

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología



Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)
Centro de Investigaciones en Café (CICAPE)

Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno
Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de
Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

Fabián Echeverría Beirute

Cartago, Enero, 2006

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *BEAUVERIA BASSIANA* (BÁLSAMO) VUILLEMIN

Fabián Echeverría Beirute*

Resumen

La broca del café (*Hypothenemus hampei*) es una plaga de los cafetales costarricenses. Como estrategia de control, se emplea el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Diez aislamientos de diferentes zonas del país fueron evaluados biológicamente según su Tasa Diaria de Crecimiento Radial (TDCR), producción de esporas, resistencia a la luz Ultravioleta y patogenicidad ante la broca. Además, se caracterizó molecularmente mediante 8 parejas de iniciadores para microsátélites específicos. Se realizaron cultivos monospóricos como base. La TDCR evidenció diferencias significativas en tres cepas ($P=0,05$), y para la producción de esporas, reveló que estadísticamente ($P=0,01$) se comportan dentro de dos tipos: los de alta y los de reducida esporulación. La germinación de esporas irradiadas por 30 minutos, fue mayor del 82% en seis aislamientos, donde tres alcanzaron el 100%, evidenciando la posibilidad de ser resistentes. La evaluación de la agresividad ante la broca, reveló una colonización del 100% antes de los 9 días de la exposición inicial en dos cepas. Respecto a la caracterización molecular, siete parejas mostraron alta variabilidad alélica, permitiendo la construcción de un dendrograma. Los grupos de aislamientos evidenciaron gran diversidad: todos los aislamientos son cepas, pocas muy relacionadas, dos muy distanciadas genéticamente. Ninguna relación biológica o geográfica pudo correlacionarse con algún grupo clasificado.

Palabras Clave: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, broca, entomopatógeno, control biológico, Manejo Integrado de Plagas, caracterización molecular, microsátélites

* Informe de Trabajo Final de Graduación, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ISOLATIONS OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *BEAUVERIA BASSIANA* (BALSAMO) VUILLEMIN

Fabián Echeverría Beirute*

Abstract

The Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) is a plague of the Costa Rican plantations. As control strategy, the entomopathogenic mushroom *Beauveria bassiana* is used. Ten isolations from different areas of the country were evaluated biologically according to their Daily Rate of Radial Growth (DRRG), production of spores, resistance to Ultraviolet light and aggressiveness to CBB. Also, they're molecularly characterized using 8 couples of specific microsatellite primers. Single spore culture was made as base. The DRGG provide significant differences on three strains ($P=0,05$) and production of spores revealed that statistically ($P=0,01$), they behave on two types: those of high and those of reduced spore's production. Germination of 30 minutes irradiated spores were higher than 82% in six isolations, where three reached 100%, evidencing the possibility of resistance. The aggressiveness evaluation revealed a colonization of 100% before 9 days of the initial exposure in two strains. Regarding to the molecular characterization, seven couples showed high allelic variability, allowing the construction of a dendrogram. The isolation groups evidenced high diversity: all isolates are strains, few very related, two are very genetically distanced. No biological or geographical relationship could be correlated with any classified group.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, CBB, entomopathogenic, biological control, Pest Control, molecular characterization, microsatellite

* Graduation Final Work Report, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE
AISLAMIENTOS DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO
BEAUVERIA BASSIANA (BÁLSAMO) VUILLEMIN

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico
de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller
en Ingeniería en Biotecnología

Miembros del Tribunal

MSc. Johnny Peraza Moraga
Profesor Asesor ITCR

MSc. Miguel Barquero
Asesor Externo

MSc. Jorge Madriz
Lector

*D*edicatoria

A mis padres, por su gran
esfuerzo, dedicación,
consejos y ejemplo

Agradecimientos

Deseo agradecer a las siguientes personas por su colaboración, directa o indirecta, en la realización del presente trabajo:

A todo el personal del CICAPE, especialmente:

Al Ingeniero Carlos Fonseca, por permitirme laborar para el Laboratorio de Fitopatología del CICAPE.

Al MSc. Miguel Barquero Miranda, por su tiempo, interés, observaciones y recomendaciones.

Y a la Ing. Flory Sánchez Saborío por su enorme disposición y atención brindada, ayuda y valiosos consejos.

Al MSc. Jorge Madriz Muñoz por su asesoría y atención brindada hacia el presente trabajo.

Al MSc. Johnny Peraza Moraga, por su apoyo humano y profesional, confianza, disposición y conocimientos fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A mi compañero Julio Cesar Gómez González por su disposición y ayuda brindada durante el trabajo en laboratorio.

A mi familia, especialmente mis padres, Rita y Gastón, y mis hermanos Esteban y Gabriel, por creer en mí, motivarme y enseñarme con el ejemplo a luchar por aquello que uno desea.

A mis amigos de la PFC y CNN, porque más que una amistad he ganado una gran familia.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	3
1. REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1 El café en Costa Rica	4
1.2.1 Generalidades e Historia.....	5
1.3 Manejo Integrado de Plagas.....	7
1.4 Enemigos Naturales	8
1.5 <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin	11
1.5.1 Morfología y Ciclo de Vida	11
1.5.2 Proceso de infección	13
1.5.3 Control Biológico.....	15
1.6 Técnicas en Biología Molecular	17
1.6.1 Caracterización Molecular	18
1.6.2 Utilización de los microsatélites como herramienta de caracterización	20
1.6.2.1 PCR iniciada por microsatélites.....	22
1.6.2.2 PCR iniciado por región conservada de microsatélite	22
1.6.2.3 Obtención de los iniciadores	23

1.6.3	Caracterización por microsatélites	25
1.7	Estudios moleculares en <i>Beauveria bassiana</i>	26
2.	MATERIALES Y METODOS	28
2.1	Obtención de las muestras	28
2.2	Cultivo monospórico.....	30
2.3	Preparación de las matrices sólidas.....	33
2.4	Caracterización Biológica.....	33
2.4.1	Evaluación del grado de esporulación	34
2.4.2	Evaluación del crecimiento radial.....	34
2.4.3	Evaluación de la resistencia a la luz Ultravioleta	36
2.4.4	Evaluación de la agresividad ante la broca	39
2.5	Caracterización Molecular	41
2.5.1	Extracción de ADN.....	41
2.5.1.1	Protocolos evaluados.....	41
2.5.1.2	Evaluación de la calidad y pureza.....	43
2.5.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	44
2.5.2.1	Ensayos con RAPD´s.....	44
2.5.2.2	Evaluaciones con microsatélites	45
2.5.3	Separación electroforética de los productos amplificados	46
2.5.3.1	Interpretación de las bandas.....	47
2.5.4	Elaboración del dendrograma	47
3.	RESULTADOS.....	48
3.1	Cultivo Monospórico	48
3.2	Preparación de las matrices sólidas.....	48
3.3	Caracterización Biológica.....	49
3.3.1	Evaluación del grado de esporulación	49
3.3.2	Evaluación del crecimiento radial.....	50
3.3.3	Evaluación de la resistencia a la luz Ultravioleta	52
3.3.4	Evaluación de la agresividad ante la broca	54
3.4	Caracterización Molecular	59

3.4.1 Extracción del ADN.....	59
3.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y electroforesis.....	61
3.2.3 Tipificación.....	64
4. DISCUSIÓN.....	66
4.1 Grado de esporulación.....	66
4.2 Crecimiento radial.....	68
4.3 Tolerancia a la luz Ultravioleta.....	68
4.3 Agresividad ante la broca.....	70
4.5 Extracción del ADN.....	72
4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Tipificación.....	73
5. CONCLUSIONES.....	79
6. RECOMENDACIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXOS.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Núm.	Título	Pág.
1	Sitios de recolección de las diferentes muestras de <i>Beauveria bassiana</i>	29
2	Secuencia nucleotídica de los imprimadores utilizados durante el ensayo RAPD's	44
3	Secuencia y principales características de los 8 pares de imprimadores empleados	46
4	Tasa Diaria del Crecimiento Radial y varianza para los diferentes Aislamientos	51
5	Resumen de las diferentes evaluaciones biológicas y la escala de valor otorgado para cada parámetro	58
6	Comparación de los principales resultados obtenidos para los diferentes protocolos de extracción evaluados	59
7	Valor de absorbancia obtenido para evaluar la pureza y calidad del ADN extraído	61
8	Rango y número de fragmentos obtenidos con microsátélites	64
9	Cálculos empleados para la obtención de soluciones diluidas de esporas para cada muestra de Bb, utilizadas para el crecimiento de micelios monospóricos	90
10	Concentraciones y volúmenes requeridos de reactivos de PCR para la preparación de la Master Mix	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Insecto adulto de broca y en grano de café	5
2	Estructuras morfológicas principales del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	12
3	Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración	14
4	Esquema de la metodología tradicional vs. método PIMA para aislamientos de microsatélites	25
5	Ubicación geográfica de los sitios de colecta	29
6	Diagrama de la metodología empleada para la obtención de micelios monospóricos aislados y su cálculo correspondiente, a partir de cultivos multiespóricos	31
7	Procedimiento de obtención de cultivos monospóricos	32
8	Procedimiento para evaluación del crecimiento radial	35
9	Procedimiento para la evaluación de las muestras a la luz Ultravioleta	38
10	Patrón de crecimiento de tres inóculos de <i>Beauveria bassiana</i> a los 22 días de inoculado en medio PDA	48
11	Matrices sólidas	49
12	Concentración promedio de esporas/ml ($\times 10^6$) por gramo de arroz contabilizadas para los diferentes aislamientos de Bb	50
13	Apariencia del crecimiento radial en placa	51
14	Crecimiento radial promedio de las diferentes muestras	52
15	Porcentaje promedio de germinación para las muestras tratadas con luz UV	54
16	Sobrevivencia promedio de las brocas luego de la exposición a una solución de Bb para cada muestra	55
17	Esporulación en las brocas	56

18	Textura y nivel de esporulación de las brocas expuestas a los diferentes aislamientos de Bb	56
19	Número de brocas esporuladas promedio luego de la exposición a una solución de Bb	57
20	Pasos y resultados obtenidos para la extracción de ADN	59
21	Comparación del revelado de corrida de electroforesis para las diferentes extracciones de ADN de las muestras	60
22	Diagrama del patrón de bandas reveladas para la evaluación con microsatélites	62
23	Dendrograma basado en los marcadores de microsatélites en la caracterización molecular de los aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i>	65

ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Preparación de medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa)	89
2	Preparación de medio de cultivo PDA con tetraciclina	89
3	Protocolo para obtención de cultivos monospóricos	90
4	Protocolo de PCR para microsatélites	91
5	Preparación de Amortiguador TAE 1X (1 litro)	91
6	Preparación de gel de agarosa 3%	92

INTRODUCCIÓN

La naturaleza es una compleja red de interrelaciones entre el ambiente y los seres vivos que dependen unos de otros para sobrevivir. Debido a su basta complejidad, la coexistencia de los diferentes organismos conlleva a su adaptación y evolución, dando origen a diferentes niveles de relaciones biológicas. Algunas de estas interacciones, han sido encontradas debido a su presencia en plantaciones de alto interés social y/o económico; en unos casos favoreciendo el cultivar, y en otros afectándolos.

La masificación e industrialización de los productos agrícolas, han acarreado en su desarrollo, un consecuente aumento de enfermedades, que generan pérdidas económicas sustanciosas, impacto al ambiente y disminución de la calidad de los productos.

El control de plagas ha ocasionado un uso excesivo y pocas veces eficientemente selectivo de plaguicidas, los cuales, se conoce producen resistencia, daños al ambiente debido a la bioacumulación y toxicidad en el agua, tierra y aire; e impacto a otros organismos, inclusive benéficos. Es por ello que, nuevos estudios en el área de la biología, han orientado hacia un trato más amigable con el ambiente, intentando aprovechar las mismas interacciones con los enemigos naturales de las plagas de los cultivos, mediante el uso de agentes biocontroladores, con el fin de solventar los problemas que aquejan los cultivos de gran importancia a nivel mundial, como el café.

Uno de los mayores problemas que aquejan actualmente a este cultivo es la broca o *Hypothenemus hampei* Ferrari. Este es un insecto negro pequeño que perfora el fruto del café, alimentándose y destruyendo su contenido durante su ciclo de vida (Zamora, 1998; Barker, 1999; Crop Protection Compendium, 1999). Su control químico no es recomendado debido a las posibilidades de inducir resistencia, por lo cual es aplicado normalmente un plan de manejo integrado y el uso de controladores biológicos, principalmente mediante el uso del

hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (Crop Protection Compendium, 1999; Tobar *et al.*, 1999; Valdés *et al.*, 1999; Veléz *et al.*, 1999; Barker, 1999).

En Costa Rica, se encuentran poblaciones del hongo que han logrado aislarse en diferentes zonas cafetaleras, las cuales no han sido diferenciadas más que por su locación. Debido a que se desconoce si corresponden las muestras a una misma cepa, o por el contrario, representan a diferentes razas o biotipos, se pretende con el siguiente estudio determinar por técnicas moleculares, si existe o no alguna variación genética que las permitan diferenciar rápida y eficazmente.

Debido a que se estarán analizando muestras de la misma especie, el grado de similitud genética es una limitante a la hora de diferenciar subpoblaciones; por ello, se pretende utilizar la marcadores moleculares con microsatélites, los cuales estiman mejor la variación genética, debido a las posibilidades de tamaño y polimorfismo de los loci (Hegedus & Khachatourians, 1993; Wang *et al.*, 2003; Zane *et al.*, 2002).

En este estudio se evaluarán por ende una serie de imprimadores para secuencias simples repetidas (Simple Sequence Repeats, *SSR* por sus siglas en inglés) y con ello diferenciar genéticamente muestras de *Beauveria bassiana*. A su vez, se estandarizará el protocolo de aislamiento de ADN y análisis por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Adicionalmente, se pretende evaluar las diferentes muestras biológicamente, en cuanto al nivel de producción de esporas, velocidad de crecimiento, virulencia ante la broca y la resistencia a la radiación ultravioleta, parámetros que aún no se les han determinado. Con ello se pretende dar sustento a los datos obtenidos a partir de la tipificación molecular, y comprender de una forma más integral, su comportamiento y utilidad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar biológica y molecularmente 10 muestras del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la agresividad de las diferentes muestras del hongo ante *H. hampei* Ferr.
- Evaluar el crecimiento radial y el nivel de esporulación de las diferentes muestras del hongo *B. bassiana*
- Evaluar la resistencia de los aislamientos a la luz ultravioleta
- Estandarizar el protocolo de extracción de ADN
- Evaluación de la técnica de PCR con los microsatélites específicos
- Realizar un dendrograma para la clasificación por variación de secuencias polimórficas de las diferentes cepas obtenidas

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 El café en Costa Rica

El café desde su introducción a Costa Rica en 1779, ha asumido un papel fundamental en la economía, cultura y política de nuestro país. Aunque su actividad ha pasado por buenas y malas épocas, en el país se cultivan actualmente alrededor de 102.377,79 hectáreas, divididas en 28.729 fincas, generando alrededor de 197 millones de dólares (US) anuales, y teniendo una participación porcentual del 3,1 % en el sector productivo total, ubicándose en el puesto número 7 de productos con mayores ingresos de exportación en el 2004 (Ukers, 1922; SIGICAFE, 2005; Ministerio de Comercio Exterior de Costa Rica, 2004).

La existencia de este cultivo durante generaciones, aunado a que aún en nuestros tiempos ha sido apoyada por sectores competitivos y entes tanto privados como gubernamentales que invierten grandes recursos en investigación y capacitación, han mejorado las características del fruto, perfeccionado su manejo agronómico, e incursionado en mercados que exigen gran calidad, como el europeo (ICAFE, 2004).

Sin embargo, el cultivo del café es afectado por gran cantidad y variedad de plagas, que atacan raíces, tallos, hojas y frutos. Las plagas pueden ser fungosas como el Mal de talluelo (*Rhizoctonia solani* Kuhn), Chasparria (*Cercospora coffeicola* Berk&Coke), Ojo de gallo (*Mycena citricolor* (Berk&Curt) Sacc), Roya (*Hemileia vastatrix* Berk&Br.), entre otras. También insectiles como los Jobotos (*Phyllophaga* spp) y Gusanos cortadores (*Spodoptera* spp, *Agrotis* spp y *Feltia* sp) que atacan la raíz, Cochinilla harinosa (*Planococcus citri rissao*), Picudos (*Pantomorus feoratus*) y Áfidos (*Toxoptera auranti*) que atacan el follaje, y Gorgojos (*Araecerus fasciculatus*) y la Broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari), que atacan el fruto (Zamora, 1998). En cuanto a este último, se tiene un interés especial puesto que es una enfermedad nueva en nuestro país, y sin un control serio y bien planificado, podría mermar la producción nacional y generar un grave impacto agronómico y económico, dado que disminuye la calidad del grano para exportación y producción.

1.2 La Broca

1.2.1 Generalidades e Historia

La broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), o “Coffee Berry Borer” (CBB, por sus siglas en inglés) es un insecto negruzco similar a un gorgojo de entre 1 a 2 mm de longitud (Zamora, 1998; Barker, 1999; Baker & Lea, 2002; Monzón, 2004). La hembra se caracteriza por ser más grande que el macho (1,4-1,85 mm), con un margen frontal del pronoto con cuatro dientes, setas erectas más largas que anchas, sobre élitros lisos y brillantes, y con una sutura mediana frontal de la cabeza larga (Barker, 1999) (Figura 1).

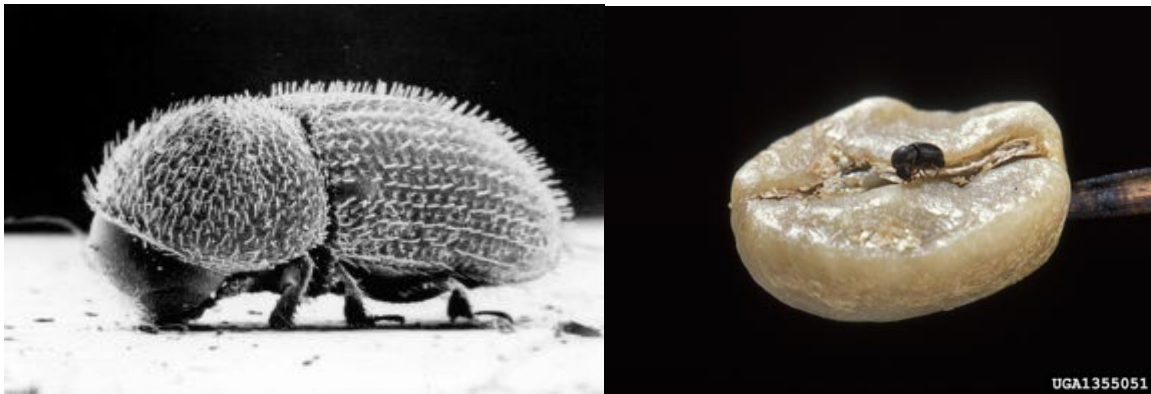


Fig. 1 Insecto adulto de broca (izquierda), y en grano de café (derecha). Tomado de: Bustillo, 2005.

La broca afecta todas las variedades de café y a diferentes alturas; sin embargo se encuentran en menor cantidad en alturas inferiores a los 1000 msnm (Monzón, 2004).

