero frente a 11.9 USD para el segundo (Barriga, 2003).

Durante este mismo año (2003) el INIAP realizó aislamientos de *Beauveria* y *Metarhizium* en las provincias de Carchi y Cotopaxi, hallándose que los del primer género en general presentan mejor efectividad en el control de *P. vorax*, que los del segundo. Así mismo, ensayos efectuados en este mismo estudio sugieren que a mayor tiempo desde la inoculación de *Beauveria*, la mortalidad de *P. vorax* se eleva también, llegando a valores del 95.8% a los 17 días (Landázuri, 2003).

En el año 2004, investigadores de esta institución aislaron dos cepas de *Beauveria* y once cepas de *Metarhizium* a partir de individuos adultos de *Macrodactylus pulchripes* y de larvas de Scarabeidos en las parroquias de Chavezpamba y San José de Minas, provincia de Pichincha. Evaluaron la agresividad *in vitro* de los aislamientos de ambos géneros y se determinó que un aislamiento de *Beauveria* colectado de *Macrodactylus pulchripes* en la localidad de Alance – Pichincha, y otra cepa de *Metarhizium* colectada de larva de Scarabeido en la localidad de Alobuela – Pichincha fueron las más agresivas de todas las que se analizaron (Rueda, 2005). En otro trabajo de 2004 llevado a cabo por el INIAP se realizaron aislamientos de hongos entomopatógenos en la Isla San Cristóbal-Galápagos (Cerro Gato, Cerro Azul, Socavón y el Puerto) de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*. Se hicieron pruebas de patogenicidad de dichos aislamientos sobre *Metamasius hemipterus*, hallándose una elevada letalidad de *Beauveria* sobre el insecto (100% a los 9 días) (Valverde, 2005).

Finalmente en 2005, esta institución aisló doce cepas de *Beauveria* y ocho cepas de *Metarhizium* a partir de especímenes adultos de *Macrodactylus sp.* y de larvas de Scarabeidos colectados en 14 localidades (ubicadas entre los 1400 y 2400 m.s.n.m) del

cantón Chillanes provincia de Bolívar. De los aislamientos de hongos obtenidos se evidenció que un aislamiento de *Metarhizium* proveniente de la localidad de S. F. Asapi – Bolívar a 1500 m.s.n.m. y otro de *Beauveria* procedente de la localidad de Tablas – Bolívar a 1700 m.s.n.m fueron los más agresivos frente a insectos del género *Macroductylus sp* (Ayala, 2006). Otros aislamientos de dichos géneros colectados en los mismos sitios antes citados mostraron la más alta patogenicidad sobre individuos de *Macroductylus sp.*, obteniendo en el caso del representante de *Metarhizium* una mortalidad de 95.40% a los cinco días desde la aplicación; así como una mortalidad de 84.27% en el caso del representante de *Beauveria*, al mismo tiempo antes descrito (Ayala, 2006).

Con este antecedente, el motivo del presente estudio fue realizar un análisis de diversidad genética de varios aislamientos en su mayoría pertenecientes a los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, realizados por el INIAP en varias localidades del país, utilizando para ello marcadores moleculares AFLPs. Existía también la expectativa de encontrar correlación entre la presencia de algún marcador particular en el genoma de estos hongos y ciertas características importantes como patogenicidad, agresividad y adaptabilidad que han sido evaluadas por el INIAP para algunos de los aislamientos de los hongos analizados.

2. Objetivo General

Analizar la diversidad genética de 46 aislamientos de *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.*, *Vericillium sp.* y otros, mediante la metodología de marcadores AFLPs.

3. Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo eficiente de extracción de ADN de alta calidad de los distintos aislamientos de hongos entomopatógenos.
- Determinar la diversidad genética de los 46 aislamientos de hongos entomopatógenos mediante AFLPs.
- Establecer asociaciones entre la presencia de determinados marcadores moleculares en el genoma de los hongos, y la característica de agresividad o virulencia de los mismos.

4. Justificación

El uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas, parece ser una alternativa viable y acorde con las tendencias actuales, donde se fomenta el aumento del uso de biopesticidas. Sin embargo la eficiencia de este método depende de un desarrollo de información básica que permita una mejor selección y caracterización de las cepas.

La colección de Hongos Entomopatógenos realizada por el Departamento de Protección Vegetal del INIAP, ha sido clasificada desde el punto de vista morfológico y de eficiencia como controlador biológico; sin embargo, necesita de una caracterización genética molecular para detectar diferencias a nivel de ADN y para complementar la información aportada por los datos morfológicos. En general, una de las principales desventajas de la caracterización morfológica es que las características a medir son limitadas en número, por lo cual la discriminación entre aislamientos es difícil. Por otro lado, la presencia de estas especies en diversos climas y condiciones agroecológicas, podría indicar la existencia de una alta variabilidad genética en las especies.

Actualmente, la forma más certera de determinar los niveles de diversidad y estructura genética interespecífica e intraespecífica es a través del uso de marcadores moleculares.

Por lo tanto, una caracterización molecular en base de marcadores moleculares de tipo AFLPs, contribuirá al refinamiento de estudios taxonómicos, evolutivos, de diversidad, el mejoramiento de cepas y el seguimiento molecular de los hongos en el campo, que permita evidenciar su dinámica y su eventual establecimiento permanente, en casos de inoculaciones artificiales. Existe también la posibilidad de encontrar correlación entre la presencia de un marcador particular en el genoma de estos hongos y algunas características importantes como patogenicidad, agresividad y adaptabilidad.

El uso de bioinsecticidas contribuiría con un manejo de la agricultura ambientalmente más amigable, y constituiría una estrategia interesante para el control de plagas en cultivos económicamente importantes a nivel nacional y mundial.

5. Área de Estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales); Cumbayá-Ecuador. El material que fue objeto de estudio es una colección de hongos entomopatógenos provistos por el Departamento de Protección Vegetal del INIAP (Instituto Nacional de Autónomo de Investigaciones Agropecuarias).

6. Materiales y Métodos

6.1. Materiales:

6.1.1. Material Biológico:

El material biológico utilizado en este estudio fue micelio de hongos entomopatógenos proveniente de recolecciones realizadas por el Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina, INIAP. Estas recolecciones se realizaron en algunas provincias del país, principalmente de la Sierra y también en el Archipiélago de Galápagos. De 63 cepas que conforman la colección del Departamento del INIAP, 46 fueron entregadas en medio de cultivo PDA al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

En la Tabla 1 se enlista el material biológico utilizado para efectuar este estudio de diversidad genética.

6.1.1.1. Subcultivo de aislamientos fúngicos

Medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) DIFCO, 39gr/L

Gentamicina GIBCO, 40 mg/L

Agua destilada

6.1.2. Extracción de ADN fúngico

CTAB 2X

β -mercaptoetanol (10 μ l por cada 1000 μ l de CTAB)

Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)

Isopropanol

Etanol al 76%

Buffer TE (Tris 10mM, 1mM EDTA estéril, pH 7.5)

Sand White Quartz (-50 + 70 mesh; Sigma Co. product # S-9887)

6.1.2.1. Cuantificación de ADN

fluorómetro Qubit™ (Invitrogen)

Quant-it™ *working solution* (Quant-it™ Reagent + Quant-it™ buffer, 1:200)

Quant-it™ Standard #1

Quant-it™ Standard #2

6.1.3. Amplificación con kit AFLP Analysis System 1, INVITROGEN

6.1.3.1. *Restricción y Ligación:*

- 5X Reaction Buffer
- ADN fúngico extraído de cada muestra (30-175 ng/μl)
- Solución de enzimas EcoR1/Mse 1
- Agua destilada
- Solución de ligación con adaptadores
- T4 ADN ligasa
- Centrifuga Eppendorf 5415D
- Incubadora

6.1.3.2. *Reacción de Preamplificación:*

- ADN fúngico extraído digerido y ligado (250 ng/μl)
- PRE-AMP PRIMER MIX
- 10X PCR buffer más Mg
- Taq ADN Polimerasa (5U/ μl)
- Termociclador Techne *TC-412*

6.1.3.3. *Reacción de Amplificación Selectiva:*

- ADN fúngico preamplificado
- Set de primers EcoR1

- Set de primers MseI
- 10X PCR Buffer más Mg
- Taq ADN Polimerasa (5U/ μ l)

