



INIAP INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS

Estación Experimental: Santa Catalina

Departamento: Protección Vegetal. (DNPV)

Proyecto: Caracterización de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos,

Actividad: Análisis de la diversidad genética de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos procedentes de cultivos de maíz, papa y plantas ornamentales presentes en la Región Interandina.

Ubicación: Estación Experimental Santa Catalina
Universidad San Francisco de Quito (USFQ)

Autor: Egdo. Pedro José González

Coautores: Ing. Patricio Gallegos (DNPV)
Dr. Venancio Arahana (USFQ)

Colaborador (es): INIAP – EESC - DNPV

Fecha de inicio: Junio 2008

Fecha de terminación: Diciembre 2008

Financiamiento: 70% CEREPS, 20% INIAP, 10% Universidad San Francisco.

1. Antecedentes

Las enfermedades fúngicas en los insectos son comunes y frecuentemente diezman poblaciones completas. Los hongos entomopatógenos están asociados con insectos que habitan diversos ambientes, incluyendo ecosistemas agrícolas, forestales y pastoriles, así como en aguas dulces, y suelos. (Hajek et al., 1994).

En la actualidad, la preocupación de conservar el medio y evitar al máximo los riesgos de salud asociados con el uso de insecticidas químicos ha estimulado los esfuerzos por desarrollar agentes de control biológico como alternativa o complementos al uso de químicos. En consecuencia, el desarrollo de micoinsecticidas tiene una gran aceptación, lo cual, ha permitido un gran auge en su comercialización (Zavaleta, 1999).

El Departamento de Protección Vegetal de la EESC, ha desarrollado diferentes investigaciones entre las que consta una prospección de hongos patógenos de insectos plaga de cultivos importantes como son papa y maíz en la Región Interandina. Como resultado de este trabajo se cuenta con una colección de hongos entomopatógenos procedente de los principales lugares de producción de estos cultivos (Gallegos y Asaquibay, 2004).

En el caso de papa, se dispone de cepas de los hongos *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.* para el control del gusano blanco *Premnotrypes vorax*, las cuales, en pruebas experimentales mostraron un grado de efectividad desde el 30% hasta el 90%. (Barriga, 2003). En el cultivo de maíz, en áreas de Pichincha y de Bolívar, se presenta con características de plaga el insecto *Macrodactylus spp.*, para lo cual se realizaron colectas de cepas de los hongos *Beauveria sp.* y *Metarhizium sp.*, que estaban presentes en los cultivos. El tercer cultivo, que consta en la propuesta de este proyecto, son ornamentales en las que no se ha realizado, previamente, trabajo alguno. El hongo motivo de estudio es *Entomophthora sp.*, el cual afecta a insectos de la familia Aphididae (áfidos) y de Aleyroridae (mosca blanca).

Estudios realizados en Perú, indican la existencia de una alta variabilidad intra específica en varios hongos entomopatógenos como *Beauveria brongniartii*, *Beauveria bassiana*, y *Paecilomyces fumosoroseus* (Vélez et al., 2000). Esta variabilidad se manifiesta, entre otras cosas, como diferencias en los niveles de virulencia entre razas o biotipos, por ello se debe considerar a los aislamientos como entidades individuales para estudios de selección y/o caracterización. Los hongos entomopatógenos presentan variaciones genéticas debido a su característica de parasexualidad (Zambrano Bullones et al., 2002). Los análisis moleculares del ADN permiten detectar las variaciones entre los aislamientos, por ejemplo razas o patotipos diferentes (Riba et al., 1989). La importancia de estos estudios radica en la exactitud de las identificaciones, permitiendo a la industria de bioplaguicidas contar con aislamientos más puros, haciendo así más eficiente el proceso (Zambrano Bullones et al., 2002).