Primariamente, la broca del café fue descrita en 1867 por Ferrari, pero no fue sino hasta 1901 que es señalada en Gabón (África) como plaga en el campo (Crop Protection Compendium, 1999; Barker, 1999; Baker & Lea, 2002).

Su centro de origen está localizado en la zona ecuatorial de África, donde se reporta su distribución entre 1902 y 1909 en el Congo, Uganda y Jaba. De allí, posiblemente por el comercio, fue introducido en América, donde en 1913, fue detectado en Brasil (Sao Pablo). Luego se cita en el Perú (1962), Guatemala (1971), Honduras (1977), Jamaica (1978), Bolivia

(1978), México (1980), Ecuador (1982), y Colombia (1988) (Crop Protection Compendium, 1999; Vélez *et al.*, 2000).

En Costa Rica, se ha mantenido un estricto control y se han ejercido acciones de prevención, sin embargo para el año 2000, los esfuerzos no lograron contener la entrada del insecto, dándose los primeros brotes durante el mes de diciembre, en Barreal de Heredia y Naranjo (ICAFE, 2005; Campos, 2001). Para el año 2001, se encontraba localizada en 116 fincas a lo largo del territorio (Campos, 2001).

La broca del café es en la actualidad, la plaga que mayor daño ocasiona al cultivo, debido a que ataca directamente la baya (fruto). A partir de las 8-16 semanas después de la floración del café (10 semanas en el Valle Central), cuando alrededor del 20% del peso seco del fruto es endospermo sólido (setiembre en el Valle Central), la hembra adulta previamente fertilizada por el macho, vuela en busca de frutos aptos para ovipositar (Bustillo, 2005; Mora, 2003; Barker, 1999; ICAFE, 2003). Al hallarlos, comienza a excavar túneles desde la superficie del pericarpo hacia el interior (endospermo), a través de la zona del borde del disco (“ombbligo”), tomándole unas 5 horas para penetrar en el interior de frutos de más de 150 días de edad, en los cuales deposita entre 35 a 46 huevos de color blanco en grupos de 2-3 por día durante 4-5 días (Bustillo, 2005; Zamora, 1998). Durante toda la vida deposita entre 60 y 100 huevos, aproximadamente. Los huevos eclosionan después de 7 días, y es cuando las larvas comienzan a alimentarse de la almendra, formando una galería hacia un lado del túnel principal (Crop Protection Compendium, 1999; Bustillo, 2005). El ciclo de vida de la broca, desde que coloniza el fruto hasta cuando se desarrolla su progenie, pasando por los estadios de huevo, larva, prepupa y pupa adulta, puede tomar entre 25 y 45 días (60 días en el Valle Central), dependiendo de condiciones como la altitud, humedad, temperatura y condición del fruto (Bustillo, 2005; Barker, 1999; Monzón, 2004; ICAFE, 2003).

Las hembras se mantienen con sus crías y se aparean cuando ya están adultas, siendo generalmente la proporción de hembras 10 veces mayor que la de machos (Barker 1999). Debido a ello, las poblaciones pueden llegar a ser sumamente numerosas, más cuando los

machos no pueden desplazarse por no tener alas. Se reporta en la literatura que pueden coexistir hasta tres generaciones de brocas en un solo fruto, donde se podrían encontrar alrededor de 100 individuos (Barker, 1999).

Aunque el daño causado por la broca se produce en primera instancia por las hembras al penetrar en las almendras del café, el mayor daño lo hace en el estado larval, cuando inicia su alimentación, destruyéndolas completamente (Bustillo, 2005). El daño ocurre tanto como pérdida de fruto verde antes de los tres meses de maduración, como por merma de la calidad del café sobreviviente que se comercializa, por su peso y calidad.

Debido a ello, a nivel mundial se han realizado diferentes esfuerzos para reducir el ataque del insecto en los cultivares, mediante controles culturales, químicos y biológicos, en programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), que pretenden mediante el uso inteligente de todos los recursos disponibles, disminuir las poblaciones de plagas debajo del umbral económico.

1.3 Manejo Integrado de Plagas

El control de la broca en nuestro país, ha sido fundamentado en programas MIP, debido a su eficiencia, disminución de agentes contaminantes al ambiente y practicidad.

Adicionalmente, en nuestro país se defiende una política competitiva de café sostenible, el cual sería “aquel que se produce en plantaciones con alta diversidad biológica y con bajas aplicaciones de agroquímicos. Conserva los recursos, se protege el ambiente, produce eficazmente, compite comercialmente y refuerza la calidad de vida de los agricultores y la sociedad como un todo” (Mora, 2003).

Debido a lo anterior, en nuestro país se formalizó en el año 2001, el Programa Nacional de Prevención y Control Integrado de la Broca del Cafeto, con el cual se dio inicio al combate de la plaga (Polini, 2001).

Las recomendaciones sobre el manejo integrado de la broca, están basadas en el establecimiento de medidas antes, durante, y después de la cosecha, el cual se incluyen prácticas culturales, etológicas, químicas y biológicas. Entre algunas medidas se encuentran: detectar lugares del cafetal donde esté presente la plaga, principalmente lugares bajo sombra y húmedos; realizar la cosecha sanitaria, es decir, eliminar frutos verdes, pintones o maduros atacados y depositarlos en galones con agua y jabón; recolectar todo el café durante las graneas; limpiar muy bien las calles y realizar labores de poda y deshijado luego de la cosecha; utilizar trampas atrayentes para la broca tiempo antes del inicio del periodo de lluvias; entre otras (Barker, 1999; ICAFE, 2005; ICAFE, 2003).

Por su parte, en cuanto al control químico, ha demostrado ser efectivo únicamente cuando el adulto está penetrando en el fruto. Sin embargo, aplicaciones en otros países de insecticidas como endosulfán, han generado resistencia y el uso de otros insecticidas menos tóxicos, han causado muertes en seres humanos, además de la contaminación en ríos, suelos y aire; por lo que se han investigado formas alternativas de control (Brun & Suckling, 1997; Barker, 1999).

1.4 Enemigos Naturales

Como parte esencial del Manejo Integrado de Plagas, destaca el control biológico. Este presenta diferentes ventajas respecto al control químico: especificidad del control de la plaga, persistencia en el ambiente limitada, reducción de riesgos en el desarrollo de resistencia, aplicación en programas de investigación biotecnológicas, reducidos efectos secundarios sobre la salud humana y ambiental, entre otros (Haraprasad *et al.*, 2001). Sin embargo, también presenta sus desventajas: el control químico tiene un efecto más rápido sobre la peste y generalmente es menos costoso, el control biológico presenta dependencia de las condiciones ambientales, mejoras en el desarrollo de métodos de producción, aplicación y eficiencia.

A pesar de lo anterior, como opción alternativa a largo plazo, parece representar mayores beneficios el control biológico sobre el químico. Adicionalmente, la gran diversidad de

ecosistemas y de plagas, hace pensar en el gran potencial de hallar una solución biológica de gran impacto, sin alterar significativamente, las condiciones ambientales que rodean al cultivo.

Existen en la naturaleza gran variedad de enemigos naturales de las plagas, por ende, se han clasificado en: parásitos, depredadores y entomopatógenos. Los parásitos corresponden a insectos (parasitoides) que atacan a un solo tipo de insecto huésped, entablando una relación de parasitismo, donde el parasitoide aprovecha al hospedero para desarrollarse. Los depredadores son insectos que atacan otros insectos, siendo en muchos casos no restringido a un solo huésped. En estado larval o adulto, estos buscan a su presa para capturarla y alimentarse. Por último, los entomopatógenos son microorganismos que ocasionan enfermedades al insecto huésped, causándole la muerte (Infoagro, 2004).

Dentro de los agentes entomopatógenos se incluyen bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos, de los cuales, los principales microorganismos utilizados para el control de plagas insectiles se encuentran las bacterias del género *Bacillus* sp, específicamente *B. thuringiensis* y los hongos del género *Beauveria* sp, *Metarhizium* sp, *Paecilomyces* sp, *Verticillium* sp, *Erynia* sp, *Hirsutiella* sp, *Entomophthora* sp y *Entomophaga* sp (Alcázar, 1999; Monzón, 2004). Sin embargo se reporta en la literatura que existen alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenos, distribuidos en 90 géneros (Bielikova *et al.*, 2002; Kouassi, 2001).

Estos entomopatógenos, así como los demás enemigos naturales, existen en relativo equilibrio ecológico en ambientes no explotados, debido a que la cantidad de alimento para el insecto plaga, es también limitante. Cuando existe un desequilibrio, como lo es el cultivo de un solo tipo de planta, paralelamente incrementa la disponibilidad de alimento para la plaga, con el consecuente aumento en la población. Estos y otros desequilibrios ocasionan que, un insecto que consume un determinado tipo de planta, se convierta en un problema económico para el agricultor.

Además de lo anterior, existe el problema de los cultivos introducidos. Esto se refleja por ejemplo en el café. Como es de esperarse, la broca ha afectado en mayor cantidad y severidad,

en las zonas donde el cultivo del café fue introducido, y en menor proporción, en zonas como Etiopía, donde el café es autóctono. Esto se debe a que en África las poblaciones de broca son controladas por parasitoides y entomopatógenos, que evitan que los niveles de población alcancen un nivel alto y agronómicamente significativo (Bustillo, 2005; Barker, 1999). Al entrar una plaga a un territorio donde no coexisten con sus enemigos naturales, su incremento poblacional es difícilmente controlable, y eso es lo que se intenta incorporar en el programa integrado de manejo de plagas. Aplicar este plan de manejo, es mantener bajas las poblaciones de la broca, y los ataques por debajo del 3%, umbral donde la plaga no causa ningún daño económico tanto en la plantación como en los rendimientos (Mora, 2003; ICAFE, 2003).

Los enemigos naturales de la broca se pueden clasificar en dos grupos: parasitoides y hongos entomopatógenos. Los parasitoides por ejemplo, como *Heterospilus coffeicola*, *Phymastichus coffea*, *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta*, colocan huevos en las larvas y pupas, o depredan a los adultos (Pest Cabweb, 2005; Mora, 2003; Barker, 1999). Son voladores y se encargan de buscar activamente la broca.

Los hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, penetran a través de la cutícula del hospedante susceptible hasta alcanzar su aparato digestivo, el insecto adulto muere por inanición, para luego ser colonizado y momificado (Valdés *et al.*, 1999; Pest Cabweb, 2005; Mora, 2003; Barker, 1999). Su dispersión se lo brinda el viento, agua u otros insectos, los cuales trasladan las esporas de un sitio a otro. Cuando las condiciones son adecuadas, las esporas germinan e inician la infección.

La utilización de *Beauveria bassiana*¹ como controlador biológico en especial, ha llevado una gran inversión en investigación y producción en diferentes países, debido a su gran potencial y efectividad para el control de muchas plagas insectiles, como la broca. Además, su facilidad de cultivo en masa, disponibilidad para aislarla en la zona afectada y adaptabilidad de análisis en laboratorios de investigación, acorde con las condiciones actuales de nuestro país, sugieren que vale la pena el esfuerzo, en búsqueda de solventar un problema común.

¹ Nota: Por facilidad en la lectura, en algunas ocasiones se describirá como “Bb”.

1.5 *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin

1.5.1 Morfología y Ciclo de Vida

Beauveria bassiana es un hongo filamentoso de la clase Hyphomycete, división Deuteromicetes (*Fungi imperfecti* o *Fungi asexual*). Al igual que los demás hongos entomopatógenos, Bb es un organismo eucariótico heterótrofo que posee células quitinizadas y parasita otros insectos, gracias a sus mecanismos físicos y químicos de infección.

Fue descrita por primera vez por Jean Beauverie en 1911 con el nombre de *Botrytis bassiana*. Un año más tarde, Vuillemin la clasificó en su clase actual. Ensayos enzimáticos posteriores, determinaron el género como *Beauveria* sp, y diferenciaron seis especies, a saber: *B. alba*, *B. amorpha* (Von Höhnel) Samson & Evans, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* Samson & Evans, *B. vermiconia* (Hoog & Rao), y *B. caledonica* (Bissett & Widden). Además se reporta en la literatura la existencia de otras especies, como *B. densa*, *B. stephanoderis*, *B. vermiconia* y *B. sulfurescens* (NLP Tools, 2004; Viaud *et al.*, 1998; Kouassi, 2001).

Morfológicamente, Bb está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25 µm de diámetro, de donde se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de forma simpodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis (Barron, 2001; Carrillo, 2005; Kouassi, 2001) (Figura 2).

Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas (Kouassi, 2001). Sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blancuzca para el ojo humano (Barron, 2001).

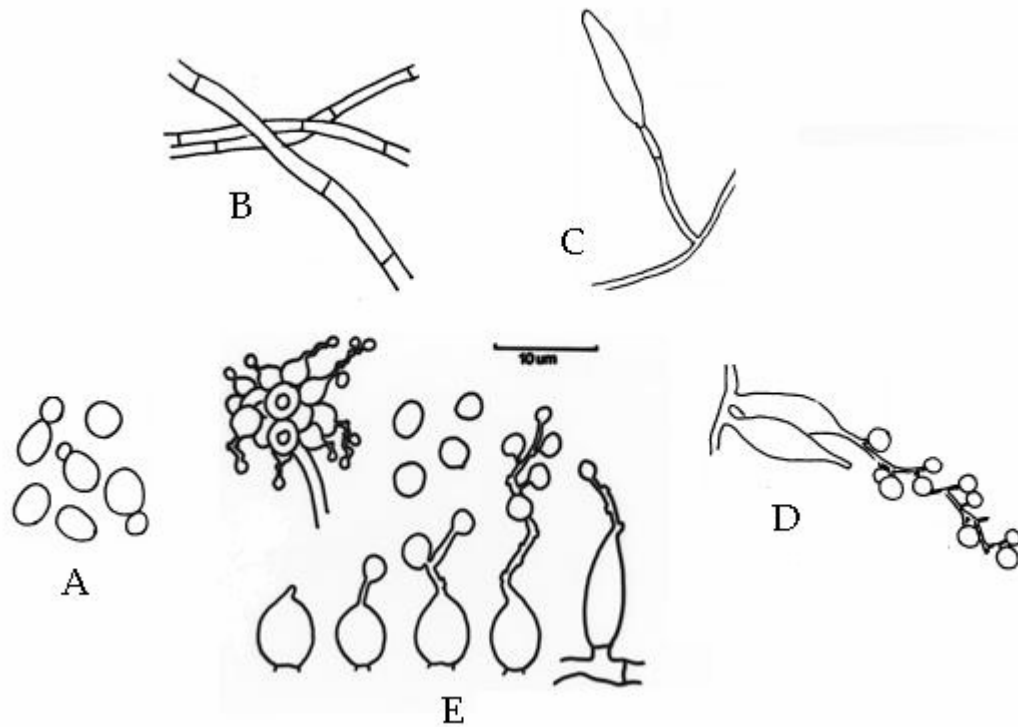


Fig. 2 Estructuras morfológicas principales del hongo *Beauveria bassiana*. A. Esporas esféricas levemente ovaladas. B. Hifas septadas. C. Conidióforo simple. D. Proliferación simpodial del conidióforo. E. Esquema del proceso de maduración de conidióforo a partir de un conidio (inferior) y vista de un conidióforo completo (superior izquierda). Figuras A-D modificadas de: Castillo, 2005. Figura E modificada de: Solter, 2004.

En cuanto a su reproducción, se sabe que los hongos que pertenecen a esta clase no les han sido posible determinar la fase sexual, limitándose únicamente al estado vegetativo. Sin embargo, Viaud y colaboradores (1998), reportan que existe recombinación parasexual en el género *Beauveria* sp, así como en otros como *Aspergillus* sp y en las clases Ascomicete, Basidiomicete y Deuteromicete. Este tipo de proceso genético, consiste en primera instancia, en la formación de un heterocarión (una célula con dos o más núcleos genéticamente diferentes), donde se produce la fusión de dos núcleos haploides diferentes para formar un núcleo diploide heterocigoto. Luego se produce una recombinación mitótica, reduciendo la información genética por núcleo al nivel original del haploide. Este tipo de proceso genera grandes variaciones genéticas, debido a cruces inter cromosómicos, pero se ve limitado muchas veces por incompatibilidad vegetativa (Jenkins, 1990; Viaud *et al.*, 1998).

1.5.2 Proceso de infección

Bb presenta la habilidad de vivir de manera parasítica y saprofítica, lo que le permite sobrevivir en presencia o ausencia de insectos huésped, respectivamente. Cuando se encuentra en el suelo en materia orgánica, su morfología micelial genera una red amplia y filamentosa originada a partir de un conidio; sin embargo, en presencia de un insecto huésped, el conidio germina y una vez dentro del insecto, pasa a formar una red de hifas, que una vez colonizada, pasa nuevamente a una forma similar a la de levadura (blastóspora) (Wong, 2003).

El ataque de este hongo sobre el insecto huésped, se realiza en diferentes etapas divididas en: adherencia, germinación, diferenciación y penetración (Kouassi, 2001) (Figura 3).

El primer paso se produce cuando el conidio se adhiere a la cutícula. Para ello es necesario el reconocimiento y compatibilidad (por ejemplo de enzimas y glicoproteínas) entre el conidio y las células del tegumento del insecto, influida por dos acciones: una pasiva en la cual se ejercen fuerzas electroestáticas e hidrofóbicas, y otra activa, en la cual se secretan mucílagos, que interactúan químicamente con las lecitinas de la membrana y generan un ambiente favorable para la secreción de enzimas (Kouassi, 2001; Wong, 2003; Duperchy, 2003). Una vez que se haya adherido, inicia la germinación, que es dependiente de las condiciones que le pueda brindar el insecto y el ambiente (Kouassi, 2001; Duperchy 2003). La diferenciación del hongo, inicia con la formación de un tubo germinativo, similar a un aprensorio, el cual ayuda a la penetración de la cutícula por actividad enzimática extracelular (quitinasas, lipasas, esterases, y proteasas) y presión mecánica (Kouassi, 2001; Wong, 2003; Duperchy, 2003). Este mismo facilita la invasión de la epidermis e hipodermis. Finalmente, se produce la invasión y proliferación de las hifas en el tracto digestivo. Este paso ocurre luego de la muerte del insecto, ocasionado por daño mecánico, desnutrición y toxicidad, y es cuando las hifas secretan un antibiótico (oosporina), que ataca las bacterias del intestino (Kouassi, 2001; Wong, 2003). Suprimidas las barreras inmunes del insecto, el hongo invade el tracto digestivo, se alimenta de su interior y lo momifica.