6.1.4. Electroforesis en gel de Agarosa

Agarosa 1.5%

SYBR Safe (10000X, Invitrogen)

Cámara de electroforesis horizontal C.B.S. Scientific Co MGU-502T

Cámara de electroforesis horizontal EC Apparatus Cooperation Maxicell EC-360

Transiluminador Vilber Lourmat TFX 35M

Cámara digital Kodak DC290 *Zoom*

Software Kodak 1D

Fuente de Poder EC-Apparatus Cooperation EC2060P Series 90

Horno Microondas Mabe Softouch

6.1.5. Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Fuente de poder BIORAD *Powerpac HVTM*

Cámara de electroforesis vertical BIORAD *Sequi-Gen GT Sequencing cell*

Poliacrilamida al 6%

Persulfato de amonio al 10%

TEMED, Invitrogen

Ladder 100bp, Invitrogen

Buffer de carga

REPEL, Invitrogen

Solución Stock (alcohol al 96% + ácido acético al 0.5%)

Silane sianol [3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate 98%, Invitrogen]

TBE 1X

6.1.6. Tinción con Plata (Protocolo mejorado por Halima Benbouza, et al., 2006)

6.1.6.1. *Solución fijadora y de parada (2000 ml)*

Ácido Acético Glacial 10 ml

Alcohol absoluto 200 ml

Agua desionizada 1790 ml

6.1.6.2. *Solución de plata (1000 ml)*

Nitrato de plata, 4 gr

Formaldehído al 37%, 3 ml

Agua destilada, 2000 ml

6.1.6.3. *Solución Reveladora (1000 ml)*

Hidróxido de sodio, 30 gr

Formaldehído al 37%, 4 ml

Agua destilada, 2000 ml

6.1.7. Análisis de Datos:

Computador NEC Pentium III

Software NTSYSpc 2.11

Escáner EPSON Perfection 1260

Matrices de similitud; coeficiente de Jaccard

Dendrogramas; Principal Component Analysis

Software Winboot

6.2. Metodología

6.2.1. Cultivo de hongos entomopatógenos

Se replicó cada uno de los aislamientos entregados por el INIAP en medios PDA base con gentamicina (Ver Tabla 2) mediante la técnica de estriado empleando hisopos estériles de mango largo. Se subcultivó cada aislamiento en dos cajas de medio PDA, con el fin de obtener suficiente cantidad de micelio para realizar la extracción de ADN genómico.

6.2.1.2. Códigos de aislamientos de hongos entomopatógenos

Los códigos utilizados en este estudio corresponden a un sistema simple de numeración de cepas y de nombres cortos (asignados arbitrariamente), que el INIAP empleaba originalmente para identificar los aislamientos entomopatógenos de su colección. En el presente trabajo dichos códigos fueron renombrados como códigos USFQ, debido a que durante la realización del proyecto el INIAP asignó nuevos códigos de identificación a todos sus aislamientos de hongos. Los códigos USFQ y los códigos INIAP se incluyen en la Tabla 1.

6.2.2. Extracción de ADN fúngico

Se siguió el protocolo de extracción de ADN genómico mediante CTAB (Maroof, 1984) con la adición de Sand White Quartz (Sigma) durante la molienda del micelio para mejorar la extracción del ADN fúngico (Weiland, 2000). El protocolo más eficiente de extracción de ADN, se determinó luego de efectuar tres ensayos preliminares en donde se estableció que cantidades de micelio y arena eran las mejores para obtener ADN de buena calidad en cantidades suficientes para el análisis molecular, y éste se describe a continuación.

Se colocó los aislamientos (cultivados en medio PDA) a 4°C en un refrigerador, por 2 días. Después de este período se tomó aproximadamente 150 mg de micelio de cada aislamiento crecido en medio PDA. Se mezcló Sand White Quartz (-50 + 70 mesh; Sigma Co. product # S-9887), en una relación de 3:1 con la muestra de micelio en un mortero limpio y desinfectado. Se añadió 1000 µl de CTAB 2X y se maceró toda la mezcla hasta lograr una consistencia homogénea. El micelio macerado se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, y se añadió 10 µl de β – Mercaptoetanol (10 µl de β-mercaptoetanol por cada 1000 µl de CTAB). Se incubó por 1 hora a 62°C, agitando por inversión los tubos eppendorf cada 15 minutos. Se añadió 200 µl de solución Cloroformo – Alcohol isomamílico (24:1), y se agitó continuamente por inversión durante 10 minutos. Luego, se centrifugó las muestras durante 5 minutos a 13200 rpm, y producto de este proceso se formaron 3 fases. Con una micropipeta se removió la fase acuosa superficial (solución transparente) y se la transfirió a un nuevo tubo eppendorf. Se añadió alcohol isopropílico enfriado a 4°C en una relación 0.8 a 1 veces el volumen presente en el tubo, con el fin de precipitar el ADN. Se agitó los tubos por inversión hasta ver los hilos de ADN formados en la solución. Para precipitar todo el ADN, se centrifugó los tubos a 5000 rpm por 3 minutos; con lo cual se obtuvo un pellet blanco en

el fondo de cada tubo. A continuación, se descartó todo el sobrenadante de los tubos y se añadió 500 μ l de Etanol (76%) para lavar el pellet agitando cada tubo hasta que el pellet se despegue de la pared del mismo. Por último, se removió el etanol con una micropipeta cuidando de no absorber el ADN precipitado y se dejó secar completamente el remanente de etanol presente en cada muestra. Para almacenar los ADNs extraídos, se resuspendieron en 100-150 μ l de buffer TE estéril o agua destilada ultra purificada.

6.2.2.1. Cuantificación de ADN

El ADN fue cuantificado con el uso de un fluorómetro Qubit™ (Invitrogen). Para ello, se utilizó un volumen de 2 μ l de ADN genómico de hongo suspendido en buffer TE, más 198 μ l de Quant-it™ *working solution* (Quant-it™ Reagent + Quant-it™ buffer, 1:200). Cada vez, antes de efectuar cuantificaciones de muestras de ADN, se calibró el fluorómetro mediante el empleo de dos soluciones estándares de ADN de bacteriófago λ (Quant-it™ Standard #1 y Quant-it™ Standard #2) que forman parte del kit de cuantificación. Para esto, se mezcló 10 μ l de cada ADN estándar con 190 μ l de Quant-it™ *working solution* (tal como sugiere el protocolo de Invitrogen), y se hizo la lectura de ambos ADNs estándar. Una vez calibrado el fluorómetro, se procedió a medir las concentraciones de ADN de cada tubo, insertándolos uno a uno en la cámara de medición y tomando los datos respectivos.

Los resultados obtenidos con el fluorómetro Qubit™ se corroboraron repitiendo las mediciones dos veces, una seguida de la otra por un intervalo de 30 minutos. Este tiempo de espera entre una medición y otra, responde al criterio de evitar lecturas erróneas provocadas por el aumento de temperatura de los tubos causada por su

manipulación física (Quant-iT™ dsADN BR Assay Kit Instruction Booklet, Invitrogen).

6.2.3. Análisis de ADN fúngico mediante la técnica AFLP

Se siguió el protocolo de Invitrogen para el corte del ADN con enzimas de restricción, ligamiento de adaptadores, preamplificación, y amplificación selectiva, salvo algunos cambios indicados a continuación.

6.2.3.1. Restricción y Ligación

Con el fin de optimizar el uso de los reactivos del kit de AFLPs, las reacciones de restricción se llevaron a cabo con la mitad del volumen sugerido por Invitrogen en tubos eppendorf de 1.5 ml, utilizando 1 µl de solución EcoR1/Mse1, 2.5 µl de buffer de reacción 5X, y un volumen tal de ADN (suspendido en buffer TE estéril) que contenía 250 ng del ácido nucleico para todos los casos. El volumen final de la reacción de restricción (12.5 µl) se completó adicionando diferentes volúmenes de agua destilada estéril, dependiendo de lo requerido para cada muestra. A continuación, se aplicó una centrifugación corta de dos segundos, y la mezcla se sometió a incubación durante 4 horas a 37°C. Después de este proceso, se pusieron los tubos en baño de arena a 70°C por 15 min, con la finalidad de desnaturalizar térmicamente las endonucleasas y detener su actividad. Por último, se realizó otra centrifugación corta de dos segundos para que todo el volumen de la mezcla baje a la base del tubo, antes de congelar las muestras a -20°C.