Por lo tanto, el uso de marcadores moleculares, puede brindar información valiosa para determinar la diversidad genética de los hongos entomopatógenos colectados por el Departamento de Protección Vegetal del INIAP. La metodología más utilizada para el estudio de la diversidad genética de estos hongos han sido los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA ó amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN) (Zambrano Bullones et al., 2002). Sin embargo, en este estudio se plantea el uso de los AFLP (amplified fragment length polymorphisms ó fragmentos de amplificación polimórfica), debido a que representa una metodología más confiable y reproducible de sus resultados, aparte de que genera información más rápidamente, permitiendo, eficazmente, la cobertura del genoma. Esta metodología consiste en la combinación de los métodos de PCR y análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en la secuencia de ADN que comprende los sitios de corte de las enzimas de restricción, y la selección de fragmentos mediante primers que contienen tres bases elegidas al azar. Los cambios en las bandas generadas se perciben como patrones diferentes, en número y tamaño. (Caetano-Anolles et al., 1991).

2. 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 la reducción del uso de biopresticidas. 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, ha sido clasificada desde el punto de vista morfológico y en su eficiencia como controlador biológico y necesita de una clasificación 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 cepas de hongos en diversos climas y condiciones agroecológicas, indicaría la existencia de una alta variabilidad genética en la especie. Actualmente, la forma más certera de determinar los niveles de diversidad y estructura genética 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.

3. Objetivos

3.1. General

Analizar la diversidad genética de 45 aislamientos de *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.* y *Entomophthora sp.*; mediante la metodología de los AFLPs.

3.2. Específicos

- Establecer un protocolo eficiente de extracción de ADN de alta calidad de los distintos aislamientos.
- Determinar la diversidad genética de los 45 aislamientos de hongos entomopatógenos mediante AFLPs.
- Procurar 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. Hipótesis

Ho. Los 45 aislamientos de *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.* y *Entomophthora sp.*, no presentan variabilidad genética intra-específica alguna.

Ho. Los 45 aislamientos de *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.* y *Entomophthora sp.*, presentan variabilidad genética inter o intra-específica.

5. Materiales y Métodos

5.1 Materiales

Material Laboratorio

- | | |
|--------------------------|----------------------|
| ▪ Vasos de precipitación | ▪ Morteros |
| ▪ Erlenmeyer | ▪ Tubos eppendorf |
| ▪ Parafilm | ▪ Micro pipetas |
| ▪ Cajas petri | ▪ Puntas plásticas |
| ▪ Probetas | ▪ Gradillas para PCR |

Equipo laboratorio

- Estereomicroscopio.
- Incubadora
- Refrigeradora
- Termociclador

- Fuente de poder
- Cámara de Electroforesis Vertical
- Computadora
- Escáner
- Horno microondas

Reactivos

- Kit AFLP's Analysis System 1, INVITROGEN
- Agua destilada
- Alcohol al 70% y 90%
- Hipoclorito de sodio al 5%
- Medio sólido Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Medio Agar nutritivo
- Acrilamida
- Bis - Acrilamida
- TEMED
- Persulfato de Amonio
- Hidróxido de Sodio
- TBE 10X
- DNA Ladder 10bp
- Nitrado de Plata

Material Biológico

Colección de hongos entomopatógenos de INIAP- EESC (ANEXO 1).

5.2. Metodología

5.2.1 Ubicación

La investigación se realizara en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

Como material biológico se empleara de la colección de cepas de hongos entomopatógenos que dispone el Departamento de Protección Vegetal de la

Estación Experimental Santa Catalina del INIAP. A esta colección se agregarán nuevos aislamientos, especialmente en el caso del hongo *Entomophthora*, el cual puede provenir de insectos de la familia *Aphididae* y *Aleyrodidae*.

5.2.2 Tratamientos

Los tratamientos estarán constituidos por 45 accesiones de hongos entomopatógenos entregados por el Departamento de Protección Vegetal del INIAP.

5.2.3 Unidad de Estudio

La unidad experimental estará constituida por una muestra de hongos entomopatógenos en el cual se obtendrán los patrones de bandas resultado de la amplificación de ADN de los 45 aislamientos de hongos entomopatógenos en estudio con una combinación de primers del Kit de AFLPs.

5.2.4 Análisis Estadístico

La matriz de datos binarios, generada mediante el análisis visual de los patrones de bandas en los geles, será procesada mediante el uso del programa NT-SYS 2.0, para realizar un análisis de agrupamiento y generar un dendrograma de similitud usando el coeficiente de Jaccard. Mediante el programa Winboot se hará un análisis bootstrap, para determinar el nivel de confiabilidad del dendrograma generado. De ser necesario se hará un análisis multivariado (PCO).