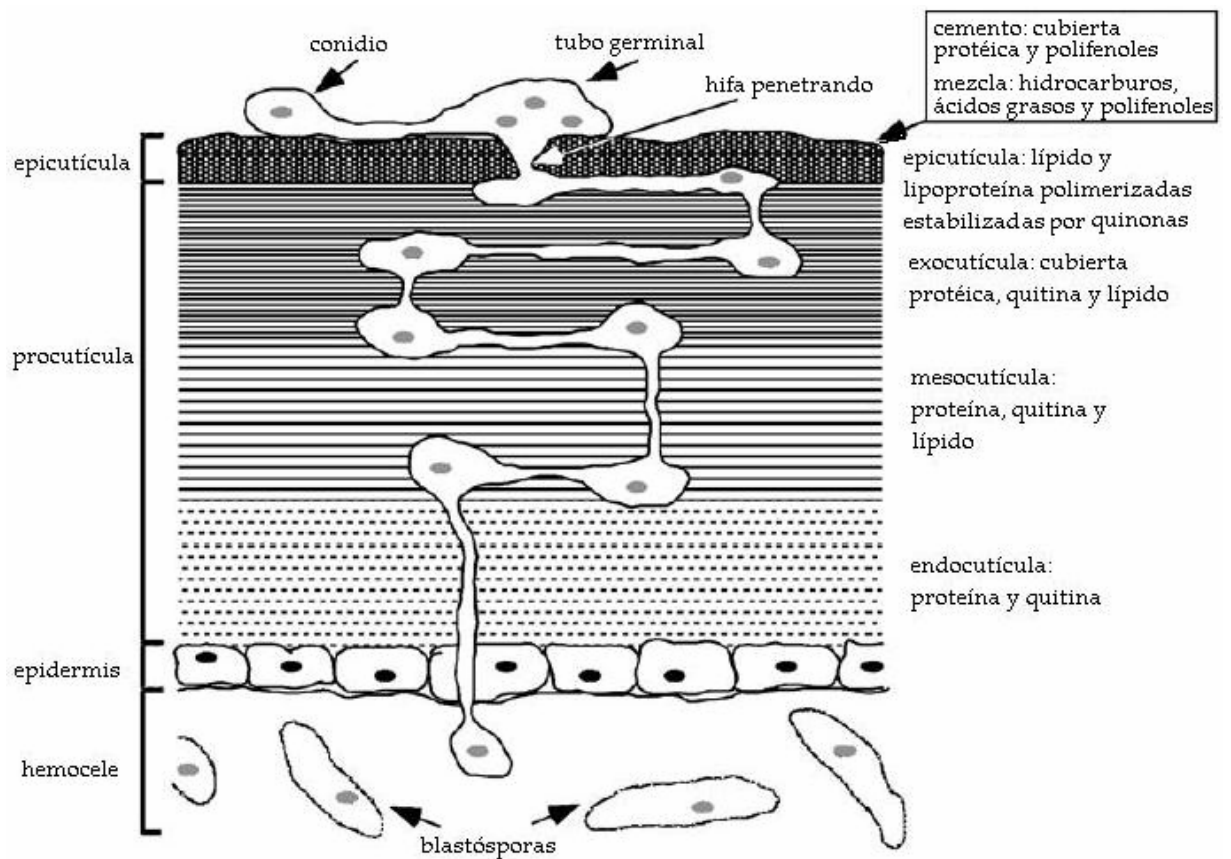


Fig. 3 Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración. Modificado de Duperchy, 2003

Según Duperchy (2003), la adhesión del conidio a la cutícula del huésped, no es específica en muchos casos. Sin embargo, al parecer, la agresividad se encuentra relacionada con la actividad enzimática sobre los lípidos, ácidos grasos y la secreción de mucílago, que cumple la función de adhesión y de favorecer la actividad de las enzimas extracelulares.

Los compuestos encargados de la germinación, generalmente no son específicos para cada cepa, contrariamente a las sustancias excretadas durante la diferenciación, que al parecer son más específicas. Esto se debe a que bajos niveles de compuestos con nitrógeno estimulan la diferenciación del tubo germinativo, y compuestos con carbono, facilitan la catálisis enzimática (Duperchy, 2003).

Adicionalmente, en algunas ocasiones se evidencia la actividad de sustancias no enzimáticas, como las beauvericinas, beauverolidasas, bassianolidasas e isarolidasas, que acentúan y aceleran el proceso de infección (Kouassi, 2001).

1.5.3 Control Biológico

Se han realizado múltiples ensayos de patogénesis de Bb frente a muchas plagas en diferentes cultivares, sin embargo, debido al interés de investigación en este trabajo sobre el café, se centrará la atención en la broca (Blanford *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2004; Duperchy, 2003; Scholte *et al.*, 2004).

El hongo Bb presenta gran actividad entomopatógena en variados tipos de insectos alrededor del mundo, incluyendo los órdenes Coleóptera, Lepidótera, Homóptera y Arthropoda (Alcázar *et al.*, 1999). Se han encontrado cepas con virulencia hacia importantes plagas, tanto para la agricultura como para los humanos. En la agricultura, se ha utilizado para el combate de la cucaracha de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), termitas y hormigas (*Acromyrmex* sp, *Atta* sp), broca del maíz (*Ostrinia nubilalis*), oruga del pino (*Dendrolimus* spp), grillos verdes (*Nephotettix* spp) y la polilla (*Laspeyresia pomonella*) (Wong, 2003). También *Anthonomus grandis* del algodón, *Cosmopolites sordidus* del banano, *Ancognatha* sp y *Phyllophaga* sp de la papa, *Compsus* sp en ornamentales, *Cosmopolites sordidus* y *Pseudococcus* sp en piña, *Loxotoma elegans* en palma, *Trips* sp, ácaros en general y *Corytucha* sp en hortalizas y frutales, entre otras (EDAFON, 2005).

En el campo de la salud humana, cepas de Bb atacan la mosca tsetse (*Glossina morsitans*), mosquito de la arena (*Phlebotomus* sp) que transmite Leishmania, insectos del género *Triatoma* y *Rhodnius*, vectores de la enfermedad del Chagas, y *Anopheles stephensi*, transmisor de la malaria (Wong, 2003; Blanford, 2005).

Respecto al control de *H. hampei*, Bustillo y colaboradores (1999) en Colombia, han reportado que a nivel de campo, aspersiones líquidas de 1×10^6 esporas/ml del hongo ocasiona

una mortalidad de un 30% ante *H. hampei*. En nuestro país, Mora y Avilés (2003), obtuvieron un resultado similar comparado con la cepa colombiana Bb 9205 (CENICAFE) y dos aislamientos nativos, lo cual evidencia un alto grado de virulencia de las cepas nativas. Así mismo a nivel de laboratorio, estos autores han reportado que la mortalidad del 50% de las brocas se produce a los 6 días, incluyendo más cepas nativas, revelando además, un alto grado de esporulación. Scholte y colaboradores (2004), enuncian que es mejor dispersar con esporas que con micelios, para mantener el efecto sobre el suelo y así, sobre el insecto plaga.

Debido a lo anterior, en nuestro país se recomienda realizar aspersiones con *Beauveria bassiana* entre junio y agosto, periodo en el cual el fruto del café inicia su crecimiento y endurecimiento. En esos momentos la broca inicia la penetración en el fruto, y es cuando se obtienen mejores resultados, debido a que posteriormente, las brocas se encuentran en el interior del grano, y no pueden ser infectados (ICAFE, 2003).

1.6 Técnicas en Biología Molecular

Con el descubrimiento de la estructura de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) por Watson y Crick en 1953, y la simplificación del proceso central de expresión y transmisión de la información hereditaria conocido con el nombre del Dogma Central de la Biología Molecular, los científicos encargados del estudio de los organismos vivos a nivel molecular han abierto una nueva puerta para el estudio de los sistemas biológicos, ampliando el horizonte de lo que es hoy en día, una rama de estudio innovadora y pujante (Adoutte *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 1996; Crick, 1970).

La biología molecular se ha desarrollado grandemente a partir de la década de los 50's, donde inicia un gran desarrollo de técnicas de aislamiento, manipulación y análisis, que van desde la detección de proteínas, hasta la recombinación y transformación genética (Alberts *et al.*, 1996).

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica pretende aumentar el número de copias de fragmentos de ADN de una muestra de manera *in vitro*, según las condiciones establecidas y el propósito de su uso. Empleando una secuencia de oligonucleótidos conocidos, es posible aislar fragmentos no mayores de 6 kb (kilobases), y con ello explorar, detectar y aislar fragmentos con información genética útil. Esto ha tenido gran utilidad, debido a que se pueden realizar estudios de presencia o ausencia de secuencias, o de variaciones en tamaños de los fragmentos debidas a mutaciones, deleciones, inserciones, etc. (Valadez & Kahl, 2000).

Esta técnica ha sido modificada y perfeccionada, generando numerosas variantes y métodos que detallan el tipo de estudio. Por ejemplo se reconocen las técnicas de Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPDs), Polimorfismo en el Tamaño de los Fragmentos de Restricción (RFLPs), y Secuencias Simples Repetidas

(microsatélites), por mencionar los más representativos, los cuales son empleadas principalmente en la diferenciación o caracterización de organismos.

1.6.1 Caracterización Molecular

Tradicionalmente, el reconocimiento de miembros de una determinada taxa aislados de ambientes naturales, estaban basados en métodos fenotípicos como la morfología de las esporas (conidios) e hifas, o bioquímicos, como el perfil de proteínas extracelulares, los cuales son influenciados grandemente por la interpretación y dependen de un alto grado de especialización (Bielikova *et al.*, 2002; Bull *et al.*, 2000; Collinge, 2000). Con el desarrollo de técnicas más específicas basadas en las diferencias en la información o configuración genética, han sido posibles aminorar estos errores, y brindar información más exacta y reproducible.

La inmensa diversidad biológica aporta en cantidad y calidad, información tan variable que determinarla ha sido un proceso evolutivo tan complejo como la misma naturaleza. Estudios de ecología, biología, taxonomía, conservación, genética, bioquímica y sus diferentes ramificaciones, separadas, no han logrado manejar e interpretar tal abundancia de información, por ende, el desarrollo de técnicas de caracterización molecular han empezado a aportar herramientas tan útiles como los marcadores moleculares, los cuales funcionan como identificadores específicos de individuos (Collinge, 2000; Claros, 2005; Caetano & Gresshoff, 1997). Estos marcadores son empleados para cuatro áreas específicas: identificación genotípica; análisis de la diversidad genética; estimación de las relaciones genéticas y mapeo genético.

La caracterización o tipificación molecular, consiste en diferenciar individuos de interés según sus variaciones o polimorfismos en el ADN. Estos polimorfismos pueden darse debido a dos tipos de cambios principalmente: cambios en las bases nitrogenadas por adición, transición, traslocación o delección, y reorganizaciones en la secuencia del ADN (Valadez & Kahl, 2000; Robles *et al.*, 2004). Estos cambios generalmente son localizados en un sitio específico de la molécula de ADN.

En la práctica, la caracterización se realiza generalmente empleando oligonucleótidos (imprimadores o *primers*) de secuencia conocida, que sirvan como punto de partida y/o término de la síntesis de fragmentos complementarios a la banda de ADN en estudio, y con ello, mediante la detección de variaciones en los tamaños o secuencias nucleotídicas de los productos amplificadas durante el PCR o hibridación por Southern Blot, diferenciar entre géneros, especies y hasta menores grados de clasificación según la técnica empleada y el tipo de organismo (Alberts *et al.*, 1996; Valadez & Kahl, 2000; Claros, 2005; Caetano & Gresshoff, 1997). De esta manera se esperaría que, patrones diferentes de las bandas observadas luego del revelado en electroforesis u otros, evidenciaran contrastes genéticos, y por ende, diferencias entre individuos.

A pesar de lo anterior, no todas las técnicas son aptas para la caracterización, o no se adaptan al objetivo del análisis. Por ejemplo, estudios como los del secuenciamiento de la unidad pequeña del ARN ribosomal (ARNr) o ADN mitocondrial (ADNm), no permiten distinguir en niveles inferiores de especies en algunos casos, contrario a las técnicas como huellas moleculares con microsatélites (Bull *et al.*, 2000; Hegedus & Khachatourians, 1993).

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes variaciones a la técnica de PCR, entre las que se mencionaron RAPD's, RFLP's y microsatélites. La técnica RAPD's, consiste en emplear oligonucleótidos cortos (6-12 bases) (iniciadores) de tipo aleatorio pero de secuencia conocida, como punto de inicio de la síntesis de ADN en estudio. El ADN muestra no necesariamente debe haber sido secuenciado (Bielikova *et al.*, 2002). Con esta técnica se pueden obtener fragmentos que difieren en tamaño y secuencia nucleotídica, debidos a polimorfismos de muestras del ADN molde, y son generalmente de carácter dominante (Valadez & Kahl, 2000). Su utilidad sobresale por su simplicidad, pocos recursos necesarios (comparado con otros métodos), y alto grado de información proporcionada (Dávila *et al.*, 2001).

La técnica de RFLP, como su nombre lo dice, expresa diferencias en sitios específicos del ADN que son reconocidos por enzimas de restricción (endonucleasas) particulares (Vélez,

2002). Estas enzimas provienen de otros organismos, y son sumamente específicas a una secuencia nitrogenada del ADN. Aislado el material genético proveniente de su propio genoma u organelas, purificando en laboratorio y aplicando determinada (s) endonucleasa (s), pueden obtenerse luego de tratamientos ulteriores como electroforesis, diferencias en el tamaño de los fragmentos, lo que evidencia alteraciones a nivel genético, cuya interpretación y utilidad son de inmenso apoyo en trabajos de diferenciación entre individuos y manipulación genética, entre muchas otras (Valadez & Kahl, 2000).

En cuanto a la técnica de microsatélites, por su importancia en el presente estudio, será descrita con mayor detalle a continuación.

1.6.2 Utilización de los microsatélites como herramienta de caracterización

Entre las diferentes técnicas empleadas para el análisis genético y caracterización molecular, se encuentran aquellas que intentan detectar SSR`s en el material hereditario.

Las SSR`s son secuencias repetidas en tandem a lo largo de regiones codificantes o no codificantes en el ADN de los eucariotas, aunque al parecer, prevalecen en regiones no codificantes (Zane *et al.*, 2002; Budak *et al.*, 2003; Enkerli *et al.*, 2001).

Estas secuencias conforman parte de lo que se conoce como Número Variable de Repeticiones en Tandem (Variable Number of Tandem Repeats; VNTR), y tienen dos categorías de división: minisatélites, que son secuencias repetidas en tandem de entre 10-60 pb y 10-35 pb ricas en GC; y microsatélites o secuencias simples, que son prácticamente lo mismo, pero de tamaño más pequeño, entre 2 y 10 pb (Caetano & Gresshoff, 1997; Valadez & Kahl, 2000; Loxdale y Lushai, 1998).

Ambas secuencias pueden escribirse como el nombre o nombres de las bases nitrogenadas que conforman el grupo (*entre paréntesis*) y un número de veces (*n*) que se repite esta serie a la derecha del paréntesis. Ejemplos serían: (GATA)₄, (CT)₈, (TCC)₅.

Aunque se desconoce exactamente la función de éstas secuencias en el ADN, parece ser que tienen utilidad reguladora en regiones corriente arriba de secuencias codificantes (Enkerli *et al.*, 2001).

Estas secuencias se repiten en diferente número y son sumamente polimórficas (Rehner & Buckley, 2003). Existen dos teorías del por qué suceden estas alteraciones en el número de bases nitrogenadas: un error de complementariedad ocasionado por el desplazamiento de la cadena durante la replicación hacia una base no complementaria; o una recombinación desigual. Sin embargo, estas pequeñas diferencias son de gran utilidad, ya que permiten identificar y comparar diferentes organismos, inclusive muy emparentados (Enkerli *et al.*, 2001).

Loxdale y Lushai (1998) señalan que estas secuencias son únicas en muchos sitios conservados y pueden contener regiones codificantes también conservadas. Debido a que su frecuencia de variación es más alta que la de la región codificante, y el tamaño de los polimorfismos puede ser más fácilmente encontrado, resulta una herramienta útil además, para detectar y aislar genes de secuencia conocida de importancia que se encuentren entre estas zonas.

Entre las diferentes metodologías empleadas para el análisis de microsatélites, se pueden mencionar dos tipos:

- 1) las que emplean una secuencia de microsatélite como iniciadores, o PCR iniciada por microsatélites y;

- 2) las que con un iniciador conservado, flanquean a una secuencia microsatélite, o PCR iniciada por región conservada de microsatélite. A continuación se describirá cada una.

1.6.2.1 PCR iniciada por microsatélites

El empleo de microsatélites en la detección de polimorfismos, no sólo se basa en la obtención de secuencias simples en tandem, sino en utilizar estas secuencias para obtener fragmentos inter-microsatélites. En estos casos, los productos obtenidos se encuentran entre los extremos de los microsatélites empleados.

Existen varias técnicas, entre las que se pueden mencionar: Iniciador de Microsatélite (MP-PCR: Microsatellite Primer-PCR, por sus siglas en inglés), Iniciador de Microsatélite Anclado (AMP-PCR: Anchored Microsatellite Primer-PCR, por sus siglas en inglés), Amplificación Azarosa de Polimorfismos de Microsatélites (RAMPO: Random Amplified Microsatellite Polymorphisms, por sus siglas en inglés), y Polimorfismo de Microsatélites Azarosos (RAMP: Random Microsatellite Polymorphisms, por sus siglas en inglés) (Caetano & Gresshoff, 1997; Valadez & Kahl, 2000). Cada una de ellas presenta características específicas y útiles para la diferenciación de individuos, puesto los productos amplificados son muy informativos.

1.6.2.2 PCR iniciado por región conservada de microsatélite

Este tipo de PCR, utiliza Sitios que Señalan Secuencias de Microsatélites (STMS: Sequence-Tagged Microsatellite Site, por sus siglas en inglés). Es un marcador de segunda generación que permite diferenciar estados homo (una banda) o heterocigotos (dos bandas) de un posible locus, abarcando la especificidad de los alelos y microsatélites, para un locus particular (Valadez & Kahl, 2000).

Consisten en secuencias generalmente conservadas (como se mencionó en la sección anterior) que flanquean una secuencia de microsatélites. Este método permite obtener bandas más polimórficas y específicas, por tanto presentan mayor valor en la caracterización molecular empleando microsatélites. Esta técnica es la empleada en el presente trabajo, empleando secuencias conservadas específicas para Bb.

1.6.2.3 Obtención de los iniciadores

Debido a que no siempre se cuenta con las secuencias de los iniciadores para realizar el estudio en diferentes organismos, se debe iniciar la investigación por obtener secuencias *de novo*, para sintetizarlas posteriormente.

En tiempos actuales donde existen disposición de recursos informáticos, el primer paso a realizarse sería el consultar las bases de datos, como el GenBank por ejemplo, y cerciorarse de la existencia de los imprimadores deseados o relacionados (Yu *et al.*, 2000). Una vez realizada la consulta, se procede con la investigación en laboratorio.

Existen diferentes métodos para obtener las secuencias deseadas. El método tradicional inicia con la fragmentación del ADN por medio de enzimas de restricción, con el fin de obtener fragmentos pequeños donde puedan encontrarse repeticiones de microsatélites, generalmente entre 300-700 pb (Zane *et al.*, 2002; Budak *et al.*, 2003) (Figura 4). Estos fragmentos son ligados luego a un plásmido vector que se inserta en alguna bacteria para aumentar el número de clones. Se realizan pruebas de confirmación de la transformación y si existen positivos, se procede a realizar análisis de hibridación con radioisótopos marcados o digoxigenina de la secuencia buscada (Tenzer *et al.*, 1999; Zane *et al.*, 2002; Valadez & Kahl, 2000; Caetano & Gresshoff, 1997). De esta manera, al hibridarse con las secuencias buscadas y obtenerse productos de PCR, puede aislarse una muestra de este fragmento para secuenciarlo, y con estos, generar iniciadores específicos para ese locus (Loxdale & Lushai, 1998). Luego de la identificación de los clones, se mejoran las condiciones del iniciador para que se pueda aplicar en cada locus de los individuos de la población (Zane *et al.*, 2002).