Las reacciones de ligación de adaptadores a los ADNs digeridos con la mezcla enzimática EcoR1/Mse1, se efectuaron añadiendo 12 µl de solución de adaptadores, y 0.5 µl de T4 ADN Ligasa. Los tubos se centrifugaron por dos segundos, y se dejaron en incubación a temperatura ambiente por dos horas. Una vez terminado el proceso, se almacenaron a -20°C en el congelador.

6.2.3.2. Preamplificación

Se siguió el protocolo especificado en el manual del Kit de AFLPs (Invitrogen), para efectuar las reacciones de preamplificación de todas las muestras. Con la finalidad de optimizar el Kit, la única modificación que se hizo fue disminuir el volumen de cada reacción a la mitad sin alterar la concentración de los reactivos que intervienen en ella. En consecuencia, para preamplificar cada muestra se colocó en un tubo de 0.2 ml de capacidad, 2.5 µl de ADN previamente ligado, 20 µl de solución *pre-amp primer mix*, 2.5 µl de 10X PCR buffer y 0.5 µl de Taq Polimerasa. El programa de la PCR utilizado fue el que se describe en el manual del AFLP Analysis System 1 de Invitrogen (20 ciclos de: 94°C por 30s – 56°C por 60s – 72°C por 60s).

6.2.3.3. Screening de primers selectivos

Se evaluaron las siguientes 10 combinaciones de primers EcoR1/Mse1 provenientes del AFLP® Starter Primer Kit: 1 (MCAG/EAAC), 2 (MCAC/EAAG), 3 (MCAT/EACT), 4 (MCTG/EACA), 5 (MCAA/EAAC), 6 (MCTT/EAGG), 7 (MCTA/EAGC), 8 (MCTC/EACG), 9 (MCTT/EAAG) y 10 (MCAT/EACA). La elección de dichas combinaciones respondió al criterio de buscar aquellos pares de

primers que se presentaban como más universales en tablas de amplificación positiva para especies vegetales del manual de usuario del Kit de Invitrogen.

Se realizaron varias pruebas de amplificación selectiva con cinco ADNs fúngicos escogidos al azar (12, 14, 15, 28, CJ) para verificar si se obtenía una amplificación exitosa con cada una de las distintas combinaciones de primers. Para cada una de las muestras, la reacción contenía 2.5 µl de ADN preamplificado, 2.5 µl de solución de primers EcoR1/Mse1 y dNTPs, y 5 µl de solución de Taq polimerasa más 10X PCR buffer. Se utilizó el programa de PCR recomendado en el manual del Kit de AFLP. Los resultados de estos ensayos fueron visualizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% mediante tinción con plata.

6.2.3.4. Doble Preamplificación

El proceso de Amplificación Selectiva exhibió la imposibilidad de generar patrones fingerprint AFLP a partir del ADN fúngico empleado en este estudio. Se generaron escasas bandas, probablemente como consecuencia de un exceso de selectividad por parte de primers con 3 bases selectivas diseñados para genomas vegetales grandes. Debido a lo anterior, se decidió disminuir el grado de selección analizando directamente el producto de la preamplificación (primers con 1 base selectiva), que contiene una decimosexta parte de la totalidad de fragmentos de ADN potencialmente analizables. Para elevar sustancialmente la visibilidad de las bandas de preamplificación en geles de poliacrilamida al 6%, se aplicó una segunda preamplificación del ADN originalmente preamplificado. Para ésto, se mezcló en un tubo eppendorf (0.2ml) 2.5 µl de ADN preamplificado, 20 µl de *pre-amp primer mix*, 2.5 µl de 10X PCR Buffer y 0.5 µl de Taq polimerasa.

6.2.4. Electroforesis en Gel de Agarosa

Para comprobar el éxito del proceso, después de cada una de las fases que conforman la estrategia de análisis por AFLPs, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Mediante esta técnica se observó presencia y cantidad de ADN genómico extraído, así como también de los productos de restricción, ligación, preamplificación y amplificación selectiva. Cada vez que se requirió, se prepararon geles de agarosa de 100 o 250 ml dependiendo del número de muestras analizadas, usando TBE 1X y 1.5% de agarosa. La mezcla de TBE 1X y agarosa fue sometida a ebullición por medio de un horno microondas, y una vez homogenizada la solución, se dejó enfriar hasta que la temperatura de la superficie del erlenmeyer fuera tolerable al tacto. Enseguida, se agregó 5 µl de SyBr Safe por cada 100 ml de gel preparado, y la solución se agitó para mezclarla nuevamente. A continuación, se vertió el gel líquido sobre la cámara de electroforesis (C.B.S. Scientific Co MGU-502T), y se colocaron peines plásticos para formar los pocillos de carga; el gel se dejó solidificar durante treinta minutos antes de cargar las muestras. Para la visualización de ADN genómico extraído, se cargó en cada pocillo 10 µl de muestra que resulta de la mezcla de 2 µl de buffer de carga (Blue Juice 10X, Invitrogen), 5 µl de agua destilada estéril, y 3 µl de ADN genómico suspendido en buffer TE estéril; las muestras se corrieron por 30 minutos a 80V. En cambio, para la visualización de los productos de restricción, ligación, preamplificación y amplificación selectiva, se cargó en cada pocillo 5 µl de muestra compuesta por 4 µl de ADN (producto de cualquiera de los mencionados procesos) y 1 µl de buffer de carga (Blue Juice 10X, Invitrogen); las muestras se corrieron por 1.5 horas a 80V.

6.2.5. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% y en éstos se corrió los productos de preamplificación de los ADNs fúngicos usando una cámara vertical de electroforesis BIORAD. Como primer paso del proceso, se lavó ambos vidrios de la cámara de electroforesis empleando el detergente ALCONOX disuelto en agua (2 cucharitas en 150 ml). Después de enjuagar y dejar secar los vidrios, se los limpió con alcohol al 96%, para luego esparcir sobre uno de ellos 1003 μ l de solución de Bind Silane (1000 μ l de solución stock + 3 μ l de silane sianol), así como 500 μ l de Repel (Invitrogen) sobre el otro vidrio.

Para preparar el gel, a un volumen de 100 ml de acrilamida al 6%, se le añadió 550 μ l de persulfato de amonio al 10% y 109 μ l de TEMED (invitrogen). La mezcla fue homogenizada rápidamente mediante agitación, e inyectada a velocidad constante entre los dos vidrios que forman parte de la cámara de electroforesis vertical BIORAD; una vez colocado el peine para formar el frente de corrida, se dejó polimerizar el gel por cuarenta y cinco minutos. Al término de la polimerización del gel, se armó completamente la cámara, se crearon los pocillos con la ayuda del peine, se eliminó la urea del frente de corrida, y se efectuó la precorrida con buffer de carga.

Para cargar las muestras, se adicionó en cada una de ellas una cantidad tal de buffer de carga (Blue Juice 10X, Invitrogen), que la concentración final de este reactivo en cada tubo eppendorf fue de 1X. Luego se desnaturalizó las muestras a 96°C por 6 minutos mediante el uso de un termociclador *TECHNE TC-412*, y acabado el proceso se

las centrifugó por dos segundos para bajar todo el líquido al fondo del tubo. Finalmente, en los pocillos del gel se cargaron 5 µl de cada muestra junto con las muestras necesarias de Ladder 100bp. El Ladder 100bp se lo preparó en una relación 2:1 de Ladder 100bp-buffer de carga. Finalmente, se corrió a 85W las muestras por 3 horas.

6.2.6. Tinción con Plata

Para teñir los geles de poliacrilamida, se siguió el protocolo de Benbouza (2006) sin modificación alguna. Los detalles de este protocolo se describen en la Tabla 3.