5.2.5 Variables

- a) El nivel de polimorfismo se combinará con el porcentaje de bandas polimórficas en relación del total de bandas generadas por el gel.
- b) Diversidad genética obtenida por NT-SYS 2.0 en análisis de agrupamiento.

5.2.6 Manejo del Experimento

5.2.6.1 Banco vivo de tejidos

Con las muestras recibidas del INIAP, se procederá a crear un banco vivo de cepas. Se repicará cada uno de los aislamientos por el método del estriado

en un medio PDA base, con 40 mg/L de gentamicina. Se sembrarán por lo menos en dos cajas de PDA, con el fin de obtener la suficiente cantidad de masa miceliar para realizar la extracción de ADN de este tejido.

5.2.6.2 Extracción de ADN

Se seguirá la metodología del CTAB (Shagay Maroof, 1984), con algunas variantes, convenientes para la extracción de ADN de hongos (Weiland, 2000). El protocolo a seguirse consta en el ANEXO 2.

5.2.6.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizará con el uso de un Qubit Fluorometer (INVITROGEN); siguiendo el protocolo establecido en el manual de instrucciones del equipo.

5.2.6.4 Screening de primers

Se probarán las 10 combinaciones de primers para Eco RI y para Mse I del AFLP® Analysis System I, AFLP® Starter Primer Kit; para luego elegir aquellas que produzcan el mejor número de bandas en cada especie, con las cuales se hará el análisis final para determinar la diversidad genética de las 45 aislamientos, usando el ADN de un aislamiento de cada una de las especies de hongos en estandarizar.

5.2.6.5 Amplificación selectiva del ADN por AFLPs

Se seguirá el protocolo de INVITROGEN para el corte del ADN con enzimas de restricción, ligamiento de primers, preamplificación, y amplificación selectiva.** (User Manual INVITROGEN, AFLP® Analysis System I, AFLP® Starter Primer Kit).

** En este punto, es importante resaltar algunos conocimientos básicos de la técnica, para el entendimiento concreto del proceso. La técnica de análisis molecular de AFLPs, se basa en el marcado de una huella de DNA. Esta huella será utilizada para visualizar el polimorfismo que pueda existir entre muestras diferentes (Tanksley et al., 1989); lo cual puede llevar a determinar la identidad de cada análisis y establecer relaciones genéticas entre las muestras que se

utilicen. Algo que hace peculiar a esta técnica de marcadores moleculares, es que utiliza una mezcla de dos tipos de tecnologías que se han utilizado desde hace algún tiempo atrás. Estas dos estrategias se basan en la hibridación mediante el uso de enzimas de restricción, y la amplificación del DNA usando “primers” específicos mediante PCR (Vos, et al., 1995)

Por lo tanto lo que se realiza en este paso de la metodología, de manera general, es una restricción por medio de enzimas del DNA, seguido por una ligación de la doble cadena de DNA mediante adaptadores ligados a los extremos de este DNA, lo cual dará como resultado DNA que va a ser contemplado para la amplificación por medio de PCR (Figura 1).

Para todo este proceso, se va utilizar un Kit específico de AFLPs, el cual ha sido desarrollado para el análisis de genomas de tamaños determinados, con lo cual se puede asegurar la eficiencia del proyecto. Se debe destacar que el Kit de Análisis de AFLPs, es desarrollado por la empresa INVITROGEN, lo cual garantiza la validez del producto, además de certificar los resultados que se obtengan de los análisis (User Manual INVITROGEN, AFLP® Analysis System I, AFLP® Starter Primer Kit). Ejemplo, Figura 1.