Para la técnica anterior, existen diferentes variantes. Una es realizando hibridaciones selectivas. Para ello se fragmenta el ADN con enzimas de restricción, se ligan los fragmentos a una secuencia de ADN conocida o un vector, y se pasa luego a una membrana de nylon donde se hibrida con streptavidina. Luego de los lavados, se rescatan los fragmentos y se

procede a la amplificación por PCR. Estos fragmentos luego son clonados a algún vector por enzimas de restricción, y secuenciados posteriormente (Zane *et al.*, 2002).

Otra forma de realizar esta búsqueda sería que, luego de generar las librerías, estas fuesen tratadas en medios con una secuencia de microsatélite específica, por ejemplo (CA)_n, (GC)_n, (ATG)_n, etc. Las moléculas de ADN de estas bibliotecas son luego ligadas a plásmidos conocidos y subcultivados en alguna bacteria como *Escherichia coli*. Posteriormente, de los cultivos se procede a realizar un tratamiento de lisis celular para liberar los plásmidos. Liberados los plásmidos, se procede a realizar un PCR con las mismas secuencias de iniciadores utilizando los microsatélites agregados anteriormente. Los productos amplificados son secuenciados y de allí, se obtienen las secuencias de nucleótidos que pudiesen funcionar como imprimadores específicos (Prohl *et al.*, 2002).

Luna y colaboradores (1999) desarrollaron un método de aislamiento de microsatélites llamado PIMA (PCR Isolation of Microsatellite Arrays, por sus siglas en inglés) basados en el empleo de RAPD's, medios no enriquecidos con microsatélites ni hibridación, y ha probado ser eficaz y rápido (Figura 4).

Primero se obtiene el ADN del organismo a estudio, se corre en PCR según las especificaciones del protocolo con 10 parejas de imprimadores seleccionados al azar. Los productos más intensos son ligados a un vector de transformación (vector T), y crecidos en bacterias hasta obtener bastantes colonias. Luego se toma una pequeña cantidad y se coloca en una solución de PCR con el imprimador universal M13. En el gel revelado se buscan bandas diferentes a las obtenidas con anterioridad, se vuelven a integrar estos productos en el vector y repite el ciclo de cultivo y PCR. Dependiendo de la seguridad de la técnica y los resultados, se puede secuenciar el fragmento y volver a probar con las colonias antes sembradas.

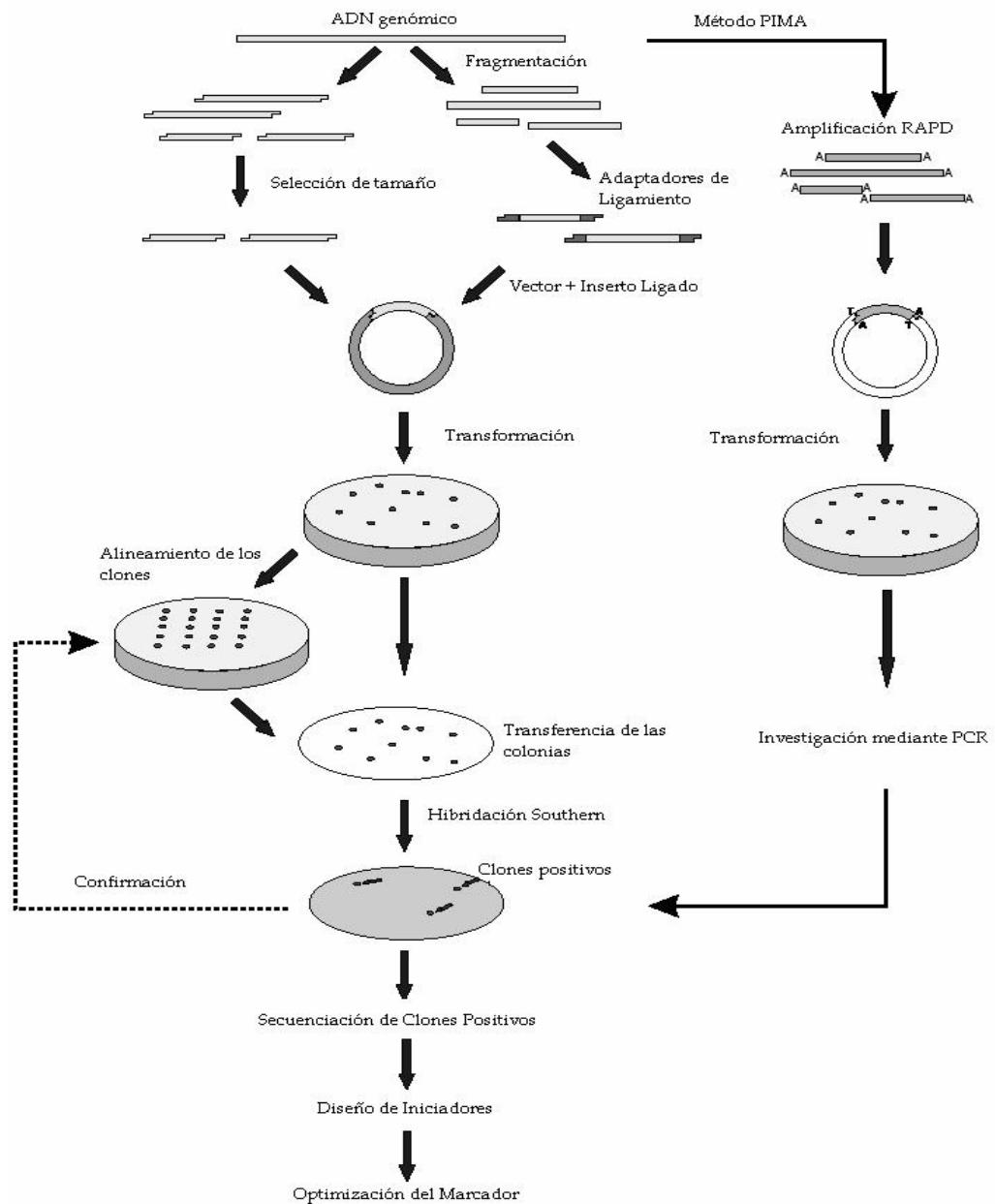


Fig. 4 Esquema de la metodología tradicional vs método PIMA para aislamiento de microsatélites. Modificada de Zane *et al.*, 2002.

1.6.3 Caracterización por microsatélites

La caracterización por microsatélites, ha sido empleada en varios estudios como marcadores moleculares para caracterización interespecíficos e intraespecíficos, debido a su alto grado de polimorfismo o variabilidad en la diferenciación alélica (Zane *et al.*, 2002;

Goldstein *et al.*, 1995). La filogenia de muestras provenientes de seres muy relacionados, pueden ser entonces determinadas con gran sensibilidad, debido a la variación en el número y largo de las repeticiones obtenidas.

Dependiendo del número de veces que pueda presentarse en el genoma, una secuencia de tres bases tiene mayor probabilidad de repetirse que una secuencia de seis bases, y por ello ser más específica una de otra (Goldstein *et al.*, 1995). Es por ello que Loxdale y Lushai (1998) mencionan que tri y tetra repeticiones de nucleótidos son mejores, debido a que existe menor probabilidad de obtener muchas bandas, posiblemente inespecíficas, luego un análisis de PCR y electroforesis.

Esta técnica presenta ciertas ventajas respecto a diferentes métodos de caracterización molecular como RAPD, RFLP y AFLP (Enkerli *et al.*, 2001, Yu *et al.*, 2000): son codominantes; basados en PCR; altamente reproducibles; usualmente multialélicas y variables (polimórficas); distribuidos uniforme y azarosamente en genomas de eucariotas; y accesibles a través de publicaciones de secuencias de iniciadores.

1.7 Estudios moleculares en *Beauveria bassiana*

En el caso específico de Bb, se reporta en la literatura que diferentes análisis de caracterización se han realizado mediante el empleo de técnicas como isoenzimas, RAPD, RFLP, microsatélites y de cariotipo, en diferentes cepas y poblaciones, como parte de investigaciones y formulaciones de productos comerciales patentados (Wang *et al.*, 2003; Loxdale & Lushai, 1998; Hegedus & Khachatourians, 1996). De éstas investigaciones se han obtenido importantes conclusiones sobre las poblaciones de Bb: cepas provenientes de una misma zona geográfica, presentan gran similitud genética; las relaciones genéticas entre cepas, se relacionan con la especie de insecto huésped (muchas veces independientemente de la zona geográfica); y aparentemente, no existe una asociación entre las cepas y el tipo de huésped (no ejercen una presión selectiva contra variaciones genéticas) o zona geográfica (a mayor distancia, mayor variación genética). Lo anterior refleja gran heterogeneidad y diversidad, lo

cual debe ser contemplado como parámetro previo a cualquier estudio de tipificación. Es por ello que el uso de diferentes tipos de marcadores genéticos, logran generar diferentes resultados, y por ende, para estudios de poblaciones, preferentemente deben emplearse diversas metodologías.

Artículos relacionados con caracterización mediante el empleo de la técnica RAPD's, como el caso de Bielakova y colaboradores (2002), lograron diferenciar con éxito tres diferentes hongos entomopatógenos empleando una serie de oligonucleótidos de operones universales. Vélez y colaboradores (2000), a partir del análisis con tres imprimadores universales, diferenciaron aislamientos de Bb provenientes de diferentes zonas geográficas e insectos hospederos.

En Bb también se ha empleado una serie de secuencias SSR's para estudios de caracterización, desarrollados por Rehner y Buckley (2003), los cuales han revelado no sólo diferencias entre poblaciones alrededor del mundo, sino diferencias inclusive entre aislamientos muy emparentados a nivel geográfico y de hospedero (McGuire *et al.*, 2005; Enkerli *et al.*, 2001; Rehner & Buckley, 2003; Wang *et al.*, 2003).

La caracterización molecular de este hongo, permitiría iniciar programas de mejoramiento genético, dilucidar sobre su constitución genética y su potencial en el desarrollo de toxinas más fuertes y eficientes; pero que a su vez, reduzcan los efectos secundarios en los humanos. Esto último se debe a que Westwood y colaboradores (2005), demostraron que Bb presenta la síntesis de proteínas productoras de reacciones alérgicas sobre IgE, en pacientes inmunosuprimidos expuestos al hongo. Estos datos se confirman con un caso de infección interna del hongo en un paciente de condiciones similares (Henke *et al.*, 2002). Aunque no se conoce su secuencia genética, su importancia a nivel de higiene y salud al ser humano es relevante en cuanto a su posterior supresión, con fines comerciales de productos más seguros e inocuos.

2. MATERIALES Y METODOS

Esta sección describe diferentes protocolos empleados y estandarizados durante el desarrollo de este Trabajo de Graduación. El mismo se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), en la provincia de Cartago, y en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones del Café (CICAFE), en Heredia.

2.1 Obtención de las muestras

Las diferentes muestras de hongos de *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (Bb) utilizadas, fueron brindadas por el CICAFE. Estas fueron obtenidas de diferentes zonas caficultoras del país, afectadas por el insecto *Hypothenemus hampei* Ferr. En la Tabla 1 se describen los sitios de recolección, según su ubicación regional. Adicionalmente, se presenta en la Figura 5, su ubicación aproximada en el mapa.

Se colectaron granos de café que presentaban en su interior, manchas blancuzcas, crecimiento fungoso y broca muerta. A partir de los granos, se sustrajeron los insectos, cultivaron en papel húmedo en placas Petri, esperando observar manifestaciones de la infección y la apariencia de Bb. Una vez confirmada la infección, se procedió a realizar cultivos multiespóricos en medios semi-sólidos de Agar Papa Dextrosa (PDA), con el fin de aislarla y purificarla.

En total, el CICAFE cuenta con más de diez cultivos diferentes, las cuales hacen referencia al lugar de su obtención. Las empleadas en este trabajo corresponden a: A103 Poás (A03), Orosi (Oro), Acosta (Aco), Tuis de Turrialba (TT), Coope2 de Turrialba (Co2), Sarchí (Sar), San Miguel de Naranjo (SMN), Pérez Zeledón Térraba (PZT), San Carlos (SCa) y Lagunilla de Heredia (LH).

Tabla 1 Sitios de recolección de las diferentes muestras de *Beauveria bassiana*

Código	Provincia	Cantón	Distrito	Fecha (mes-año)
A03	Alajuela	Poás	Sabanilla	Jun-03
SMN	Alajuela	Naranjo	San Miguel	Sep-03
Co2	Guanacaste	Tilarán	Quebrada Grande	Ago-04
Sar	Alajuela	Valverde Vega	Sarchí Sur	Ago-04
SCa	Alajuela	San Carlos	Dulce Nombre	Jun-05
Oro	Cartago	Paraíso	Orosi	Jul-04
TT	Cartago	Turrialba	Tuis	Jun-05
LH	Heredia	Centro	Ulloa	Mar-05
PZT	San José	Pérez Zeledón	Térraba	Mar-04
Aco	San José	Acosta	-	May-03

Modificado de: MSc. Miguel Barquero, Jefe del Laboratorio de Fitopatología, CICAPE

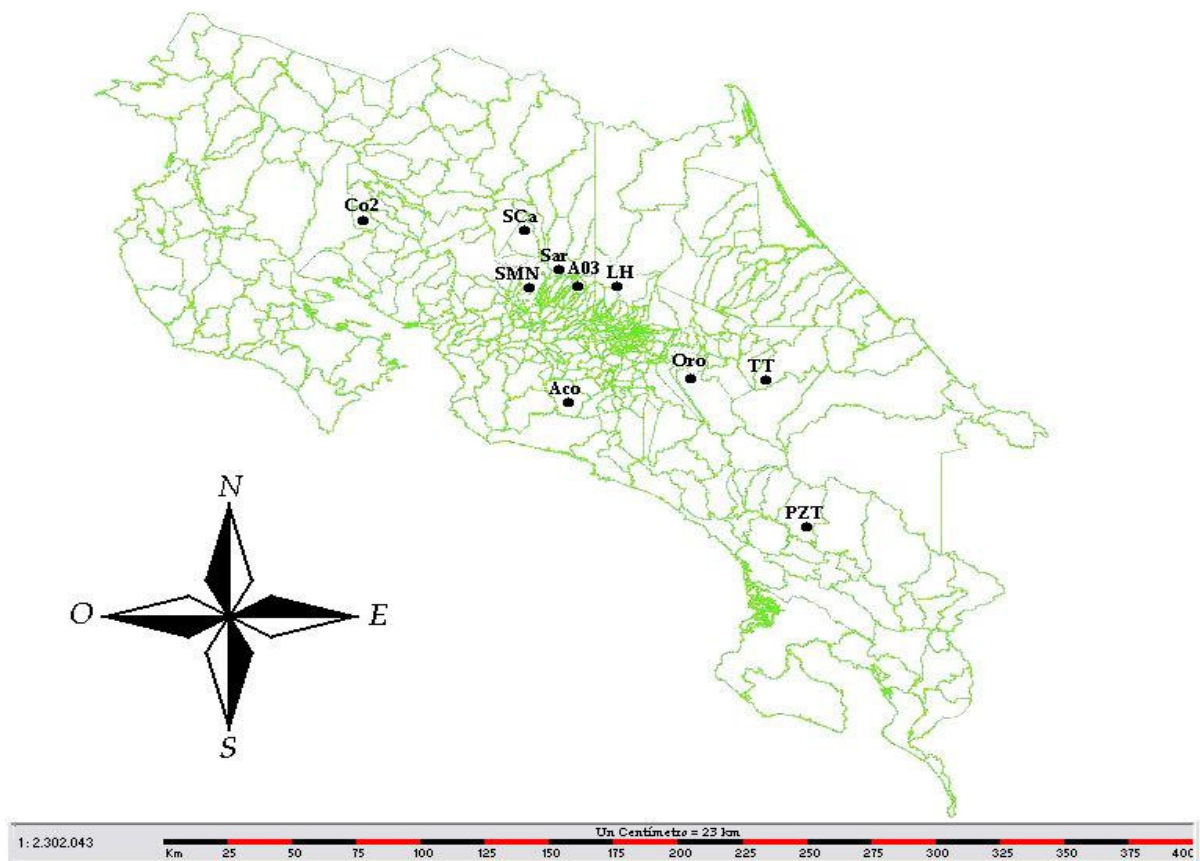


Fig. 5 Ubicación geográfica de los sitios de colecta (aproximado). Mapa de Distritos, ATLAS de Costa Rica 2000, Dr. Edgar Ortiz Malavasi, Escuela de Ingeniería Forestal, ITCR. Modificaciones realizadas con Adobe Photoshop® 6.0.

Los diferentes cultivos corresponden entonces, a una muestra de una localidad, donde fue obtenido el material. Cada uno representa un tipo de Bb, aunque hacen falta estudios en cuanto a la agresividad, crecimiento micelial, producción de esporas, actividad enzimática, resistencia a la luz ultravioleta y caracterización molecular para definir las específicamente.

2.2 Cultivo monospórico

Debido a la necesidad de contar con material puro, donde la variabilidad genética y características bioquímicas y fisiológicas sean más homogéneas (Estrada *et al.*, 1997), a partir de cultivos semi-sólidos de cada cepa, se cultivaron esporas con las cuales se obtienen cultivos monospóricos.

Se prepararon dos medios de cultivo semi-sólido: uno que contenía únicamente PDA (Difco™, premezcla), y otro con antibiótico, que contenía el PDA y oxitetraciclina (98% i.a.) al 10%, para evitar el crecimiento de contaminantes bacterianos.

A partir de cada cultivo multiespórico mantenido durante 15-21 días a 25°C y una humedad relativa del 70%, en una cámara de flujo laminar (NUAIRE), se cortó con bisturí estéril un cuadrado de aproximadamente 25 mm² de la superficie del medio donde crecía el hongo en forma notoria, y se disolvió en un tubo de ensayo de 15 ml con 9 ml de agua estéril. Una vez añadido, se agitó suavemente en un vortex (Maxi MixII, Thermolyne) aproximadamente 5 minutos, con la idea de disolver únicamente las esporas. Posteriormente se tomó 1 ml de la solución y adicionó en otro tubo de ensayo, con el fin de realizar un conteo directo de esporas en un microscopio (Microstar IV) a 40X, mediante el uso de un hemocitómetro (marca Bright Line), tomando en cuenta la esquina superior e inferior izquierda y derecha, y el centro (5 puntos), y únicamente aquellas unidades que se encontraban totalmente dentro del cuadrante o en el borde izquierdo y superior del cuadrante pequeño.

A partir del total de esporas contabilizadas, se determinó el volumen necesario de esta solución para obtener 10.000 esporas/ml en 10 ml de agua estéril en un nuevo tubo de ensayo² (Hansen 2000; Cascade Biologics 2002) (Figura 6). Una vez adicionado el volumen, se agitó fuertemente en el vortex. De esta dilución, se tomó 1 ml y se agregó en un tubo de ensayo nuevo, de tal manera que al tomar 2 µl y dispensar en una placa de Petri con cultivo previamente preparada (aproximadamente 10 ml de medio); se inocularan aproximadamente 20 esporas. Se agregó además a la placa 8 µl de agua estéril, distribuyendo homogéneamente con un tubo de vidrio en forma de “L”. Se cerraron las placas con papel parafina alrededor y se dejaron en el cuarto de crecimiento a 25°C y 70% HR, durante aproximadamente 24 horas. Se realizaron tres repeticiones para cada aislamiento.