6.2.7. Análisis de datos

Una vez teñido el gel de poliacrilamida, las bandas generadas y visualizadas mediante un transiluminador de luz blanca, se transformaron en datos binarios de ceros y unos. Para ello, primero se asignó una numeración arbitraria a todas las bandas claramente visibles en el gel, y se verificó su presencia o ausencia en todos los organismos analizados. Aquellas bandas que se presentaron definidas y claras fueron asignadas como (1), significando presencia; y en los casos donde las bandas estuvieron ausentes o muy tenues fueron asignadas como (0). Con los datos binarios se construyó una matriz básica de datos en una hoja de cálculo de Microsoft Excel para ser leída por el software estadístico empleado para procesar estudios moleculares. Esta matriz estaba formada por todas las bandas enumeradas dispuestas en filas, y los organismos analizados ubicados en columnas. En la primera fila de la hoja de cálculo se ingresó de izquierda a derecha: el tipo de matriz, el número total de filas, el número total de

columnas y el número total de bandas no identificadas. Para analizar los datos de la matriz se utilizó el programa NYSYSpc 2.11, en el cual se transformó la matriz básica de datos en matrices de similitud mediante la aplicación de un coeficiente de asociación. En este caso se utilizó el coeficiente de Jaccard debido a que es uno de los coeficientes más extensamente empleados en análisis de diversidad genética con marcadores moleculares. La matriz de similitud compara todos los individuos analizados y provee valores de similitud genética para todas las combinaciones posibles. Con el uso de este mismo programa se construyó un dendrograma de similitud UPGMA para determinar las relaciones filogenéticas más probables entre los individuos que conformaron la población de estudio. Adicionalmente, se efectuó un análisis de Bootstrap utilizando el software Winboot, y se generó un árbol que incluye el resultado de dicho análisis. Finalmente, se hizo una gráfica de PCoA (Principal Coordinate Analysis) mediante el programa NTSYSpc 2.11 para tratar de buscar potenciales agrupamientos que puedan tener un significado biológico.

7. Resultados

7.1. Extracción y cuantificación de ADN

A pesar de estar bien documentada la dificultad para extraer ADN fúngico puro y de alto peso molecular (Al-Samarray & Schmid, 2000), el uso de Sand White Quartz (-50 + 70 mesh; Sigma Co. product # S-9887) permitió la obtención de suficientes cantidades de ADN genómico en la mayor parte de muestras, para realizar su análisis mediante la técnica de AFLP. Las concentraciones de ADN obtenidas para cada muestra se presentan en la Tabla 4. Para todos los eventos de extracción, antes de efectuar la

cuantificación se verificó visualmente la presencia de ADN mediante geles de agarosa al 1.5% (Figura 1).

Las concentraciones de ADN (Tabla 4) variaron desde 30ng/μl hasta cerca de 175ng/μl. Debido a lo anterior, se decidió no hacer diluciones estándares (100ng/μl) de los ADN. El procedimiento seguido fue calcular el volumen de muestra stock que se requería para alcanzar una concentración de 250 ng de ADN (recomendada por el protocolo de Invitrogen) en cada reacción de restricción, cuyo volumen total fue de 12.5 μl.

Aquellas muestras que tras varios intentos de extracción no alcanzaron concentraciones suficientes de ADN o cuya pureza no fue la adecuada para ser sometidas a un análisis molecular, no se las incluyó en el estudio. Estas muestras fueron: 3, ARL, 19 y TBA (Tabla 1).

7.2. Restricción y Ligación

Cada reacción de restricción se efectuó aplicando una mezcla de las endonucleasas *Eco R I* y *Mse I* sobre 250 ng de ADN provenientes de cada aislamiento. Los mejores resultados se obtuvieron incubando los ADN con las enzimas durante 4 horas a una temperatura constante de 37°C. Luego de este proceso, las muestras digeridas se sometieron a 70°C por 15 minutos para detener la acción de las enzimas de restricción.

La totalidad de los productos de restricción fueron sometidos a reacciones de ligación con adaptadores específicos, con lo cual se crearon sitios de anclaje para las los primers responsables de las posteriores fases de amplificación.

Los productos de las reacciones de restricción como de ligación, fueron sometidos a procesos de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% para comprobar su éxito. En las figuras 2 y 3 se pueden observar fotografías del resultado de ambos procesos.

7.3. Preamplificación

Para todos los aislamientos analizados, se obtuvo una exitosa preamplificación de las muestras de ADNs previamente digeridas y ligadas a adaptadores. Este hecho fue comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 4), en donde se evidencia una elevada cantidad de fragmentos amplificados que se visualizan como un barrido de ADN distribuido uniformemente para cada muestra.

7.4. Screening de primers

Cada una de las 10 combinaciones de primers selectivos que se eligieron fueron probadas en cinco muestras de ADN escogidas al azar, obteniéndose buenos resultados únicamente con la combinación de primers 1 (EAAC/MCAG). Éste par de primers produjo un patrón de bandas claro e informativo que podía ser analizado como fingerprinting de AFLP; el resto de combinaciones no produjeron amplificación o ésta fue muy pobre (bandas escasas o tenues).

La Figura 5 muestra los resultados del proceso de amplificación selectiva con 5 pares de primers distintos visualizados mediante gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6%, en donde es evidente que solo el primer grupo de muestras (combinación de primers 1) exhibe un buen patrón fingerprint de AFLP.

7.5. Doble Preamplificación

Ante la imposibilidad de generar patrones fingerprint AFLP mediante el uso de primers selectivos, se optó por la estrategia de preamplificación doble con la combinación de primers (EA/MC), lográndose visualizar en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% la decimosexta parte de la totalidad de fragmentos potencialmente analizables de los genomas fúngicos estudiados. La Figura 6 muestra el resultado de este proceso, en donde se observa un claro patrón fingerprint en todas las muestras estudiadas.

7.6. Determinación de Diversidad Genética

Como se explica en la metodología, la diversidad fue determinada transformando los patrones de bandas generados en el gel, en datos binarios de presencia y ausencia (1 – 0) (Anexo 1), y construyendo una matriz en hoja de cálculo de Microsoft Excel. La combinación de primers de preamplificación produjo un número total de 121 bandas, de las cuales 100% fueron polimórficas para toda la población de estudio que incluía representantes del género *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticilium* y *Candida*. Las muestras del género *Beauveria* presentaron un total de 105 bandas, de los cuales 100% fueron polimórficas. Para los integrantes del género *Metarhizium* se generaron 44 bandas, 100% de las cuales también exhibieron polimorfismo. En lo que respecta al género *Verticilium* se encontraron un total de 20 bandas, una vez más, con 100% de polimorfismo. Finalmente, para la única muestra del género *Candida* se halló un total de 16 bandas.

Mediante el programa NTSYSpc 2.11 se procesó la matriz básica de datos para generar una matriz de similitud genética usando el coeficiente de Jaccard, y se construyó un dendrograma. El dendrograma obtenido permitió visualizar las relaciones filogenéticas más probables entre los aislamientos que conformaron la población estudiada. En el dendrograma (Figura 7) se pueden observar claramente doce grupos (designados con letras, desde la A hasta la L). Se aprecian cinco grupos conformados exclusivamente por hongos del género *Beauveria*, el grupo C (conjunto mayor); y los grupos A, D, F y H (conjuntos menores) compuestos por entre 2 y 4 aislamientos cada uno. El grupo C contiene a los aislamientos 21, 22, 24, 25, 28, 30, 31, CJ, CM y SALB4, todos ellos pertenecientes al género *Beauveria*, aislados desde *Premnotrypes vorax* (Gusano Blanco de la papa), a excepción de las cepas 30 y SALB4; la primera hallada en un coleóptero adulto de la familia Sthaphilidae y la segunda hallada en una larva de coleóptero de la familia Scarabaeidae. Las localidades geográficas de donde fueron aisladas cada una de éstas cepas son diversas, y no sugieren algún tipo de vínculo entre el lugar de colecta de los hospedadores y la relación filogenética existente entre los entomopatógenos aislados de ellos. Dentro del grupo C destaca la gran semejanza genética entre las cepas 22 y CM con un coeficiente de 0.86, 25 y 30 con un coeficiente de 0.84 y, 25 y 31 con un coeficiente de 0.82, así como la existencia de dos aislamientos de *Beauveria* genéticamente idénticos, las cepas 30 y 31; curiosamente aislados de distintos hospedadores colectados en dos localidades diferentes (Tumbaco y Pull Chico, Pichincha).