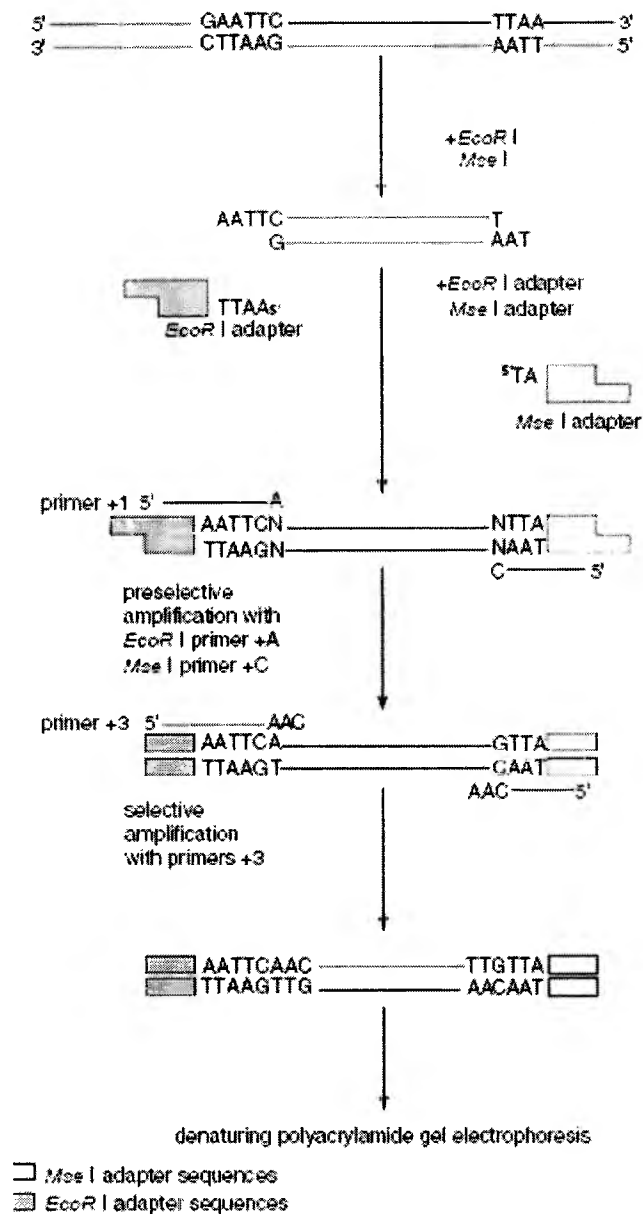


Figure 1. Example of the AFLP[®] procedure using one primer pair.

Los productos del PCR serán visualizados en geles de 6% de poliacrilamida desnaturizante. La toma de datos se hará visualmente para generar una matriz de datos primaria, la cual luego será analizada mediante un software adecuado que permita establecer las relaciones genéticas entre los aislados y el agrupamiento correspondiente basado en similitud.

Se correlacionarán los datos morfológicos, fisiológicos y de patogenicidad de los hongos, determinados por el INIAP, con los resultados del análisis molecular, para tratar de encontrar alguna asociación entre ellos.

6. CRONOGRAMA

Actividad	Participantes	Mes						
		1	2	3	4	5	6	7
Logística e intercambio de información y material con INIAP	Pedro González, Venancio Arahana, Patricio Gallegos	X	X					
Incremento de micelio para extracción de ADN	Pedro González	X	X	X				
Extracción de ADN de los aislados	Pedro González, Venancio Arahana	X	X	X	X			
PCR, electroforesis, y toma de datos de geles	Pedro González, Venancio Arahana		X	X	X	X		
Análisis de datos y búsqueda de asociaciones	Pedro González, Venancio Arahana			X	X	X	X	X
Redacción informe final	Pedro González, Venancio Arahana Patricio Gallegos					X	X	X

7. PRESUPUESTO Y COSTOS DIRECTOS

Rubro	Unidad	Cantidad	V. Unit USD	Valor Total USD
Mano de obra				
Becario	Mensual	7	280	1960

Rubro	Unidad	Cantidad	V. Unit USD	Valor Total USD
Análisis Molecular				
Banco in vivo	1	200	3.65	365
Extracción de ADN	1	100	2.91	291
Cuantificación ADN	3	40	5.00	200
Amplificación AFLP	1	100	22.73	2273
Análisis Poliacrilimida	1	20	32.8	656
TOTAL				3785

Rubro	Unidad	Cantidad	V. Unit USD	Valor Total USD
Elaboración Documento				
Fotos	Escaneo	20	0.25	5
Impresiones, copias, etc.	Hojas	200	0.10	20
Empastado	Und.	3	10	30
TOTAL				55