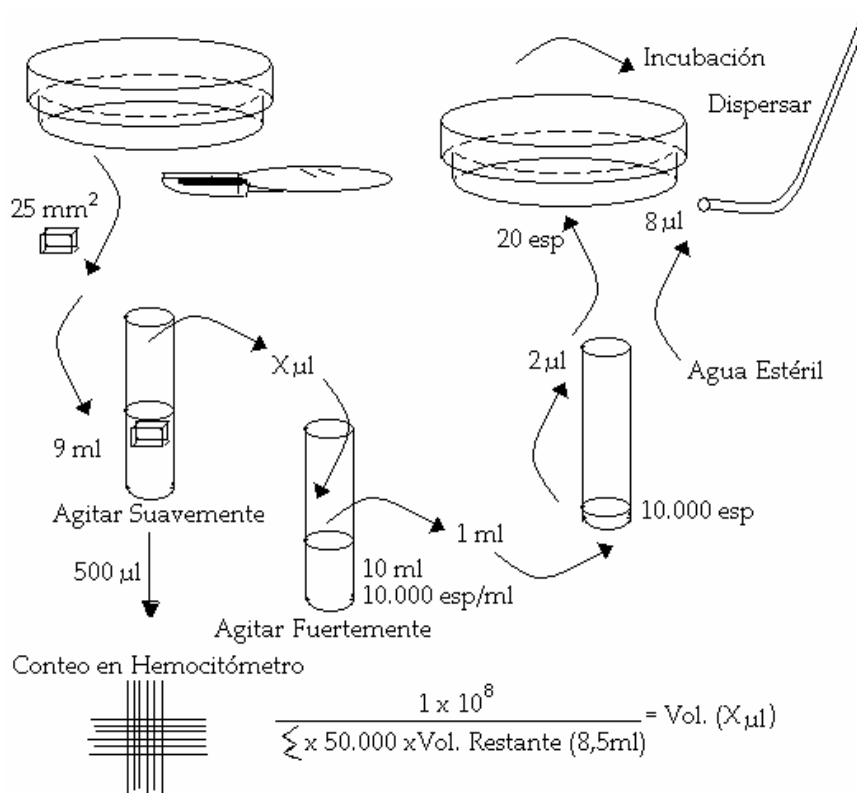


Fig. 6 Diagrama de la metodología empleada para la obtención de micelios monospóricos aislados y su cálculo correspondiente, a partir de cultivos multiespóricos.

² El número de esporas por mililitro de la dilución madre y el volumen correspondiente para la obtención del cultivo de esporas diluido por placa, puede observarse en la Tabla 9, Anexo 3.

Pasado este tiempo, se buscaron esporas germinando, originado por una sola espora (monoespórico) directamente en el inverso de la placa, con la ayuda de un estereoscopio (Nikon SMZ-10), según se observa en la Figura 7A. Una vez localizadas, se encerraron en un círculo (Figura 7B). Luego en la cámara de flujo laminar y con ayuda de un bisturí estéril, se cortó el área señalada (cuadrados de 16 mm² aproximadamente), volteó y colocó en una placa Petri con PDA recién preparada y gelificada, a manera de emparedado (Figura 7C). Se colocó un cuadrado por placa, procurando que como mínimo, un recorte quedase en placa con medio de PDA y otro con PDA y oxitetraciclina. Se dejaron en incubación bajo las mismas condiciones anteriores, durante 96 horas. Posteriormente se seleccionaron los cultivos con mayor crecimiento y apariencia uniforme (Figura 7D), los cuales se subcultivaron en placas con PDA (sin bacteriostático), para obtener mayor cantidad de material, mediante cortes con bisturí.

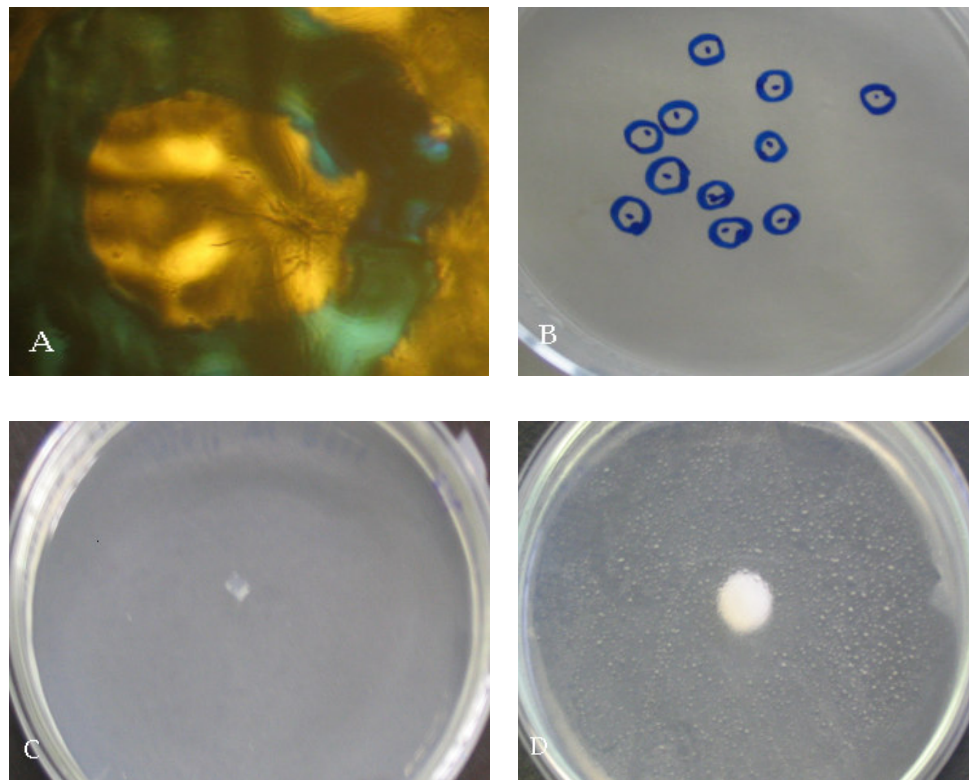


Fig. 7 Procedimiento de obtención de cultivos monoespóricos. A. Localización de micelio en inverso de placa (Aumento 2X). B. Selección de micelios dispersos provenientes de una sola espora (Visualización directa en la placa). C. Recorte cuadrado de medio con micelio colocado a manera de emparedado sobre un medio con PDA nuevo (Visualización directa en la placa) D. Germinación del cultivo monoespórico luego de 96 horas (Visualización directa en la placa).

2.3 Preparación de las matrices sólidas

Debido a la necesidad de aumentar la producción del hongo de cada una de las muestras, se prepararon matrices sólidas. Estas utilizan los granos de arroz como medio de cultivo en bolsas plásticas o frascos de vidrio.

Para la preparación en bolsa, se pesaron 300 g de arroz precocido, se colocó en una bolsa plástica de polipropileno resistente a la temperatura, y adicionaron 180 ml de agua destilada. Las bolsas se enrollaron en la abertura con tres dobleces separados por 1 cm aproximadamente y se engraparon, para ser autoclavadas durante 20 minutos. Para la preparación en frasco, se pesó 50 g de arroz, se adicionaron 25 ml de agua estéril, se tapó y autoclave por 20 minutos. Ambos sistemas, pasado este tiempo, se dejaron enfriar, se limpió el exterior con alcohol y se 70% e introdujeron en la cámara de flujo laminar hasta su uso.

A partir de los cultivos de Bb monospóricos en placa Petri con PDA, crecidos durante 15-22 días a 25°C y de buena esporulación, en la cámara de flujo laminar se raspó con un bisturí estéril en aproximadamente media placa. Se realizó una pequeña abertura en las bolsas con arroz, abriendo las grapas y se introdujo el raspado del hongo. Se cerró la abertura con grapas y se mezcló el arroz mediante movimientos rotativos. Para la preparación en los frascos, se les quitó la tapa, se adicionaron los raspados del hongo (un cuarto de placa), y luego se cubrió la tapa con papel parafina. Los inóculos se colocaron en el cuarto de crecimiento a 25°C y en oscuridad.

2.4 Caracterización Biológica

Con el objetivo de contar con información sobre el comportamiento de los diferentes aislamientos, se procedió a realizar una serie de ensayos, en los cuales se evaluaron los parámetros: grado de esporulación, resistencia a la luz ultravioleta, crecimiento radial, y agresividad ante la broca (*Hypothenemus hampei*). A continuación se detalla la metodología empleada.

2.4.1 Evaluación del grado de esporulación

A partir de las matrices sólidas crecidas durante más de 7 días, en la cámara de flujo laminar se pesaron 0,8 gramos de arroz colonizado (aproximadamente 20 granos), de cada muestra. Se disolvió en 25 ml de agua destilada en un frasco de cultivo *in vitro* mediante agitación en vortex. Se colocó una alícuota de 1 ml en un tubo de ensayo para luego determinar el número de esporas en solución de una alícuota de 500 μ l con el uso del hemocitómetro. A partir de los cultivos en bolsas, se realizaron 6 mediciones distanciadas por 5 días. Contabilizándose el número de esporas totales por medición para cada muestra, se procedió a comparar la producción de esporas por muestra aislada con un análisis *t* student (Prueba de Muestras Pareadas, SPSS 13.0).

2.4.2 Evaluación del crecimiento radial

A partir de muestras en placas de Petri, en la cámara de flujo laminar se tomaron discos de 0,5 cm de diámetro de medios con abundante crecimiento de las muestras germinadas durante 15-22 días (Cagán y Svercel 2001) en la zona del borde del crecimiento, con ayuda de un saca bocados de acero (Figura 8 A y B). Estos se sembraron dentro de una placa con PDA y oxitetraciclina (10%), en tres puntos de la placa distanciados (Figura 8C).

Las diez placas se incubaron a 25°C durante 15 días, los cuales cada 3 días se les determinó el crecimiento radial a cada disco, determinados mediante la longitud diametral del punto central, tomando dos mediciones en cruz, y promediando las dos mediciones (Tobar *et al.*, 1999; Cagán & Svercel, 2001, McGuire *et al.*, 2005) (Figura 8D).

Se promediaron los tres datos del crecimiento para cada muestra, según su crecimiento radial. Adicionalmente se determinó el Tasa Diaria de Crecimiento Radial (TDCR) determinado por milímetro por día, obtenido al promediar las diferencias de la longitud radial entre las mediciones consecutivas (día 3 menos día 0; día 6 menos día 3, etc.) para las

diferentes muestras. La TDCR fue comparada con un análisis de *t* student ($P=0,05$) y de varianza (Microsoft Office Excel 2003).

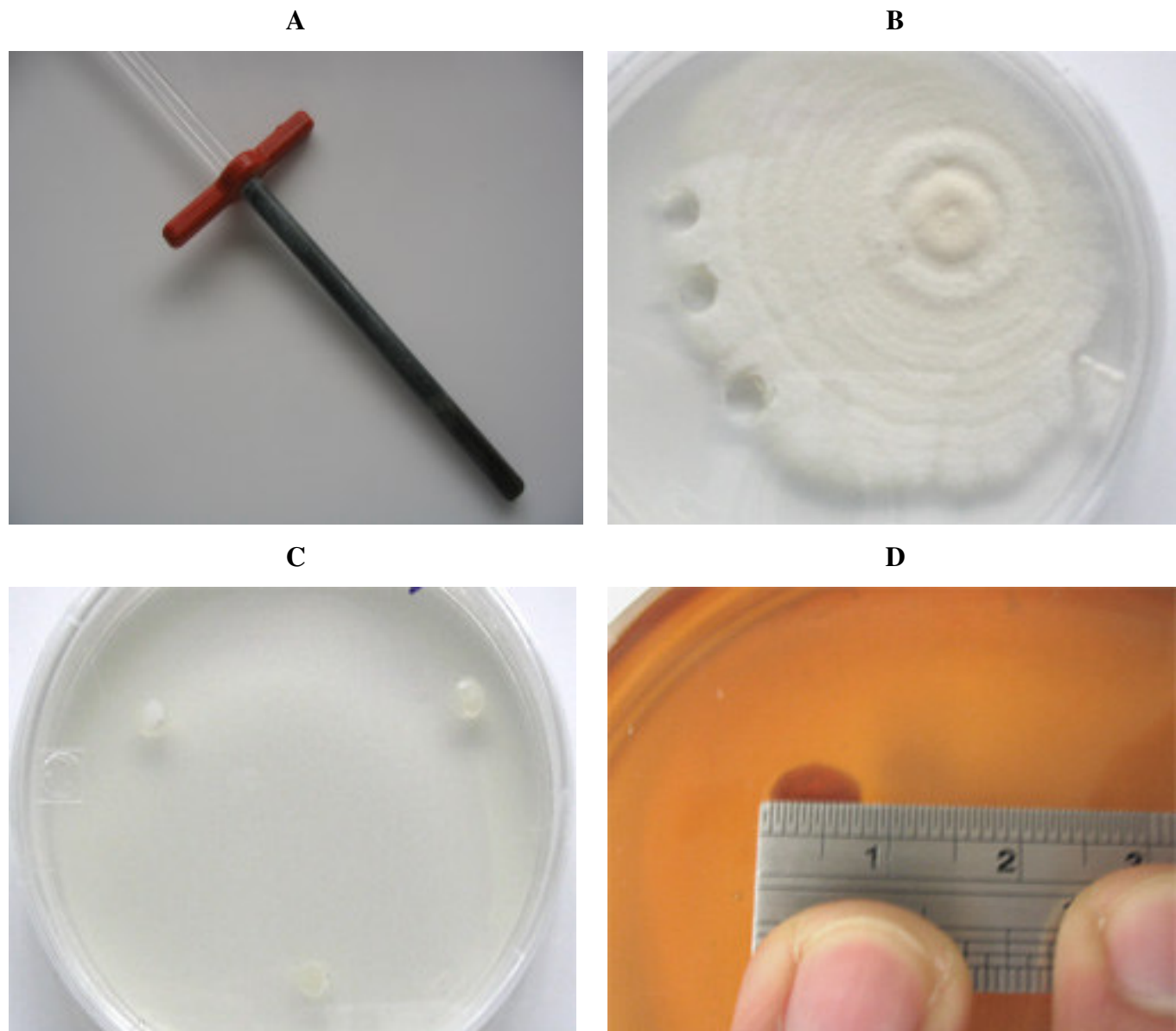


Fig. 8 Procedimiento para la evaluación del crecimiento radial. A. Sacabocados con varilla de vidrio utilizado para obtener los círculos. B. Zona de obtención de los bocados. C. Bocados obtenidos colocados en placa. D. Medición del diámetro en zona central del bocado en inverso.

2.4.3 Evaluación de la resistencia a la luz Ultravioleta

El conteo de esporas de la solución del punto 2.4.1, se empleó para realizar los cálculos correspondientes para ajustar el volumen necesario para obtener de cada muestra, 10 ml de solución a una concentración de 1×10^6 esporas/ml, mediante la fórmula: $C_1V_1=C_2V_2$, donde C_1 corresponde a la concentración esporas por mililitro determinadas según conteo en hemocitómetro para el volumen restante en el tubo de ensayo; C_2 la concentración que se deseaba obtener (1×10^6 esp/ml) en un volumen V_2 (10 ml); y V_1 o volumen a tomar de la solución inicial (Figura 9A) (Hansen, 2000; Cascade Biologics, 2002; Cagán & Svercel, 2001; Haraprasad *et al.*, 2001; Tobar *et al.*, 1999).

De esa solución (10 ml con una concentración 1×10^6 esporas/ml), se trasvasó con pipeta en 4 tubos de ensayo de 15 ml, colocando 1 ml en cada tubo. Cada uno de los tubos se cerró y se expuso a un tratamiento específico dentro de la cámara de flujo laminar, variando el tiempo de exposición a una radiación ultravioleta de 254 nm, a 100 watt de potencia, y una distancia de 17 cm, utilizando una lámpara Longwave UV Lamp (Black-Ray, modelo B-100A) (Figura 9B).

Los tratamientos de exposición fueron: 1) 0 minutos (Control); 2) 10 min.; 3) 20 min, 4) 30 min. Se procedió con el tratamiento número 1, luego con el 4, después con los tratamientos 3 y 2, de manera respectiva, para evitar la interrupción de la luz UV para realizar posteriormente los inóculos. Cada tubo fue colocado acostado, centrado a la incidencia de la fuente de luz, de tal forma que todos los tubos estuviesen con la base del tubo en contacto, y la luz incidiese de igual manera a todos los tubos.

Luego de transcurrir el tiempo de cada tratamiento, se tomaron 200 μ l de medio líquido caliente de PDA y se colocó en forma de gota uniforme y ligeramente esparcida, en la superficie de un portaobjetos estéril. Se esperó a que se gelificara (15 segundos aproximadamente) y de la solución de esporas del tratamiento, se adicionaron 20 μ l

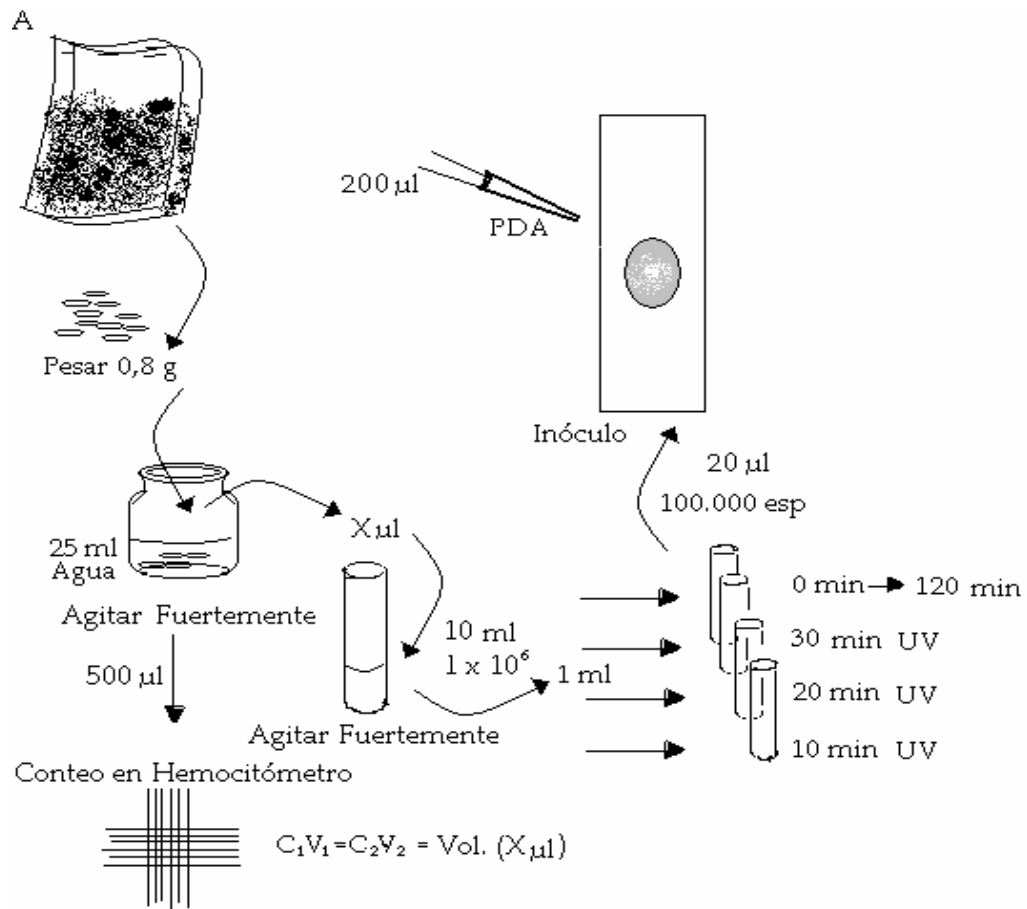
(aproximadamente 100.000 esporas) en forma de gota en el medio recién gelificado. Este se esparció ligeramente por la gota de PDA y por gravedad se terminó de distribuir.