Por otro lado, el grupo A está compuesto por los aislamientos 17, 23, BJHL y CHA, todos ellos morfológicamente identificados como *Beauveria sp.* Los dos primeros

fueron aislados a partir de *Premnotrypes vorax* (Gusano Blanco de la papa), el tercero provino de un individuo adulto de *Macrodactylus sp.* (catzo del maíz), y el cuarto fue extraído de una larva de coleóptero de la familia Scarabaeidae. Al igual que el grupo C, todas las cepas exhiben localidades de recolección diferentes. Por su parte el grupo D, está conformado por las cepas 12, 13, y 14 registradas por el INIAP como *Beauveria sp.*, y aisladas en diferentes localidades a partir de ejemplares adultos de *Macrodactylus sp.* (catzo del maíz). El grupo F encierra a los aislamientos 26 y 29 de género *Beauveria*, extraídos de ejemplares de *Premnotrypes vorax* colectados en dos distintos lugares de la Sierra del Ecuador (ver Tabla 1).

Finalmente, el grupo I se compone de las cepas BAIA y HC identificadas como *Beauveria sp.*, provenientes de distintos sitios de colecta, así como de hospedadores diferentes. La primera cepa se aisló de un coleóptero adulto y la segunda de un ejemplar de *Premnotrypes vorax*.

En adición a estos grupos, la cepa 16 también pertenece al género *Beauveria*, pero se muestra como un linaje independiente del resto de agrupaciones de este género. Este aislamiento proviene de un ejemplar de *Premnotrypes vorax* (Gusano Blanco de la papa) colectado en Chanchaló, provincia de Cotopaxi.

El dendrograma también muestra que los aislamientos identificados como pertenecientes al género *Metarhizium* no están conglomerados en un solo grupo, pero se observan dos grupos bien definidos, E y J, conformados exclusivamente por cepas de este género. El grupo E contiene a los aislamientos 1, 5, 7 y 10, tres de los cuales se extrajeron de ejemplares adultos de *Macrodactylus sp.* (catzo del maíz), siendo la cepa

10 la excepción al haber sido aislada de una larva de coleóptero de la familia Scarabaeidae. En este grupo es notable la similitud genética entre los aislamientos 5 y 10 con un coeficiente de 0.97, a pesar de haber sido extraídos de diferentes hospedadores colectados en distintas localidades. Los aislamientos 5 y 7 comparten tanto el lugar de recolección del hospedador (Alobuela, Pichincha) como el tipo de organismo de donde fueron aislados (adultos de *Macroductylus sp.*), y también exhiben un grado de similitud genética relativamente alto (aunque inferior al existente entre las cepas 5 y 10), con un coeficiente de 0.74.

Por otro lado, el grupo J se compone de los aislamientos BLM y SALM1, ambos caracterizados morfológicamente como *Metarhizium sp.*, y provenientes de larvas de coleópteros de la familia Scarabaeidae colectados en dos diferentes lugares, Tablas y S. F. Asapi (Pichincha), respectivamente. De forma análoga a lo encontrado en los grupos conformados por aislamientos del género *Beauveria*, el lugar de recolección de los hospedadores de estos organismos entomopatógenos generalmente es indistinto, y no parece tener correlación con las relaciones filogenéticas existentes entre los individuos del género *Metarhizium*.

Con respecto al género *Verticilium*, los dos individuos presentes en este estudio, registrados por el INIAP como *Verticilium lecanii* se ubicaron dentro de dos grupos diferentes, B y G. El grupo B es un conjunto heterogéneo formado por tres aislamientos (37, 40, 18), cada uno de los cuales pertenece a un género distinto. La cepa 37 corresponde a un ejemplar de *Verticilium lecanii* aislado por la Universidad de Ohio (Estados Unidos), la cepa 40 fue identificada por el INIAP como un hongo del género *Candida* proveniente del suelo, y la cepa 18 está registrada como *Beauveria asmnnon*. Lo

destacable de este grupo, aparentemente tan disímil en cuanto a géneros, es la coincidencia en el sitio de donde fueron aisladas las cepas 18 y 40, siendo éste, el Archipiélago de Galápagos.

Por otro lado, el grupo G se halla compuesto por tres aislamientos, dos de los cuales pertenecen al género *Metarhizium* (4, 36), y un tercero pertenece al género *Verticilium* (38). La cepa 4 es un *Metarhizium* aislado de una pupa de coleóptero de la familia Scarabaeidae procedente de Alobuela (Pichincha, Ecuador), la cepa 36 está registrada como un *Metarhizium* aislado de un ejemplar de *Premnotrypes vorax* proveniente de Santa Martha (Cuba), y la cepa 38 corresponde a un aislamiento de *Verticilium lecanii* aislado por la Facultad de Agronomía de la Universidad Central del Ecuador.

Adicionalmente, las cepas 58, 60, 61 y 62, cuatro aislamientos sin identificación morfológica, extraídos de ninfas de moscas blancas provenientes de dos localidades de la Sierra ecuatoriana (Mascarilla, Valle del Chota-Imbabura y Cutuglagua-Pichincha), se ubicaron dentro de los grupos H y K. El grupo H está formado por los aislamientos 15, 58 y 62, siendo la cepa 15 un hongo del género *Beauveria* aislado de un coleóptero adulto colectado en la localidad de Alance (Pichincha, Ecuador). El grupo K es muy similar al grupo H, y se halla conformado por las cepas SHA, 60 y 61, en donde SHA es también un hongo del género *Beauveria* aislado de un ejemplar adulto de *Premnotrypes vorax*. En ambos grupos lo destacable es la aparente relación filogenética de mayor proximidad que tienen estos aislamientos carentes de tipificación morfológica, con aislamientos de *Beauveria sp.* Sin embargo, dentro del grupo H el nivel de similitud genética entre la cepa 15 (*Beauveria sp.*) y la cepa 58 (la más cercana en términos

filogenéticos) tiene un coeficiente de 0.31; y entre la cepa SHA (*Beauveria sp.*) y la cepa 60 (la más cercana en términos filogenéticos dentro del grupo K) existe un coeficiente de similitud de apenas 0.28.

Finalmente, tenemos al grupo L compuesto por las cepas 32 y 43. La cepa 32 está registrada por el INIAP como un aislamiento de *Metarhizium* proveniente de una florícola (Hilsea), mientras que la cepa 43 consta como una posible *Beauveria sp.*, aislada de un individuo adulto de coleóptero (familia Scarabaeidae) colectado en la localidad de Río Negro. Esta relación de cercanía filogenética entre las dos cepas, que presenta un coeficiente de similitud de 0.50, podría sugerir que la caracterización morfológica de la cepa 43 como una posible *Beauveria sp.* puede ser incorrecta.

El dendrograma también corrobora visualmente los elevados niveles de polimorfismo de los marcadores generados por la combinación de primers de preamplificación (E/M); y la matriz de similitud (Ver Tablas 5 – 10) de esta combinación de primers confirma que el nivel de diversidad genética en la colección de hongos entomopatógenos estudiada es muy elevada exhibiendo coeficientes de similitud genética entre parejas de aislamientos bajo 0.50 para la mayoría de casos.

7.7. Análisis de Bootstrap

Para determinar el grado de confiabilidad que tienen las relaciones filogenéticas presentadas en el dendrograma generado, se realizó un análisis de Bootstrap usando el coeficiente de Jaccard mediante el software Winboot. El análisis de Bootstrap (Figura 8) para la combinación de primers de preamplificación (EA/MC) exhibe 7 relaciones filogenéticas altamente fiables con valores superiores al 90%. Entre estas tenemos el

posicionamiento de los aislamientos 30 y 31 como genéticamente idénticos (95.3%), las relaciones de mayor cercanía evolutiva entre las muestras SALB4 y CJ (96%), 18 y 37 (97.8%), 10 y 5 (99.8%); así como la ubicación del grupo compuesto por las cepas 5, 7 y 10 como cercanamente relacionado con el aislamiento 1 (100% de confianza). También posiciona a la cepa 28 como el aislamiento más cercanamente relacionado al grupo compuesto por las cepas: 21, 22, 24, 25, 30, 31 y CM, con el 95.8% de confiabilidad. Finalmente, ubica al grupo anterior como el conjunto más cercanamente relacionado con el grupo conformado por las cepas SALB4 y CJ, mostrando un 98.3% de confiabilidad. Aparte de las anteriores, este análisis revela que existen 5 relaciones filogenéticas adicionales que superan el 70% de confianza, y pueden considerarse fiables. Entre estas tenemos las relaciones de mayor cercanía evolutiva entre las muestras HC y BAIA (75.5%), SALM1 y BLM (74.5%), y 32 y 43 (73.3%), la ubicación del grupo compuesto por las cepas 18 y 37 como cercanamente relacionado con la cepa 40 (77% de confianza), y la cercana vinculación del aislamiento 24 con el grupo conformado por las cepas 21, 22, 25, 30, 31 y CM (78.3% de confianza). El resto de relaciones filogenéticas presentan valores de bootstrap que van desde el 61% al 20% de confianza, en general, disminuyendo conforme las relaciones filogenéticas abarcan mayor cantidad de cepas. Solamente tres relaciones filogenéticas (las más inclusivas del árbol) exhiben valores tan bajos como 3.8% y 5% de fiabilidad (Figura 8).