RUBRO	COSTO	FUENTE
Becario	\$ 1960	CEREPS
Análisis Molecular	\$ 3785	CEREPS
Elaboración Documento	\$ 55	USFQ
Costo Total	\$ 5800	

Fuente de Financiamiento	% Aporte
Proyecto CEREPS 21.00.029.001	70
INIAP (Departamento Protección Vegetal)	20
Universidad San Francisco de Quito (Laboratorio de Biotecnología Vegetal)	10
TOTAL	100

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Barriga, E. 2003. Evaluación de la Patogenicidad y Multiplicación en de *Beauveria sp.i* y *Metarhizium anisopliae*, para el control de *Premnotrypes vorax*, en laboratorio y campo. Tesis Ing. Agro. Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 107p.
2. Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., and Gresshoff, P.M. 1991. *Bio/Technology* 9, 553.
3. Gallegos, P., Asaquibay, C. 2004. Memorias de actividades del área de entomología ciclo: 2002-2003. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP-EESC-DNPV).
4. Hajek, A. y R., St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
5. Riba, G. y Silvy, C. 1989. Combattre les ravageurs des cultures, enjeux et perspectives. INRA. PARIS. p. 126- 130.
6. Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., and Bonierbale, M.W. 1989. *Bio/Technology* 7, 257.
7. Vélez, A.P; Gonzáles, M; Valderrama, A; Estrada, M; Bustillo, A; Montoya, E; 2000. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. *CENICAFE* 51(3): 196-206.
8. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Freijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407.
9. Saghai-Marooof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, & Allard RW. 1984. *PNAS* 81:8014-8018.
10. Zambrano Bullones K., M. Dávila, M. A. Castillo. 2002. Detección de fragmentos de ADN de hongos y su posible relación con la síntesis de proteínas de actividad entomopatógena. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 19: 185-193.
11. Zavaleta, E. 1999. Control Biológico de Fitopatógenos. En: X Curso Nacional de Control Biológico. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. p. 162- 163.
12. John J. Weiland. 2000. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. USDA-ARS, Northern Crop Science Laboratory.

ANEXO 1

Protocolo para la extracción del ADN

1. Colocar el material vegetal a 4 °C.
2. Extraer alrededor de 150 mg de tejido miceliar de hongo.
3. Pesar el reactivo White quartz sand (-50 + 70 mesh; Sigma Co. product # S-9887), en relación 3:1 con respecto a la muestra de tejido miceliar extraído.
4. En un mortero limpio, colocar el tejido miceliar de hongo y el reactivo Sand, white quartz, mesh.
5. Añadir 1000 µl de CTAB al mortero y macerar toda la mezcla hasta lograr una consistencia homogénea.
6. Colocar la mezcla en un tubo eppendorf 1.7 mL esteril.
7. Añadir 10 µl de β – Mercaptoetanol al tubo eppendorf (10 µl de β – Mercaptoetano l/ml de CTAB).
8. Incubar a 62 °C por 60 minutos, agitándolo (invirtiendo) cada 15 minutos.
9. Añadir 200 µl de solución de Cloroformo – Octanol (24:1).
10. Agitar continuamente por inversión por 20 minutos.
11. Centrifugar durante 5 minutos a 13200 RPM.
12. Remover la fase acuosa superficial (color transparente) y pasarla a un nuevo tubo eppendorf rotulado.
13. Precipitar el ADN añadiendo alcohol isopropílico a 4 °C en relación de 0.8 a 1 veces del volumen original.
14. Agitar los tubos suavemente hasta ver los hilos de ADN formándose en la solución.
15. Centrifugar de 3 minutos a 5000 RPM hasta que aparezca el pellet (color blanco).
16. Descartar el sobrenadante.
17. Lavar el ADN con 500 µl de Etanol (70 %) y agitar hasta que se despegue el pellet.
18. Remover el etanol con una micropipeta cuidando de no absorber el pellet.
19. Dejar secar.
20. Resuspender en 70 – 100 µl de TE o Agua destilada.

ANEXO 2

**Colección de hongos entomopatógenos del Departamento de Protección Vegetal,
EESC - INIAP**