Los portaobjetos previamente se habían autoclavado con papel filtro, por lo que a la hora de terminar la inoculación, se extendió el papel en un recipiente plástico tipo “topper”, se humedeció levemente y de forma homogénea el papel con agua estéril y colocó los portaobjetos encima y se cerró el recipiente.

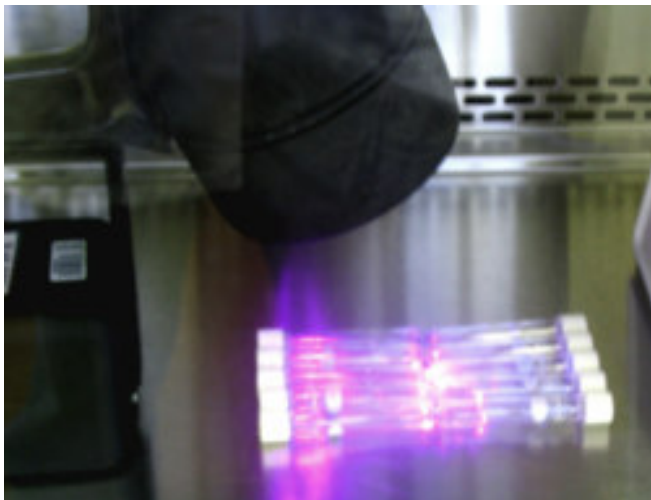
Como el proceso para todas las muestras y todos los tratamientos se realizaron el mismo día, las muestras que iban a ser evaluadas de último, estarían más tiempo en suspensión que las anteriores, por ende, luego de finalizar los tratamientos de exposición a la luz ultravioleta, se tomaron 20 µl de cada muestra del tratamiento “0” (Control), y se distribuyó de la misma forma en portaobjetos, de tal manera que fuese un control de la viabilidad de las esporas sin exposición a la luz ultravioleta pero a las 2 horas aproximadamente de prepararse la solución.

Los inóculos se dejaron crecer durante 18-24 horas a 25°C y se evaluó el porcentaje de germinación, observando al microscopio a 10X los portaobjetos en distintas áreas donde se pudiesen contabilizar al menos 100 esporas (Devotto & Gerding, 2003; Cagán & Svercel, 2001; Tobar *et al.*, 1999). Se consideró como germinado aquella espora que haya desarrollado filamentos de las hifas alrededor, y no germinado aquella estructura visiblemente esférica sin extensiones laterales (Figura 9C).

Se realizaron tres repeticiones, con las cuales se realizó un análisis de ANOVA y Tukey (SPSS 13.0) para comparar los diferentes tratamientos y el porcentaje de germinación luego del tiempo establecido, para cada muestra.



B



C



Fig. 9 Procedimiento para la evaluación de las muestras a la luz Ultravioleta. A. Diagrama de los principales pasos realizados durante el procedimiento. B. Exposición de las soluciones a la luz Ultravioleta. C. Espora germinada (izquierda) versus no germinada (derecha). 4X.

2.4.4 Evaluación de la agresividad ante la broca

La evaluación de la patogenicidad ante *H. hampei*, se realizó mediante la exposición a una solución de 1×10^6 esporas/ml en un tubo de ensayo durante 1 minuto, a 20 insectos adultos (Haraprasad *et al.*, 2001).

Las brocas fueron tomadas de trampas para brocas de cafetales del CICAPE y de un cuarto para el criadero del mismo. En el laboratorio, las brocas se introdujeron en una gasa y encerraron a manera de bolsa con ayuda de una liga de hule. Se preparó una solución de cloruro de benzalconio al 14%, donde se sumergieron las brocas por periodos de 1 minuto. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada repitiendo el paso anterior. Posteriormente las brocas fueron secadas con ayuda de un ventilador y a temperatura ambiente, durante unos 40 minutos aproximadamente. Luego de este tiempo, fueron colocadas en un recipiente plástico esterilizado con alcohol al 70% e introducidos en la cámara de flujo laminar³.

Los hongos fueron tomados de las matrices después de germinados durante 15 días, según la metodología empleada en el punto 2.4.3. Se preparó la solución madre y procedió a realizar un conteo directo de esporas en el microscopio con ayuda del hemocitómetro. A partir de los datos, se diluyeron las soluciones hasta obtener la concentración deseada en 10 ml de agua destilada.

Cada insecto fue recogido uno por uno con ayuda de pinzas estériles y se colocaron en los tubos con solución del hongo, con cuidado de no tocar la solución con las pinzas. Se buscaron brocas activas, puesto que por el mismo proceso de infección, podría provocar el deceso de algunas.

Una vez sumergidos los insectos, se agitaron levemente en vortex y dejó reposar 1 minuto. Posteriormente, una por una cada broca fue colocada en placas Petri a 25°C con papel filtro

³ La preparación de los insectos se llevó a cabo con la con ayuda del Lic. Giovanni Guerrero Lizano.

circular humedecido con aproximadamente 1 ml de la misma solución de esporas (Estrada *et al.*, 1997).

Se realizaron dos repeticiones distanciados en tiempos diferentes con un control, donde se sumergieron los insectos en únicamente agua estéril. Se observó el desarrollo del hongo y la sobrevivencia del insecto cada 3 días por un periodo de 12 días, promediando las repeticiones. En cada evaluación, se observó la presencia o ausencia de esporulación en los insectos y una medición final, en la cual se realizó una taxidermia de los insectos muertos. Esto fue mediante la ayuda de un bisturí y un estereoscopio (Nilon SMZ-100), cuyo fin fue el confirmar la patogenicidad del hongo (Haraprasad *et al.*, 2001).

Se realizaron análisis estadísticos de ANOVA y Chi-cuadrado para evaluar las diferencias en la mortalidad de los insectos y distribución normal de los datos (SPSS 13.0, para un intervalo de confianza del 95%). Análisis de *t* student (Microsoft Office Excel 2003) fue empleado para comparar los resultados de esporulación. Adicionalmente se realizó una prueba de correlación Pearson, para averiguar si existía relación entre la mortalidad de las brocas y la esporulación observada.

2.5 Caracterización Molecular

2.5.1 Extracción de ADN

2.5.1.1 Protocolos evaluados

Para la extracción del ADN, se buscaron protocolos para hongos y propiamente para Bb. De ellos se seleccionaron tres, de acuerdo con las facilidades de reactivos y equipo del laboratorio y posibilidad de adaptarse. En este trabajo se probaron y modificaron los protocolos de Vélez y colaboradores (2000), Zambrano y colaboradores (2002), y Wizard (Promega, 2005).

Para la metodología de Vélez y colaboradores (2000) se tomó de 20-150 mg de hongo fresco a partir del raspado con bisturí de una placa completa. Una vez pesado, se maceró con 5 ml del buffer de extracción (concentraciones de reactivos no modificados) en un mortero. Se trasvasó la solución a un tubo Falcom de 15 ml y se incubó a 60°C en baño maría durante una hora. Posteriormente se trasvasaron 750 µl de la solución a tres tubos para micro centrífuga de 1,5 ml, y adicionó 750 µl de solución cloroformo: isoamilalcohol (24:1) a cada uno, para luego centrifugar a 3600 r.p.m. (Centrifugue 5415D) durante 15 minutos. Se repitió el paso anterior y trasvasó el sobrenadante a otro tubo, adicionándose 270 µl de isopropanol frío. Se precipitó a 13200 r.p.m. y resuspendió en 50 µl de buffer TE. Se adicionaron 3 µl de ARNasa A (10mg·ml⁻¹), e incubó una hora a 37°C en baño maría. Pasado este tiempo, se adicionaron 30 µl de cloroformo: isoamilalcohol (24:1) al sobrenadante y centrifugó 15 minutos a 3600 r.p.m. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo, se adicionaron 120 µl de etanol absoluto frío y se centrifugó 3 minutos a 3000 r.p.m. El precipitado se lavó con etanol 70% y dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente el botón se resuspendió en 20 µl de buffer TE y almacenó a -20°C.

Para la metodología sugerida por Zambrano y colaboradores (2002), se pesaron 130 mg de micelio y adicionaron en un tubo para micro centrífuga de 1,5 ml. Se agregaron 300 µl de

buffer TES (concentraciones no modificadas) e incluyó 260 mg de limadura de vidrio. Se maceró con pistilo y luego agitó 30 segundos en vortex. Se adicionaron luego 200 μl de buffer TES con 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteinasa K y volvió a agitar en vortex. Luego, se incubó en baño maría a 65°C por 30 minutos. Pasado este tiempo, se adicionaron 250 μl de acetato de sodio según las especificaciones, mezcló en vortex 10 segundos e incubó en hielo (4°C) durante 10 minutos. Luego se centrifugó 20 minutos a 13200 r.p.m. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y adicionaron 700 μl de isopropanol frío. Los tubos se incubaron 2 horas a -20°C dentro de un congelador. Pasado este tiempo, el precipitado se lavó con 800 μl de etanol frío a 70% y dejaron secando boca abajo a temperatura ambiente. El precipitado se lavó dos veces con 250 μl de buffer TE, agitando y centrifugando (30 segundos a máxima velocidad), para por último volver a resuspender en buffer TE y trasvasar a un tubo nuevo. A esta solución se le adicionaron 8,5 μl de ARNasa A (10mg·ml⁻¹) e incubó una hora a 37°C. Se adicionó luego 500 μl de isopropanol frío e incubó una hora a -20°C en el congelador. Posteriormente se precipitó en centrífuga 15 minutos a 13200 r.p.m. el botón se lavó con 400 μl de etanol 70% frío. Se dejó secar boca abajo a temperatura ambiente y resuspendió en 100 μl de buffer TE. Se almacenó a -20°C.

A continuación se desglosa el protocolo modificado Wizard (Promega, 2005): se calentaron dos beakers de 500 ml con aproximadamente 350ml de agua a 37 y 65°C. Se taró la balanza analítica con un para micro centrífuga de 1,5 ml. En la cámara de flujo laminar se abrió la placa con hongo germinado 15-22 días de crecimiento a 25°C, y raspó con ayuda de bisturí estéril la totalidad de la superficie del medio de cultivo. Se depositó el raspado en el para micro centrífuga y completó hasta aproximadamente la nivelación de la curva del botón del tubo (primera marca) alcanzando un peso entre un 20-50 mg. Se adicionó el doble del peso total (40-100 mg) de limadura de vidrio de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, y 300 ml (6 V) del Buffer de Extracción TES modificado⁴ (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0, 0,5% SDS). Se maceró vigorosamente y sobre hielo con ayuda de un pistilo, hasta obtener una mezcla líquida uniforme. El homogenizado se agitó durante 15

⁴ Concentraciones ajustadas según resultados obtenidos por el PhD. Kenneth Madríz Ordeñana, Biotécnica, Laboratorios Moleculares S.A.

segundos en vortex y se dejó en baño maría 45 minutos a 65°C. Pasado este tiempo, se dejó enfriar unos 15 minutos y agregaron 2 µl de ARNasa A (10mg·ml⁻¹), para incubar a 37°C durante 15 minutos en baño maría. Se dejó enfriar luego a temperatura ambiente unos 5 minutos y agregaron 150 µl (0,5 V) de Acetato de Potasio (KOAc) 5 M. Se mezcló mediante invertidos suaves y centrifugó a 13.200 r.p.m. durante 4 minutos. En un nuevo tubo para micro centrífuga de 1,5 ml, se trasvasó el sobrenadante y adicionaron 300 µl (1 V) de isopropanol frío. Se dejó reposar 10 minutos en hielo para luego centrifugar a 13.200 r.p.m. durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y agregaron 210 µl (0,7 V) de etanol 70% frío al botón. Se mezcló mediante invertidos suaves y centrifugó a 13.200 r.p.m. durante 3 minutos. Se descartó luego el sobrenadante, dejó secando el botón boca abajo a temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos), para luego resuspender en 70 µl de Buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0). La solución se dejó almacenado a -20°C hasta su uso.

2.5.1.2 Evaluación de la calidad y pureza

Para evaluar la pureza de la extracción realizada con el protocolo modificado Wizard (Promega, 2005), se realizaron 2 métodos: electroforético y espectrofotométrico.

El análisis espectrofotométrico se realizó un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 10UV. Para ello se realizaron diluciones 1:200 (5 en 995 µl de agua destilada) de la solución de ADN de cada muestra. Se cargó 1 ml de la dilución en el tubo de cuarzo y determinó en el espectrofotómetro la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda (previa calibración del blanco con agua destilada), de tal forma que se pudiese calcular la relación que determina el tipo de contaminación según la fórmula: Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ (Creighton, 1999; Iáñez, 2005). Si este valor es mayor de 1.8, el resultado sería debida a contaminación por ARN; y si es menor, por fenol o proteínas.

La concentración del ADN también puede ser calculada por el método anterior, según la fórmula: Concentración de ADN (ng/µl) = Abs 260 x 50 x Factor Dilución (1:200) (Coll *et al.*, 2005, Valadez & Kahl, 2000).

Para la evaluación electroforética de las muestras, se tomaron 10 µl de cada muestra y 2 µl de Buffer de Carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25 % azul xilen cianol y 30 % glicerol) y corrió en una electroforesis de gel de agarosa al 1%, a 100 V durante 1 hora. Se utilizó el marcador de masa MassRuler™ DNA Ladder, Mix (Fermentas, #SM0403), para comparar la intensidad de las bandas y determinar la concentración de ADN extraída para cada muestra. Adicionalmente, este método también verifica la presencia de contaminación por ARN.

2.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

2.5.2.1 Ensayos con RAPD's

Con el objetivo de asegurarse que la extracción de ADN pudiese ser adecuada para PCR, se realizaron una serie de RAPD's, empleando los imprimadores OPE-01, OPE-03, OPA-01 y OPA-13. La secuencia de cada oligonucleótido se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2 Secuencia nucleotídica de los imprimadores utilizados durante el ensayo RAPD's

Imprimador	Secuencia (5'-3')
OPE-01	CCCAAGGTCC
OPE-03	CCAGATGCAC
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-13	CAGCACCCAC

Fuente: OPERON 2002

La solución de 13.7 µl de volumen total por reacción, contenía 4 µl de agua PCR, 1.5 buffer PCR 1X, 2.1 µl MgCl₂ (25 mM), 0.6 µl dNTP's (10 mM), 3 µl de cada primer (10 mM), 0.5 µl de *Taq* polimerasa (5 U/µl), y 2 µl de dbADN. La solución respectiva con Master Mix y la muestra de ADN se colocaron en un tubo para PCR sin tapa, adicionaron dos gotas de aceite mineral. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Genius Techne, según el siguiente perfil térmico: un ciclo de desnaturalización de 1,5 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a

94°C, 30 segundos a 35°C de alineación y 1 minuto de extensión a 72°C, por último, una extensión final de 3 minutos a 72°C. Se realizó un paso de almacenamiento a 4°C. Los productos de la amplificación fueron observados luego de realizar una electroforesis en agarosa al 1%, una hora a 100V, y teñir con bromuro de etidio.

2.5.2.2 Evaluaciones con microsatélites

Se emplearon ocho pares de iniciadores descritos por Rehner y Buckley (2003). Estos han sido evaluados por los mismos autores en diferentes cepas del hongo, y han demostrado alta diferenciación, variando entre 4 a 8 alelos por locus. Los iniciadores fueron sintetizados por InvitrogenTM, y fueron resuspendidos en agua de PCR según los cálculos correspondientes. En la Tabla 3 se muestra la secuencia de los imprimadores, secuencia que busca amplificar, tamaño de los productos y temperatura de hibridación calculada.

En cuanto a las condiciones del PCR, se empleó la metodología sugerida por McGuire y colaboradores (2005), con algunas modificaciones para favorecer la resolución y amplificación: disminución de la temperatura de hibridación a 54°C; adición de un ciclo de extensión a 72°C luego del primer ciclo; y dilución de las muestras de ADN (1:10). A continuación se desglosa la metodología empleada:

La amplificación del PCR fue realizada en un volumen final de 20 µl, dentro de tubos para PCR. La Master Mix contenía: 20 ng de dbADN de la muestra, 0.1 µM de cada primer (sentido y antisentido), 1X de Buffer PCR, 2.5mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's y 1U *Taq* polimerasa. La Master Mix fue realizada en tubo para micro centrífuga de 600 µl y con el termociclador a 4°C para evitar la desnaturalización. El orden de la adición de cada reactivo y el volumen adicionado se puede observar en la Tabla 10 del Anexo 4. Adicionalmente se empleó siempre un control negativo de la reacción, que sólo contenía agua de PCR.

Empleando un termociclador BioRAD MyCyclerTM, se realizó el siguiente perfil térmico: un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, 10 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30

segundos a 54°C de alineación, disminuyendo 0,5 grados centígrados por ciclo, y 1 minuto de extensión a 72°C; un ciclo de 15 minutos a 72°C, seguido por 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C, y 1 minuto a 72°C, y una extensión final de 6 minutos a 72°C. Se realizó un último paso de almacenamiento a 4°C.

Tabla 3 Secuencia y principales características de los 8 pares de imprimadores empleados.

	Secuencia Primer (5'-3') Forward (F); Reverse (R)	Locus (GenBank*)	Secuencias repetidas	Tamaño del fragmento del alelo (núm.; tamaño promedio) en pb	Temperatura de Hibridación (°C)**
1	F CCAACCCAATCAATCGTCAT	Ba01	(CA) ₁₄	103 (4;100-120)	53
	R GAGAGGCGGAGCTAAGCA	(AY212020)			
2	F AACGCTATGCCTTGACGAC	Ba02	(CA) ₂₀	140 (10;110-160)	53
	R GACGCCGAGCAATGTAACA	(AY212021)			
3	F GCATAGATATGTCTCGCACC	Ba03	(CA) ₂₆	146 (5;120-160)	53
	R ACTACCTGTCCCGCTGA	(AY212022)			
4	F AGGCAATACCGAGGTTGGC	Ba05	(GAT) ₁₅	160 (5;110-175)	55
	R ATCCATGGCGAGCCGTCC	(AY212023)			
5	F GCGATTGACGAAAAGCTAGA	Ba06	(GTT) ₁₀	114 (7;105-125)	53
	R ACTTGCTTTGCTGTTGCACA	(AY212024)			
6	F TGTTGCCGACACGAATTGT	Ba08	(AAG) ₁₀	210 (8;200-250)	55
	R GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA	(AY212025)			
7	F GGGTCCATCATGTACGGC	Ba12	(CTT) ₇	231 (8;200-240)	53
	R AGGCGTATACAGGTCGTG	(AY212026)			
8	F CAGGCAACAACACGATTTCA	Ba13	(AAG) ₉	161 (5;140-170)	53
	R ATGCCATCTACGACTTTATGA	(AY212027)			

* Número de Acceso en la Base de Datos de Genes del NCBI (GenBank, 2005)

**Calculado mediante la fórmula: $4(G+C)+2(A+T) - 5$

Modificado de Rehner & Buckley (2003)

2.5.3 Separación electroforética de los productos amplificados

Los productos de la PCR fueron luego separados en un gel de agarosa al 3 % utilizando buffer Tris-Ácido Acético Glacial-EDTA (TAE) 1X, teñidos con 1 µl de bromuro de etidio ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), por cada 50 ml de solución de agarosa. Como marcador del tamaño de los

fragmentos amplificados, se colocaron 3 μ l del marcador FastRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas, #SM1103).