7.8. Análisis de Coordenadas Principales

Mediante el uso del programa NTSYSpc 2.11 se efectuó un análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés), el cual es una técnica de ordenamiento que permite la proyección de los datos en dos o tres dimensiones con el

objetivo de visualizar diferencias entre los organismos y buscar potenciales agrupamientos que posean un significado biológico. El PCoA (Figura 9) arrojó seis agrupaciones, cuatro de las cuales tienen concordancia con lo visualizado en el dendrograma. La agrupación 1 corresponde exactamente al grupo E del dendrograma, y encierra a cuatro aislamientos cuyo único factor común es pertenecer al género *Metarhizium*. Las cepas que conforman la agrupación 2 forman parte del grupo C del dendrograma, y todas ellas están descritas como *Beauveria sp* aisladas de *Premnotrypes vorax* (Gusano Blanco de la papa), a excepción de la cepa 30 extraída de un coleóptero adulto de la familia Sthaphilidae. La agrupación 3 contiene cepas que también se hallan dentro del grupo C del dendrograma, y cuyos puntos en común son pertenecer al género *Beauveria* y haber sido aisladas de *Premnotrypes vorax*. Finalmente, los hongos contenidos en la agrupación 4, de nuevo incluidos dentro del grupo C del dendrograma, solamente poseen en común estar tipificados como *Beauveria sp*. Respecto a las agrupaciones 5 y 6 del PCoA, éstas se muestran como conglomeraciones heterogéneas que circunscriben hongos de distintos géneros, hospedadores y sitios de origen. La agrupación 5 contiene seis aislamientos, cuatro de los cuales pertenecen al género *Beauveria*, uno al género *Verticillium* y uno al género *Candida*; mientras que la agrupación 6 está compuesta por 20 aislamientos pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Verticillium*, provenientes de diversos hospedadores y localidades del país. En adición a las agrupaciones descritas, se observan dos cepas, 4 y 13, no agrupadas que pertenecen a los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, respectivamente.

Las cepas 5, 18 y SALM1 (Tabla 1) están descritas como las más entomopatogénicas y agresivas frente a coleópteros en trabajos previos llevados a cabo

por el INIAP, sin embargo, se debe señalar que éstas no se mostraron agrupadas entre ellas.

7.9. Marcadores de Patogenicidad y Marcadores característicos de aislamientos entomopatógenos

No se hallaron marcadores asociados a la entopatogenicidad comunes entre los aislamientos descritos como altamente patogénicos y/o agresivos en investigaciones efectuadas por el INIAP (cepas 5, 18 y SALM1) mediante la combinación de primers de preamplificación (EA/MC) empleada en este estudio.

Se pudo identificar algunos marcadores aparentemente específicos de cuatro aislamientos. Para la cepa 36 se identificó un marcador único de alrededor de 180 bp. En el caso de la cepa 17 se observó un marcador específico cercano a los 350 bp. De forma similar, para la cepa 58 se detectó un marcador de aproximadamente 160 bp. Finalmente, se visualizó un marcador específico de la cepa 24 con un tamaño cercano a los 450 bp.

8. Discusión

Es conocido que la técnica de AFLP requiere de buena calidad y pureza de ADN genómico para que pueda ocurrir una completa digestión del mismo, y en consecuencia, una apropiada ligación de adaptadores a los fragmentos generados (Aytül Incirli, 2000). También está bien descrita la dificultad que suelen presentar diversas especies de

hongos en la extracción de ADN de alta calidad y en cantidades suficientes para efectuar estudios moleculares, debido a la generalizada asociación de su genoma con polisacáridos y a la presencia de una fuerte pared celular (Al-Samarray & Schmid, 2000). Pese a lo anterior, en este estudio para la gran mayoría de aislamientos fúngicos se obtuvo suficiente cantidad de ADN lo suficientemente puro para efectuar un análisis molecular exitoso, gracias al uso de Sand White Quartz (-50 + 70 mesh; Sigma Co. product # S-9887) que permitió romper adecuadamente las paredes celulares, liberar el ADN, manipularlo, y analizarlo.

La ausencia de bandas visibles en la matriz de poliacrilamida para casi la totalidad de primers selectivos (Amplificación Selectiva) probados, se debió probablemente a un exceso de selectividad de dichos primers. Un estudio de diversidad genética en *Beauveria* usando marcadores AFLP realizado por Aquino de Muro et. al (2003), reporta el uso de primers preselectivos y selectivos con menor cantidad de bases selectivas que los empleados en el AFLP Analysis System 1, usado en esta investigación. La relación entre el tamaño del genoma del organismo que se desea analizar y la cantidad de bases selectivas aplicada es esencial ya que a menor tamaño de genoma, habrá menor cantidad de fragmentos de ADN generados luego de la digestión con endonucleasas, y por tanto el nivel de selección de fragmentos a amplificar en dicha población debe ser menos estricto, de manera que se puedan obtener suficientes bandas que conformen patrones fingerprinting en geles de poliacrilamida. La estrategia de utilizar primers de preamplificación para analizar la población de hongos entomopatógenos resultó exitosa ya que ésta permitió visualizar para cada aislamiento, la decimosexta parte de la totalidad de fragmentos de ADN (bandas) potencialmente analizables en matrices de acrilamida.

Se encontró una elevada diversidad genética entre los aislamientos de hongos entomopatógenos que conformaron la población estudiada; 100% de polimorfismo para 121 bandas generadas. Los coeficientes de similitud genética fueron menores a 0.50 entre aislamientos de un mismo grupo para la mayoría de casos, con excepción de los grupos C (*Beauveria sp.*) y E (*Metarhizium sp.*), cuyos integrantes poseen coeficientes de similitud mayores a 0.50 entre ellos; y varios de los cuales comparten más de 70% de similitud genética. Estos datos concuerdan con un estudio de genotipificación de *B. bassiana* mediante RAPD (Berretta et al. 1998), en donde se encontró que los aislamientos a partir de *Diatraea saccharalis* compartían un 80% de las 276 bandas obtenidas. Los datos de Berretta et al. (1998) son análogos a lo hallado en el grupo C de este estudio, en donde todos los aislamientos con coeficientes de similitud elevados son *Beauveria sp* provenientes de *Premnotrypes vorax*. Por otro lado, otra investigación llevada a cabo con RAPD y RFLP (Maurer et al. 1997) demostró que diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* provenientes de insectos coleópteros de diversas especies exhibieron un elevado grado de diferenciación genética, de manera también semejante a lo hallado para otros grupos del dendrograma generado en este estudio, que a pesar de estar constituidos por aislamientos del género *Beauveria*, exhibieron coeficientes de similitud menores a 0.50. Los bajos coeficientes de similitud evidenciados entre aislamientos de los demás grupos, se debe probablemente a la naturaleza más heterogénea de organismos que los conforman. Estos grupos circunscriben aislamientos de los géneros *Metarhizium sp.*, *Verticillium sp.*, *Candida sp* y cepas sin identificación morfológica.