La corrida se realizó durante 2 horas y 15 minutos, a 80 V y 150 mA, en una cámara para electroforesis Pharmacia Biotech GNA100 de 100 ml. Se cargaron 10 μ l de la muestra y 2 μ l de buffer carga (6X) en cada pozo, y el revelado se realizó en un transiluminador de luz Ultravioleta Hoefer Macro Vue UV-20. Cada gel fue fotografiado para su posterior interpretación.

2.5.3.1 Interpretación de las bandas

El patrón de bandas de cada muestra y por cada primer, fue interpretado según la presencia o ausencia de bandas, y se dieron prioridad a aquellas bandas altamente reproducibles y de fuerte intensidad y fácil distinción. Aquellas bandas que se encontraban más allá de las 400 pares de bases, fueron consideradas como productos no específicos, y por ello, tampoco fueron incluidas en el análisis.

2.5.4 Elaboración del dendrograma

El patrón de bandas se analizó mediante el índice de Jaccard (1908). Se construyó una matriz de datos, asignando un valor de 1 cuando la banda estaba presente, y 0 cuando no lo estaba. Estos datos fueron empleados para calcular el coeficiente de similitud de Jaccard (S), según la fórmula $S_{ij} = a / (a + b + c)$, donde S es la similitud entre dos aislamientos *i* y *j*, a el número de bandas presentes en *i* y *j*, b el número de bandas presentes en *i* pero ausentes en *j*, y c el número de bandas ausentes en *i* pero presentes en *j*. Con base en la matriz, se elaboró un dendrograma aplicando el Método del Vecino más Cercano (Nearest Neighbor), con el programa SPSS 13.0. Los cálculos de coeficientes de similitud, distancia genética y dendrogramas, se realizaron con el mismo programa. Los datos del dendrograma fueron utilizados para comparar y diferenciar grupos genéticos según el sitio de colecta y las diferentes características biológicas de cada aislamiento.

3. RESULTADOS

3.1 Cultivo Monospórico

El crecimiento en la placa de Petri de los diferentes cultivos monospóricos, presentó una consistencia viscosa de color blanco, forma irregular y filamentosa, elevación plana y ligeramente abultada en los centros de los radios, con un margen ligeramente lobulado (Figura 10).



Fig. 10 Patrón de crecimiento de tres inóculos de *Beauveria bassiana* a los 22 días de inoculado en medio de PDA.

3.2 Preparación de las matrices sólidas

A partir del raspado de placas con buen crecimiento (Figura 11A), se obtuvo luego de siete días, un crecimiento homogéneo del hongo, dando una apariencia blancuzca, especialmente en los medios cultivados en bolsas (Figura 11B).

Por su parte, el crecimiento en frascos no fue considerable, dándose una apariencia amarillenta en los granos de arroz donde el hongo no había colonizado, principalmente en las zonas más cercanas a la tapa (Figura 11C).

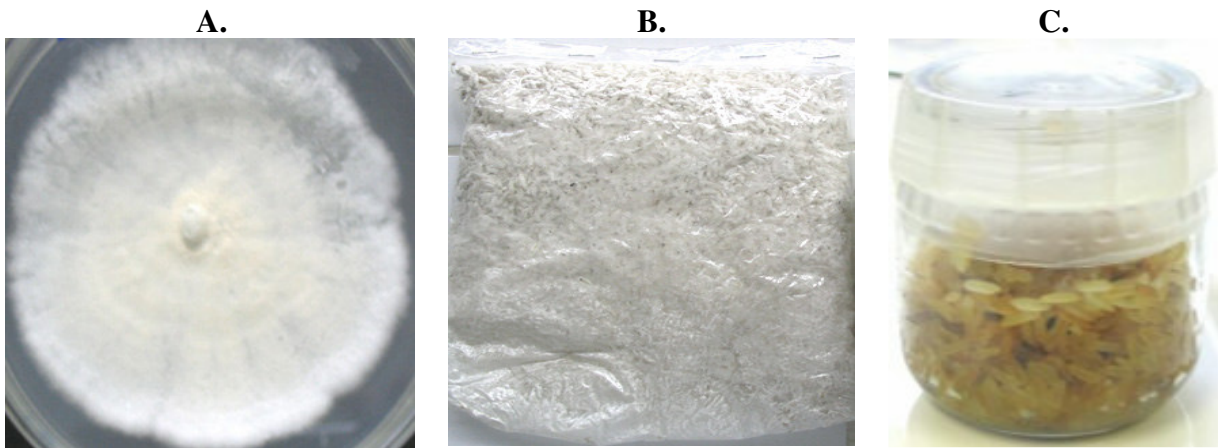


Fig. 11 Matrices sólidas: A. Estado de placa con buena esporulación. B. Estado de arroz inoculado luego de 7 días de crecimiento en bolsa. C. Estado de arroz inoculado luego de 7 días de crecimiento en frasco.

3.3 Caracterización Biológica

3.3.1 Evaluación del grado de esporulación

Las diferentes muestras mostraron en las repeticiones, un nivel de esporulación un poco fluctuante. Sin embargo, aunque las diferentes mediciones variaban, se pudo promediar y comparar respecto a los diferentes aislamientos, tomando esta evaluación como un parámetro comparativo pero poco reproducible.

En la Figura 12 se muestran la concentración de esporas contabilizadas en hemocitómetro para los diferentes aislamientos.

Se pudo observar una mayor producción de esporas en los aislamientos Sar, LH, A03, SMN, SCa, Aco, y Co2, en orden decreciente. En los aislamientos TT, Oro y PZT, por su parte, no se observó un alto grado de esporulación. Estos datos coinciden con lo obtenido del análisis estadístico (Tabla 5), donde las muestras con mayor esporulación, mostraron diferencias significativas respecto a aquellas con poca esporulación. Además, estadísticamente no se evidenció diferencias en cuanto a las cepas que presentaron una esporulación mayor de los $2,08 \times 10^6$ esp/ml.

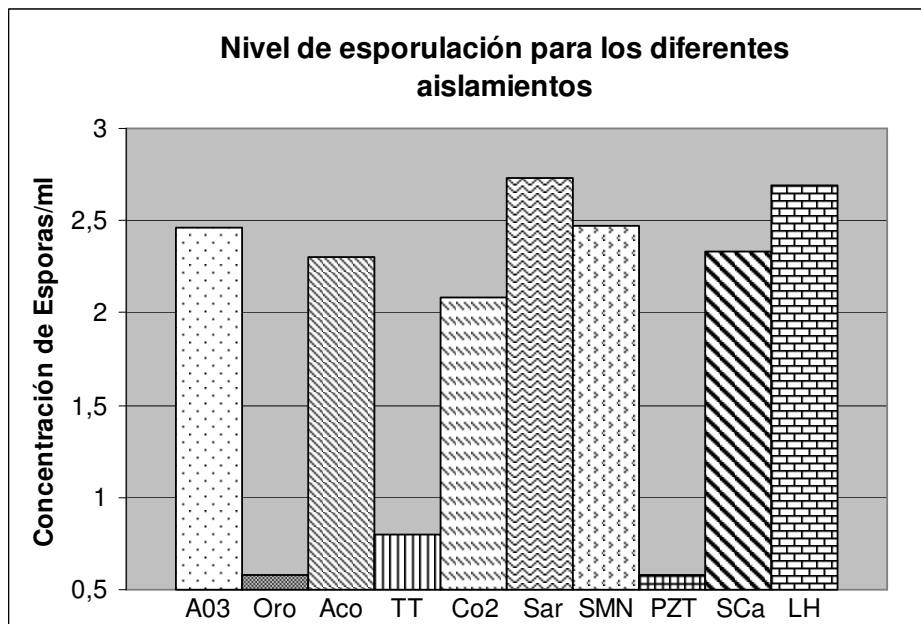


Fig. 12 Concentración promedio de esporas/ml ($\times 10^6$) por gramo de arroz, contabilizadas para los diferentes aislamientos de Bb. Microsoft Office Excel 2003

En placa, los aislamientos con mayor producción de esporas presentaron un color más café a los siete días de crecimiento, siendo blancuzco en aquellas cuya producción es reducida. En cuanto a su pigmentación, todas las esporas fueron blancas al microscopio.

3.3.2 Evaluación del crecimiento radial

En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos para la Tasa Diaria de Crecimiento Radial (TDCR) y la varianza para las repeticiones de cada muestra. El análisis estadístico reveló que hubo diferencias significativas para el valor del TDCR en las muestras SCa ($P=1,00$), Sar ($P=0,86$) y SMN ($P=0,81$). Además, la varianza fue muy alta en el aislamiento SCa, donde se notó un crecimiento más agresivo en dos de los tres discos (Figura 13B).

El crecimiento en la mayoría de las placas fue en forma expansiva y homogénea alrededor del círculo inoculado; en los demás casos, el crecimiento se vio influenciado hacia un lado, debido a que algunas esporas lograron caer en los alrededores y germinar, por lo tanto, se

consideró para la medición, zonas donde el crecimiento fue regular y de alguna forma, fácilmente distinguible su progreso desde su centro que le dio origen (Figura 13A).

Tabla 4 Tasa Diaria del Crecimiento Radial (TDCR) y varianza para los diferentes aislamientos

Aislamiento	TDCR (mm/día)	Varianza
Aco	0,87	0,163
Oro	0,90	0,161
A03	0,83	0,511
LH	0,95	0,075
Co2	0,87	0,375
SMN	1,27*	0,990
Sar	1,23*	0,764
SCa	2,43*	3,676
PZT	0,83	0,161
TT	0,78	0,197

* Mostraron diferencias significativas ($P=0,05$)

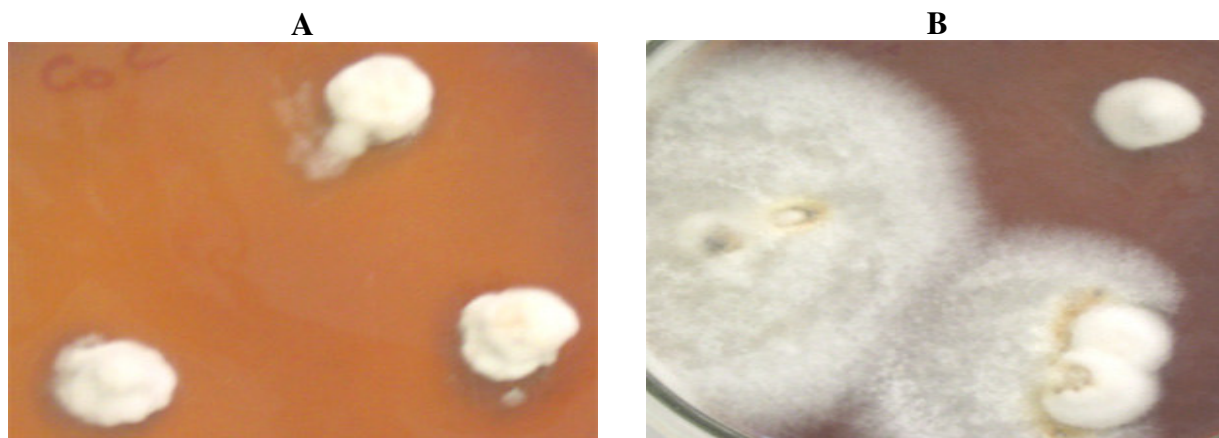


Fig. 13 Apariencia del crecimiento radial en placa. A. Abajo: Crecimiento algodonoso en forma circular. Arriba: Crecimiento favorecido hacia un lado. B. Crecimiento agresivo de dos repeticiones. Fotos Tomadas a los 8 días de iniciar el ensayo.

El crecimiento radial promedio en general, mostró una conducta lineal conforme avanzaron los días, iniciando un crecimiento notorio a partir de los tres días de evaluado (Figura 14).

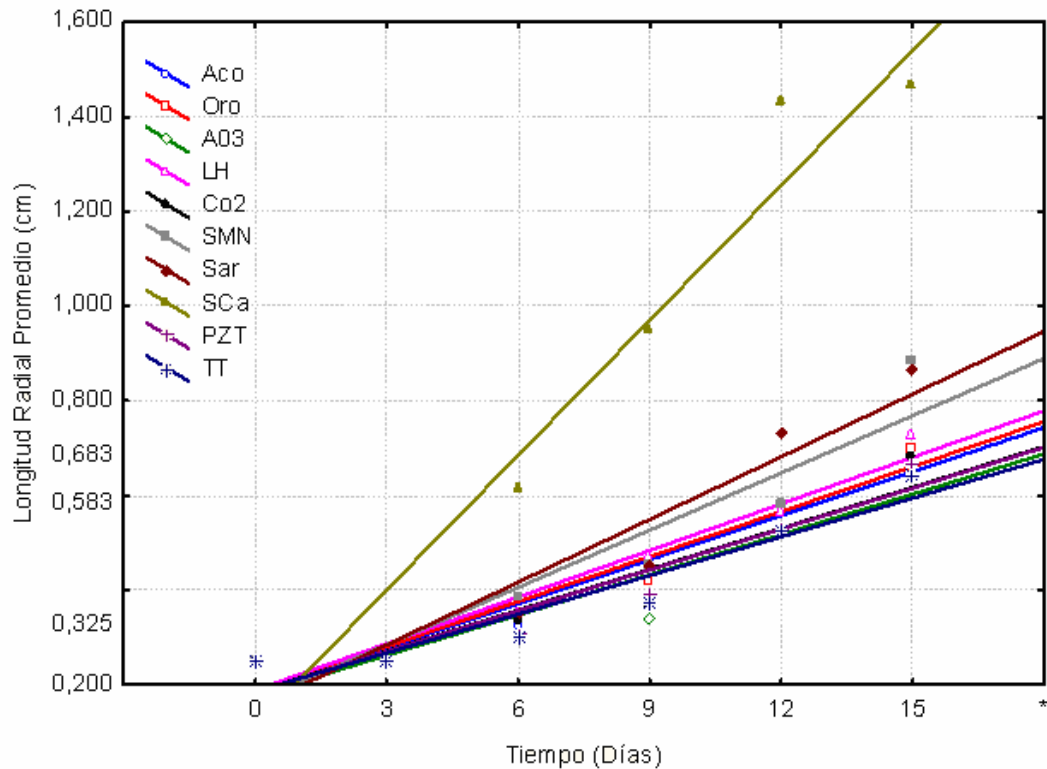


Fig. 14 Crecimiento radial promedio de las diferentes muestras. Líneas de mejor ajuste. Statistica 7.0.

3.3.3 Evaluación de la resistencia a la luz Ultravioleta

Se observó una disminución notoria en el porcentaje de germinación en la mayoría de las esporas para los diferentes tratamientos. Se observó alteración en el número de esporas germinadas en los tratamientos de 10, 20 y 30 minutos, siendo la excepción el tratamiento número 1, la cual tuvo un 100% de germinación para las diferentes repeticiones.

Adicionalmente, el tratamiento control de la germinación, luego de aproximadamente más de dos horas de las esporas en suspensión, no denotó ninguna diferencia respecto al tratamiento #1. Esto debido a que no se observó ninguna espora no germinada en cualquiera de los aislamientos.

Como se puede observar en la Figura 15, los aislamientos Aco, Sar y SCa, mostraron un porcentaje de germinación del 100% aún a los 30 minutos de exposición. Las muestras Co2, TT y LH, en orden descendente, mostraron también un alto grado de germinación (mayor al 80 por ciento) a los 30 minutos, siendo afectadas las últimas dos a los 20 minutos (en un 3 y 11 por ciento, respectivamente).

Las muestras de Oro, PZT, seguido por SMN y A03, son las de menor número de esporas germinadas. Los aislamientos de Oro y PZT, mostraron cierta tolerancia a la irradiación antes de los 10 minutos de exposición, sin embargo, más del 50% de las esporas no germinaron luego de los 20 minutos de tratamiento.

Por su parte, los aislamientos SMN y A03, prácticamente no germinaron luego de la exposición a la luz ultravioleta. El aislamiento SMN no presentó una caída pronunciada en su número de esporas germinadas luego de los 20 minutos, como sucedió en las demás muestras, disminuyendo solamente en un 4% respecto a la medición del cuarto tratamiento. De forma similar, el aislamiento LH también disminuyó poco su germinación (7%) en los tratamientos 3 y 4.

El análisis estadístico evidenció que existe diferencias significativas entre los tratamientos ($F=4,088$, $df=9$, $P=0,002$), específicamente A03 se diferencia estadísticamente de Sar, SCa, Aco, Co2 y TT ($P<0,05$; Tukey).

En la Figura 15, se resumen los porcentajes de germinación promedio para las diferentes muestras según el tiempo de exposición.

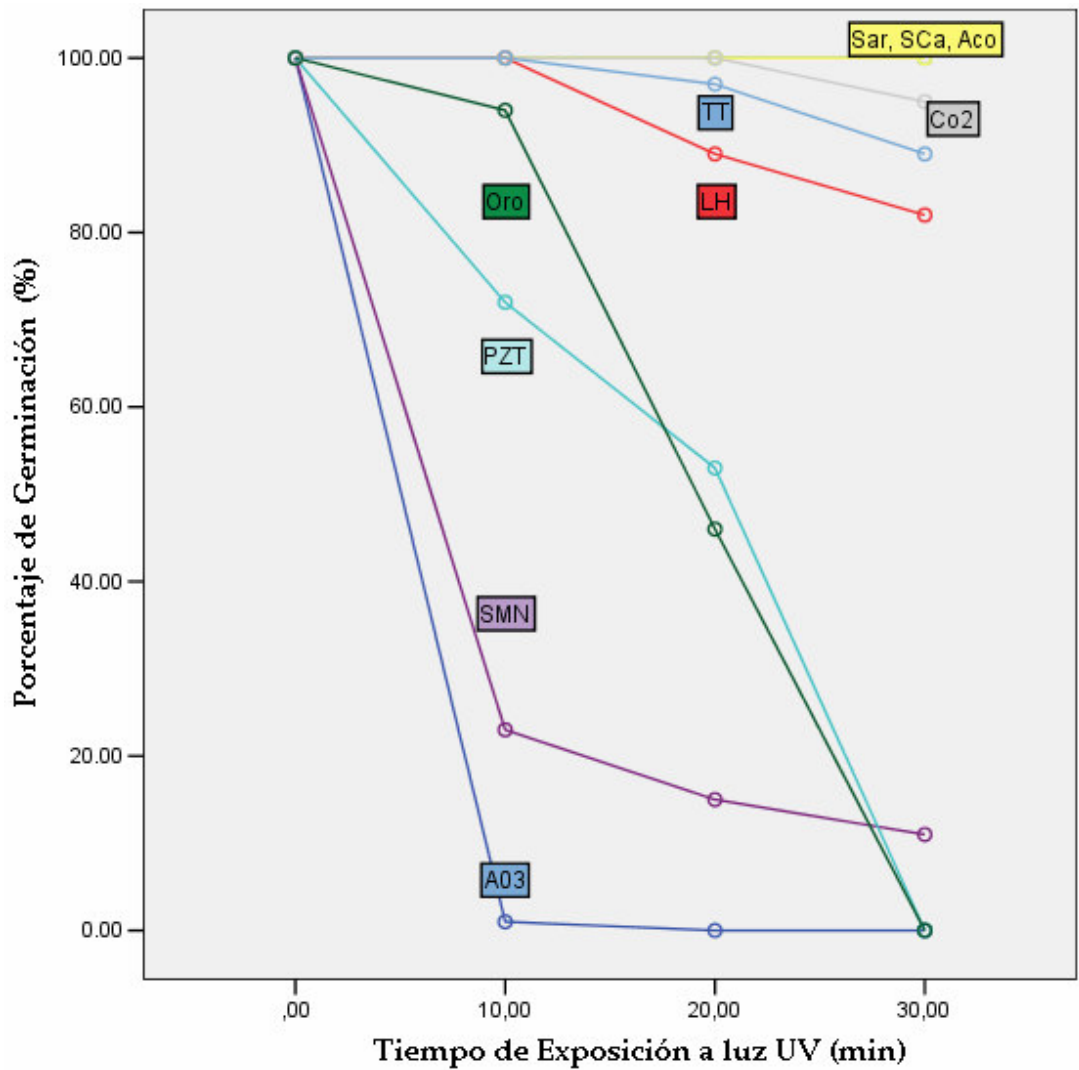


Fig. 15 Porcentaje promedio de germinación para las muestras tratadas con luz UV
SPSS 13.0

3.3.4 Evaluación de la agresividad ante la broca

En esta evaluación, el grado de patogenicidad ante la broca pudo ser observada en condiciones de laboratorio. Según las observaciones, la totalidad de los insectos no sobrevivieron más de los 6 días de evaluación, incluyendo el control (Figura 16).