El Análisis UPGMA mostró que varios grupos se hallan asociados por géneros (siete de doce), así como por géneros y hospedadores de donde fueron aislados (cinco de doce), pero nunca por el sitio donde fue colectado el hospedador, es decir, el lugar de origen del aislamiento. Análisis moleculares e isoenzimáticos previos en *Beauveria* spp. y otras especies de hongos entomopatógenos han provisto resultados ambiguos respecto a las posibles relaciones genotipo-hospedador y genotipo-distribución geográfica. De forma semejante a lo encontrado en el presente estudio, Poprawski et al. (1989) y Mugnai et al. (1989) hallaron aparentes correlaciones genotipo-hospedador en *Beauveria* empleando marcadores isoenzimáticos. Otras investigaciones empleando marcadores RFLPs y análisis de la región espaciadora interna transcrita (Viad et al. 1996; Neuveglise et al. 1994) también encontraron que la variación molecular entre aislamientos de *Beauveria* se relacionó con el rango de hospedador. Pese a lo anterior, varias otras publicaciones parecen no apoyar la existencia de una conexión confiable entre la identidad genética de los aislamientos, y la especificidad por hospedador ó su lugar geográfico de origen. Un estudio realizado por Bidochka et al. (1994) en las especies *Metarhizium anisopliae* y *Metarhizium flavoviride* mediante marcadores RAPD no arrojaron evidencia alguna de agrupamiento por preferencia de hospedador. Por su parte, Coates et al (2002) reportaron evidencia estadística insuficiente para correlacionar al alelo minisatélite *BbMin1* que emplearon para analizar una población de *Beauveria bassiana*, tanto con la preferencia de hospedador como con la localidad geográfica de recolección de los aislamientos.

La no existencia de agrupamientos asociados al lugar de origen de las cepas analizadas concuerda con lo expuesto por Poprawski et al (1988), quienes señalan que solo ocasionalmente se han reportado aparentes correlaciones entre cepas y su lugar

geográfico de origen por medio de análisis moleculares; poniendo en evidencia que este tipo de hallazgos es bastante inusual. Los grupos separados por género fueron A, C, D, E, F, I y J, de los cuales todos a excepción de A, e I también están separados por hospedador. Esto no necesariamente significa que exista un vínculo biológico estricto entre patógeno y hospedador, ya que de hecho los grupos C (género *Beauveria*) y E (género *Metarhizium*), muestran diferencias de hospedadores entre aislamientos muy cercanamente relacionados, como 30 y 31 (*Beauveria sp.*) y, 5 y 10 (*Metarhizium sp.*). Lo anterior lleva a pensar que ambos géneros de hongos entomopatógenos (*Beauveria* y *Metarhizium*) podrían tener una relativa tendencia o habilidad para infectar cierto tipo de insectos, sin embargo, también sugiere que no son específicos de un hospedador determinado. Lo más probable es que estos géneros de hongos sean entomopatógenos oportunistas capaces de infectar a un amplio rango de taxones de insectos, como lo apoyan otros estudios realizados por Glare & Inwood (1998), Aquino de Muro et al. (2003) y Rehner & Buckley (2005), en donde análisis moleculares de hongos del género *Beauveria* han demostrado desde su eventual capacidad para exhibir infectividad cruzada frente a insectos que no son sus hospedadores habituales, hasta un comportamiento entomopatógeno generalista en un amplio rango de hospedadores.

En lo referente al grupo E, donde dos aislamientos (5 y 10) mostraron una similitud genética cercana al 100% (coeficiente 0.97) aún cuando sus hospedadores y localidades difirieron completamente, varias publicaciones (St. Leger et al. 1992; Bidochka et al. 1994; Poprawski et al. 1989) han reportado previamente que aislamientos colectados en localidades geográficas distantes resultaron ser muy similares genéticamente; de modo que estos datos no constituyen un caso aislado, aunque la explicación de este fenómeno sigue siendo motivo de debate.

Asimismo, el fenómeno opuesto también ha sido documentado anteriormente (Berretta et al. 1998; Urtz y Rice 1997); en donde se ha puesto en evidencia que aislamientos de *Beauveria* originarios de la misma región y colectados a partir de las mismas especies de insectos pueden ser genéticamente distintos, de forma semejante a lo encontrado en el presente trabajo con los aislamientos 5 y 7. Éstos comparten tanto el lugar de recolección del hospedador (Alobuela, Pichincha) como el tipo de organismo de donde fueron aislados (adultos de *Macroductylus sp.*), pero contradictoriamente exhiben un grado de similitud genética inferior (0.74) al existente entre las cepas 5 y 10 (0.97), aún cuando éstas últimas no compartieron su lugar de origen ni su hospedador.

Si bien los resultados de esta investigación mostraron que las cepas altamente virulentas 5 (*Metarhizium*), 18 (*Beauveria*), y SALM1 (*Metarhizium*) no se dispusieron agrupadas en el dendrograma ni en el PCoA, y se evidenció la ausencia de marcadores asociados a la entopatogenicidad, (bandas comunes exclusivamente para aislamientos descritos como altamente patogénicos y/o agresivos); esto tampoco constituye un resultado aislado en la literatura. Tanto la elevada similitud genética entre cepas virulentas y no virulentas en unos casos, como la elevada variabilidad genética entre aislamientos infectivos en otros casos, han constituido un impedimento para encontrar patrones que permitan determinar de forma clara como se relaciona el genotipo con la patogenicidad. Investigaciones de Cravanzola et al. (1997) y Piatti et al. (1998) han reportado que la elevada similitud existente entre cepas de *Beauveria bassiana* (virulentas y no virulentas), no han permitido establecer una conexión coherente entre genotipo y patogenicidad. Para Cravanzola et al. (2007) lo anterior responde a que las diferencias entre la mayoría de cepas de *B. bassiana* representan simplemente variaciones menores de un genotipo común, y por tanto resulta complicado encontrar en

su genoma las regiones responsables de sus particularidades fenotípicas. De forma similar, un estudio realizado con la técnica PCR-RFLP de la región ITS del rRNA de *B. brongniartii* (Neuveglise et al. 1994) halló que todos los aislamientos de esta especie provenientes del insecto *Hoplochelus marginalis* que fueron analizados, resultaron ser genéticamente idénticos, sin importar su lugar de origen. Los autores interpretaron este hallazgo como evidencia sugerente de un vínculo entre genotipo y fenotipo patogénico, es decir, conjeturaron que un solo genotipo muy específico entre todos los existentes es capaz de infectar a *H. marginalis*.

En contraste, un estudio realizado por St. Leger et al. (2000) mediante marcadores SSR en *Aspergillus flavus* no halló similitudes genéticas significativas entre los genotipos infectivos, ni exclusivas a ellos. Del mismo modo, Urtz y Rice (1997) utilizando marcadores RAPD pudieron distinguir dos grupos genéticos separados de *Beauveria bassiana* que eran capaces de infectar a *Lissorhoptrus oryzophilus* en Louisiana-USA, los cuales resultaron divergentes entre sí en el 45% de las 172 bandas generadas. La explicación propuesta por los autores fue que los dos grupos representaban poblaciones patogénicas diferentes que convivían simpátricamente.

Contrariamente a lo antes citado y a lo hallado en este estudio, Berretta et al. (1998) en su investigación hallaron que tres de las cinco cepas catalogadas como altamente virulentas frente a larvas de *D. saccharalis* en la población que analizaron, se dispusieron juntas en uno de los grupos del dendrograma; ellos sugirieron que los aislamientos más virulentos deben estar asociados mediante algún carácter genético compartido.

Los aislamientos 5, 18 y SALM1 representan organismos con genomas poco similares unos a otros, pese a que los dos primeros pertenecen al mismo género (*Beauveria sp.*). El no haber detectado regiones del genoma comunes que sean exclusivas a estas cepas virulentas en este trabajo puede significar que la virulencia que presenta cada una de estas cepas tienen componentes genéticos independientes y no relacionados entre ellos, ó que los marcadores utilizados en este estudio no muestrearon las regiones del genoma responsables del mencionado fenotipo que son comunes entre estos aislamientos.

De hecho, para Devi et al. (2006) esta falta de correlación entre diferentes estudios que han empleado diversas técnicas moleculares en lo referente a taxonomía, agrupamientos, relación genotipo-hospedador, genotipo-sitio de origen y genotipo-patogenicidad se debe probablemente a que cada técnica muestrea regiones del genoma diferentes, y por tanto no siempre arrojan resultados que se correlacionen recíprocamente.

Respecto a la relación filogenética entre las cepas de Galápagos 18 (*Beauveria asmnon*) y 40 (*Candida sp.*) que las coloca dentro de un mismo grupo, una posible explicación sería que estos dos aislamientos posean regiones del genoma homólogas relacionadas con aspectos de supervivencia en ecosistemas con condiciones específicas del Archipiélago de Galápagos.

Por otro lado, es también interesante la relación de agrupamiento entre los aislamientos no identificados, 58, 60, 61 y 62, con las cepas del género *Beauveria* 15 (grupo H) y SHA (grupo K). Esto podría sugerir que dichos aislamientos no

caracterizados morfológicamente pertenecen al género *Beauveria* o a algún otro género de hongos entomopatógenos cercanamente relacionado con éste.

Finalmente, la relación de agrupamiento entre los aislamientos 32 (*Metarhizium*) y 43 (posible *Beauveria*) con un coeficiente de similitud genética de 0.50 sugiere un error de identificación de uno de los dos hongos, siendo la cepa 43 la más susceptible de pertenecer al género *Metarhizium*, dado que en su registro del INIAP no se asegura que pertenezca al género *Beauveria*, solo se lo propone como posible.

9. Conclusiones

El uso de primers de preamplificación AFLP permitió visualizar un elevado grado de variabilidad genética entre los aislamientos de la mayoría de grupos presentes en el dendrograma. Se evidenció agrupaciones por género y preferencia de hospedador para varios grupos, lo que podría significar que estos organismos tienen una relativa tendencia a infectar a cierto tipo de insectos preferentemente.

No se hallaron caracteres genéticos que relacionen exclusivamente entre sí a los aislamientos descritos como altamente virulentos por investigaciones previas del INIAP. Se halló que los aislamientos sin identificación morfológica aparentemente estarían más relacionados en términos genéticos con individuos del género *Beauveria*.

10. Recomendaciones

Se debería utilizar sets de primers de preamplificación y amplificación selectiva AFLP con menor cantidad de bases selectivas para poder obtener patrones fingerprint que permitan muestrear de mejor manera los genomas de hongos entomopatógenos de este tipo. También sería aconsejable realizar nuevos estudios utilizando otros

marcadores moleculares (SSR, SNP, RAPD, etc.) que permitan cubrir diferentes y más diversas zonas genómicas; esto permitiría ampliar las posibilidades de encontrar relaciones entre el genotipo y la virulencia de los aislamientos.

11. Referencias

1. Al-Samarrai T.H. and Schmid J. 2000. A simple method for extraction of fungal genomic ADN. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 53–56.
2. Aquino de Muro M., Mehta S., Moore D. 2003. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiology letters* 229, 249-257. Elsevier Press.
3. Ayala O. 2006. Determinación de agresividad de Hongos Entomopatógenos para *Macrodactylus* sp. (Catzó del Maíz): Chillanes-Bolívar. Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador.
4. Aytül Incirli. 2000. Assessment of Polymorphic AFLP Markers in *Triticum durum* and *Aegilops* sp. *Turk J Biol.*
5. Barriga E. 2003. Evaluación de la Patogenicidad y Multiplicación en sustratos de aislamientos de *Beauveria brogniartii* y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Premnotrypes vorax* en el laboratorio y campo. Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Central del Ecuador.
6. Berretta, M.F., Lecuona, R.E., Zandomeni, R.O., and Grau, O. 1998. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. *J. Invert. Pathol.*: 145–150.
7. Bidochka, M.J., McDonald, M.A., St. Leger, R.J., and Roberts, D.W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic ADN
8. (RAPD). *Curr. Genet.*: 107–113.
9. Cloyd, Raymond A. 2002. *The Entomopathogenic Fungus Metarhizium anisopliae*, *Midwest Biological Control News*, Vol VI No 7
10. Coates B. S., Hellmich R. L, & Lewis L. C. 2001. Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. Published on the NRC Research Press Web site at <http://genome.nrc.ca>
11. Cravanzola, F., Piatii, P., Bridge, P.D., and Ozino, O.I. 1997. Detection of genetic polymorphism by RAPD–PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha* spp.). *Lett. Appl. Microbiol.*: 289–294.
12. De Bach, P. 1964. *Control Biológico de Insectos, Plagas y Malas Hierbas*. 8va. Edición. Traducido por Carlos Castaños; Editorial Continental, S. A. México D. F.

13. Dorta, B & Arcas, J. 2003. Producción de Hongos Entomopatógenos. Dpto. Biología Celular, Fac. de Ciencias Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
14. Duarte M., João Bosco dos Santos y Leonardo Cunha Melo. 1999. "Comparision of similarity coefficients base don RAPD markers in the common Bean" Genetics and Molecular Biology.
15. Glare T. R., Inwood A. J. 1998. Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. Mycological Research:250-256 Cambridge University Press
16. Grattapaglia D. M. Ferreira. 2000. "Clases de Marcadores Moleculares para el análisis Genético". CENARGEN/EMBRAPA, Universidad de Brasilia.
17. Invitrogen Life Technologies. 2003 "Instruction Manual: AFLP® Analysis System I and Starter Primer Kit". Catalog nos. 10544-013 and 10483-014, version B.
18. Landázuri P. 2003. Prospección y Evaluación de cepas de *Beauveria* sp. y *Metarhizum* sp. en las provincias de Carchi, Cotopaxi, Chimborazo y Cañar, para el control biológico de Gusano Blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*). Instituto de Postgrado-Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí-Ecuador.
19. Li Z. Z., Li C. R., Huang B., Fan M. Z. (2001). "Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus". *Chinese Science Bulletin* 46: 751–753.
20. Lomer C. J, Bateman R. P., Johnson D. L., Langewald J., and Thomas M.. 2001. BIOLOGICAL CONTROL OF LOCUSTS AND GRASSHOPPERS. *Annu. Rev. Entomol.* 2001. 46:667–702.
21. Magnai, L., Bridge, P.A., and Evans, H.C. 1989. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycol. Res.*: 199–209.
22. Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P.A., Bridge, P.D., and Riba, G. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.*: 159–164.
23. Neuveglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B., and Riba, G. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycol. Res.*: 322–328.
24. Nuez F. & Carrillo J. M. 2000. LOS MARCADORES GENÉTICOS EN LA MEJORA VEGETAL. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia-España.
25. Poprawski, T.J., Riba, G., Jones, W.A., and Aioun, A. 1989. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Ent.*: 275–279.

26. Ramón D. et al. 2005. Biotecnología en el sector alimentario. Genoma España. Fundación española para el desarrollo de la investigación en genómica y proteómica.
27. Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). "A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs". *Mycologia* 97: 84-98
28. Rohlf F. J. 1998. "Guía para el uso del programa NTSYS-pc" Introducción a la taxonomía.
29. Rueda M., 2005. Prospección de Hongos Entomopatógenos para *Macroductylus pulchripes* Blanchard (Aguacuro del Maíz), y su comportamiento de ovipostura: san José de Minas, Pichincha. Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador.
30. St. Leger, R.J., Allee, L.L., May, B., Staples, R.C., and Roberts, D.W. 1992. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycol. Res.* : 1007–1015.
31. Torres H., Ortega A., Alcazar J., Ames T., Palomino L. 1993. Control biológico del Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes* sp.) con *Beauveria brongiartii*. Guía de investigaciones CIP8. Centro Internacional de la papa, Lima-Perú.
32. Uma Devi K., Reineke A., Nageswara Rao Reddy N., Uma Maheswara Rao C., and
33. Padmavathi J.. 2006. Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Genome* 49: 495–504. NRC Research Press.
34. Urtz, B.E. and Rice, W.C. 1997. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptus oryzophilus*. *Lett. Appl. Microbiol.*: 405–409.
35. Valverde I. 2004. Aislamiento e Identificación de Hongos Entomopatógenos y pruebas de patogenicidad en *Cosmopolitas sordidus* y *Metamasius hemipterus* en condiciones de Laboratorio: San Cristóbal-Galápagos. Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador.
36. Viaud, M., Couteaudier, Y., Levis, C., and Riba, G. 1996. Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint. *Fungal Genet. Biol.*: 175–183.
37. Weiland J.J & Sundsbak J. L. 2000. Differentiation and Detection of Sugar Beet Fungal Pathogens Using PCR Amplification of Actin Coding Sequences and the ITS Region of the rRNA Gene. Volume 84, Number 4 Pages 475-482.

38. Zare Rasoul, Gams Walter. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. 2008. Mycological Research 112: 811 – 824.
39. Zimmermann Gisbert. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology. Taylor and Francis Group, p.553-596
40. Zimmermann Gisbert. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology. Taylor and Francis Group, p.879-920