El número además de brocas vivas se vio afectado inclusive horas más tarde de haber cerrado las placas de Petri, variando en la cantidad de insectos visiblemente activos.

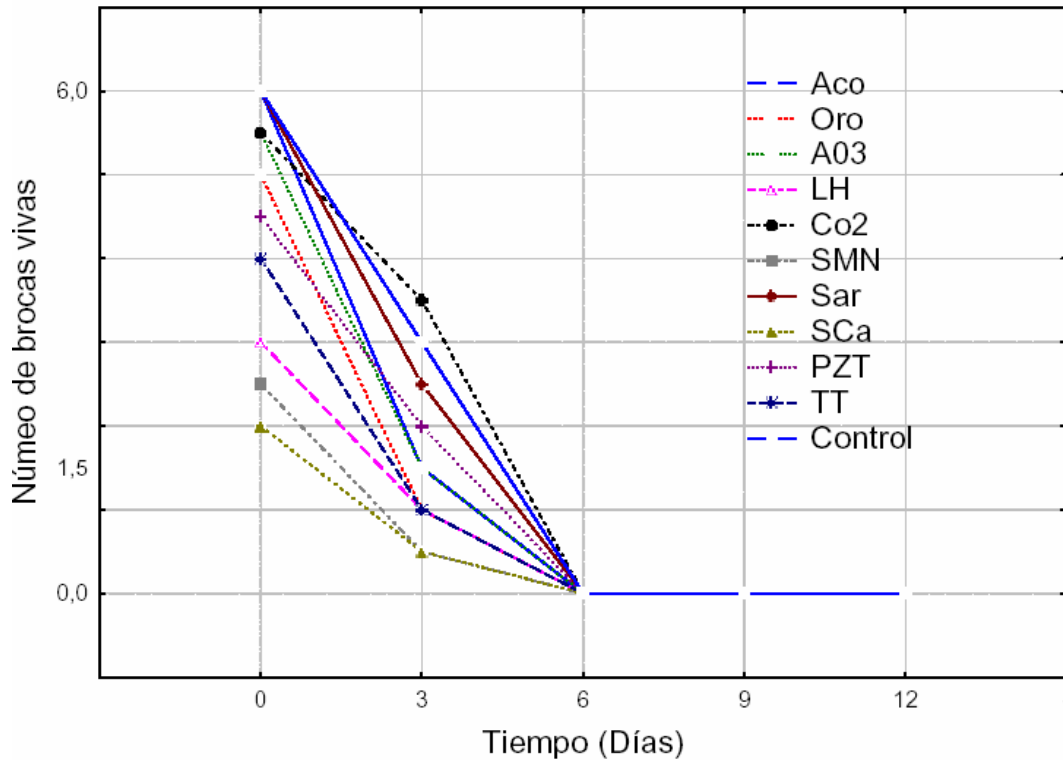


Fig. 16 Sobrevivencia promedio de las brocas luego de la exposición a una solución de Bb para cada muestra aislada. Statistica 7.0

El análisis estadístico no pudo comprobar la existencia de diferencias significativas entre el número de brocas muertas para cada aislamiento y el control ($F=0,996$, $df=10$, $P=0,499$), pero estadísticamente, la mortalidad se comportó según una distribución normal ($X^2=1,200$, $df=9$, $P=991$).

Por su parte, se observó la esporulación post-mortem de los insectos para las diferentes muestras, sobresaliendo de las zonas más articuladas del insecto, especialmente el dorso y las patas (Figura 17). Además se observó la cavidad intestinal vacía, solo quedando el exoesqueleto intacto.

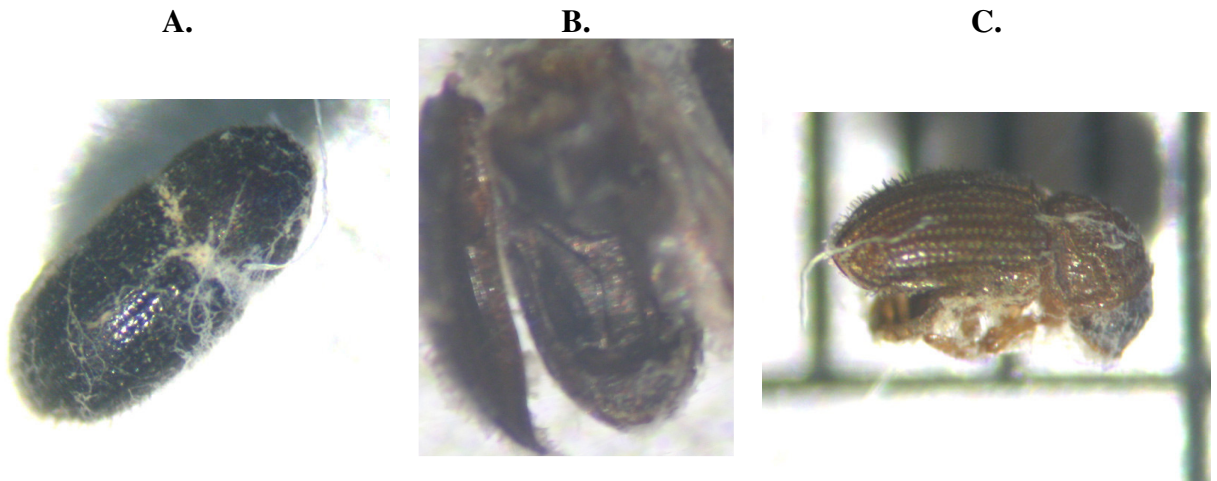


Fig. 17 Esporulación en las brocas (3X). A. Micelio saliente del dorso. B. Cavidad intestinal vacía pero exoesqueleto intacto. C. Vista lateral de broca esporulada de 1,7 mm.

Se observaron diferencias en cuanto al nivel y tipo de esporulación, siendo la textura algodonosa en los aislamientos: Sar, SCa, y PZT; algo homogénea y dura en: TT, LH, Oro y Co2; en las demás fueron esporulaciones reducidas con poca expansión (Figura 18).

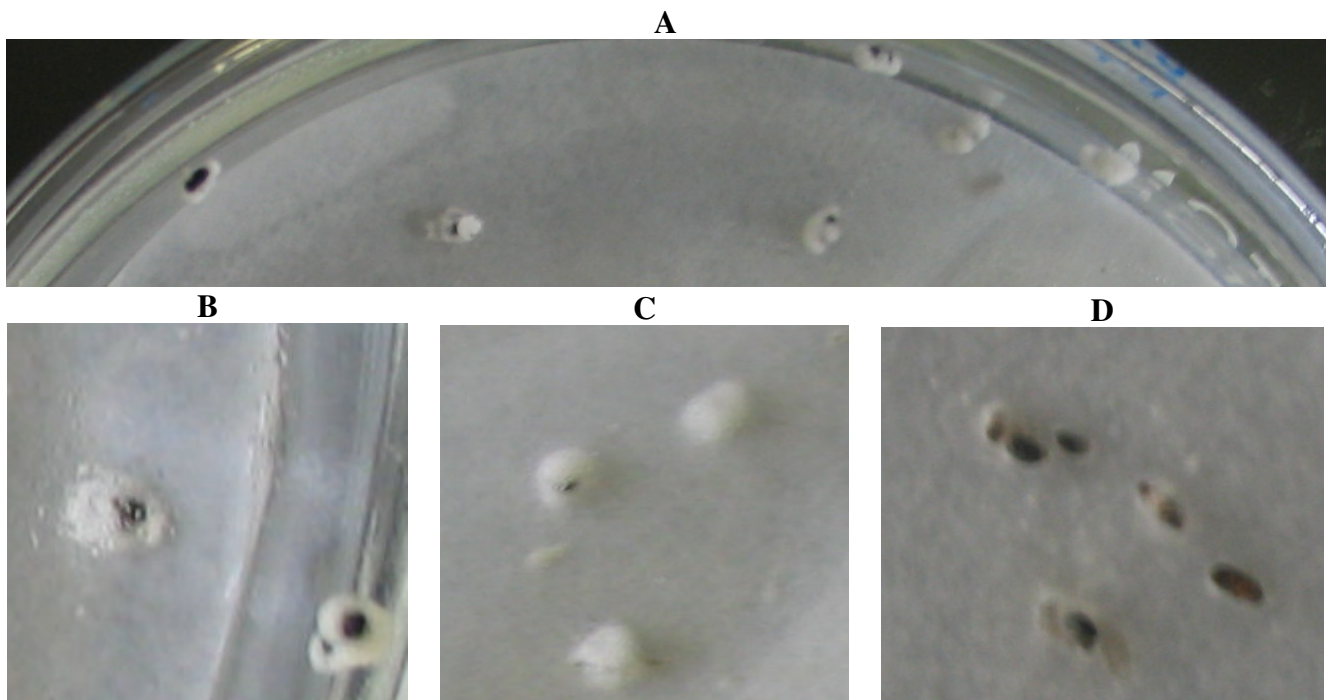


Fig. 18 Textura y nivel de esporulación de las brocas expuestas a los diferentes aislamientos de Bb. A. Vista de sección de placa luego de 12 días de evaluación. Esporulación con textura: Dura (B), Algodonosa (C) y Reducida (D) (Fotografías tomadas el mismo día pero en placas diferentes).

Además de lo anterior, se observó una mayor esporulación y ataque de las muestras: Sar, Co2, LH, en orden descendente, que alcanzaron el 100% inclusive antes de los 12 días (Figura 19). En orden descendente de esporulación total alcanzado, seguiría PZT (80%), que alcanzó la esporulación en 16 insectos, TT (67,5%), SCa (60%), A03 (55%), SMN (52,5%), Aco (47,5%) y Oro (12,5%).

Se pudo observar además un inicio de la esporulación inclusive a los dos días de iniciada el ensayo en los aislamientos que alcanzaron un nivel de esporulación superior al 60%, pero sólo en aquellos insectos que no sobrevivieron ni un día.

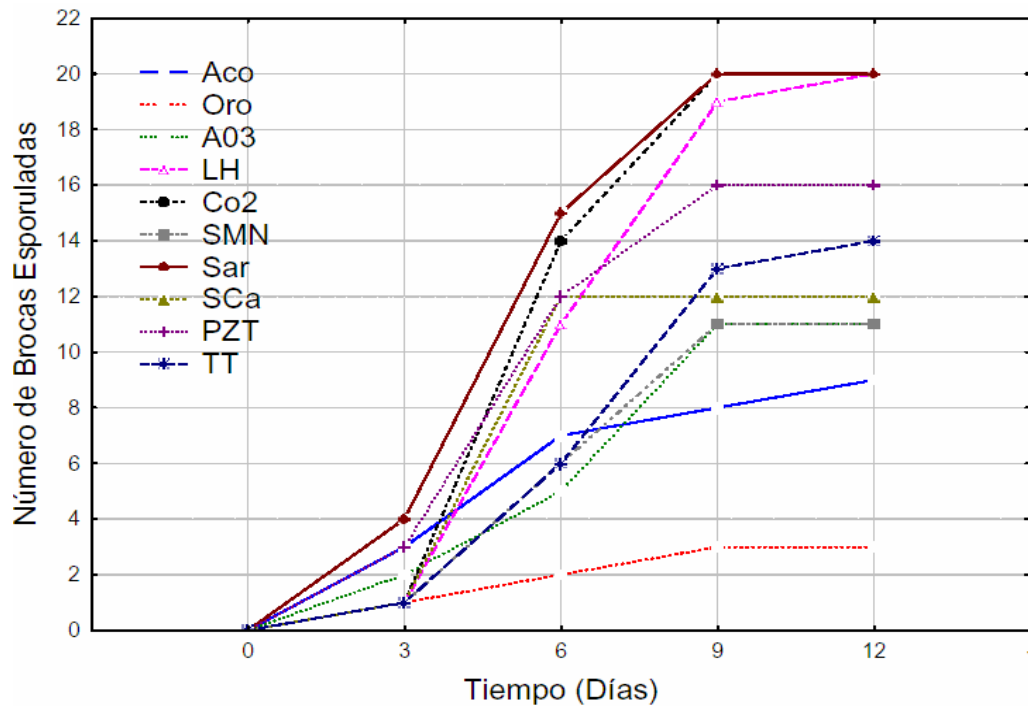


Fig. 19 Número de brocas esporuladas promedio luego de la exposición a una solución de Bb. Statistica 7.0

Estadísticamente la esporulación en los insectos se diferenciaron entre sí con respecto a las cepas Co2, Sar, LH ($P=0,99$) y PZT ($P=0,91$). Al comparar con el control, todas las cepas mostraron diferencias significativas, puesto no hubo ningún tipo de crecimiento fungoso ($t=7,308$, $df=54$, $P=0,000$). El análisis de correlación mostró que no pudo existir relación entre la esporulación y la mortalidad de las brocas, con un coeficiente de correlación de Pearson de $-0,134$ ($P=0,330$).

A continuación, en la Tabla 5 se resumen los principales datos obtenidos a partir de las evaluaciones de las muestras y la escala de valor otorgado* para cada parámetro.

Tabla 5. Resumen de las diferentes evaluaciones biológicas y su escala de valor otorgado para cada cepa

Aislamiento	Grado de Esporulación	Crecimiento Radial	Resistencia a la Luz UV	Agresividad
A03	4 ^a	2	1	3
Oro	1	3	1	1
Aco	4 ^a	3	5	2
TT	1	1	4	4
Co2	3 ^a	3	4	5
Sar	5 ^a	4	5	5
SMN	4 ^a	4	2	3
PZT	1	2	1	4
SCa	4 ^a	5	5	3
LH	5 ^a	4	3	5

* La escala de valor otorgada esté basada en un número del 1 al 5, siendo el 5 para un nivel alto y el 1 deficiente o bajo para cada parámetro evaluado

^a Para un 99% de confianza, existe diferencia significativa para el grado de esporulación ante Oro, TT, PZT.

3.4 Caracterización Molecular

3.4.1 Extracción del ADN

Los diferentes protocolos de extracción, fueron comparados y modificados. En la Tabla 6 y Figura 20, se resumen los principales datos obtenidos para cada uno de los protocolos modificados.

Tabla 6 Comparación de los principales resultados obtenidos para los diferentes protocolos de extracción evaluados

Protocolo	Vélez y colaboradores (2000)	Zambrano y colaboradores (2002)	Wizard (Promega, 2005)
Duración mínima aproximada (horas)	3:20	5	2
Cantidad de muestra (mg)	20-150	100-130	20-50
Apariencia del botón	Blanco, grande	Blanco, grande	Blanco, pequeño
Visualización en electroforesis*	No hubo	Concentrado, intenso	Barrido, muy intenso

* Consultar Figura 20 C

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR

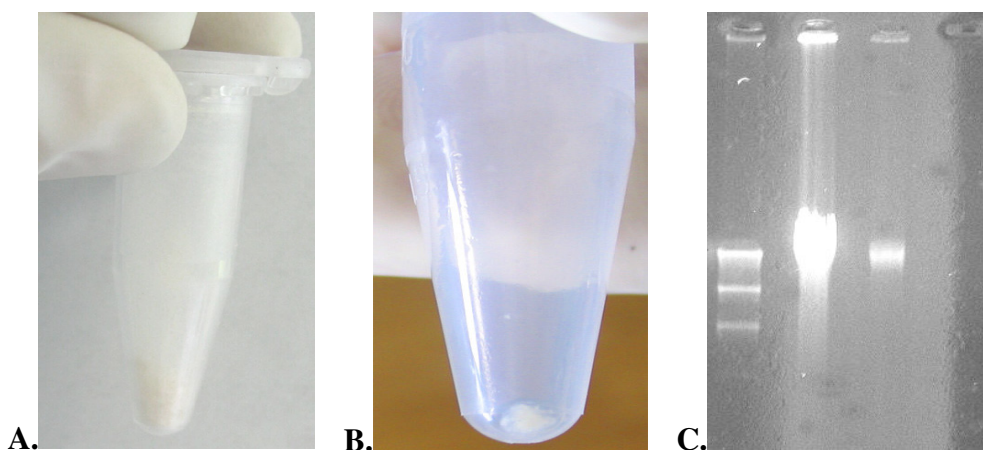


Fig. 20 Pasos y resultados obtenidos para la extracción de ADN. A. Cantidad raspada de placa (≈ 50 mg). B. Botón obtenido en protocolo Wizard modificado (Promega, 2005). C. Revelado de electroforesis comparando las tres extracciones obtenidas con los diferentes protocolos. El primer carril corresponde al marcador Lambda HindIII, seguido por: extracción con protocolo de Wizard (Promega, 2005), Zambrano y colaboradores (2002), y Vélez y colaboradores (2000) Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR.

Los mejores resultados obtenidos fueron aquellos que emplearon el protocolo modificado Wizard (Promega, 2005), por ello se realizaron modificaciones para obtener resultados óptimos, que incluían: disminuir la cantidad de muestra fresca a emplearse; realizar todo el proceso a baja temperatura; disminuir los volúmenes a tomar de las soluciones y concentraciones del buffer de extracción; y variar los tiempos de reposo e incubación. El revelado de la electroforesis para cada muestra extraída de ADN con este protocolo modificado se puede observar en la Figura 21. Adicionalmente, al comparar con el marcador de masa (MassRuler™ DNA Mix, #SM0403), se pudo cuantificar la cantidad de ADN extraída para cada muestra, comparando las intensidades de las bandas de las muestras con los patrones de banda del marcador. No se observó contaminación por ARN en ninguna de las muestras.

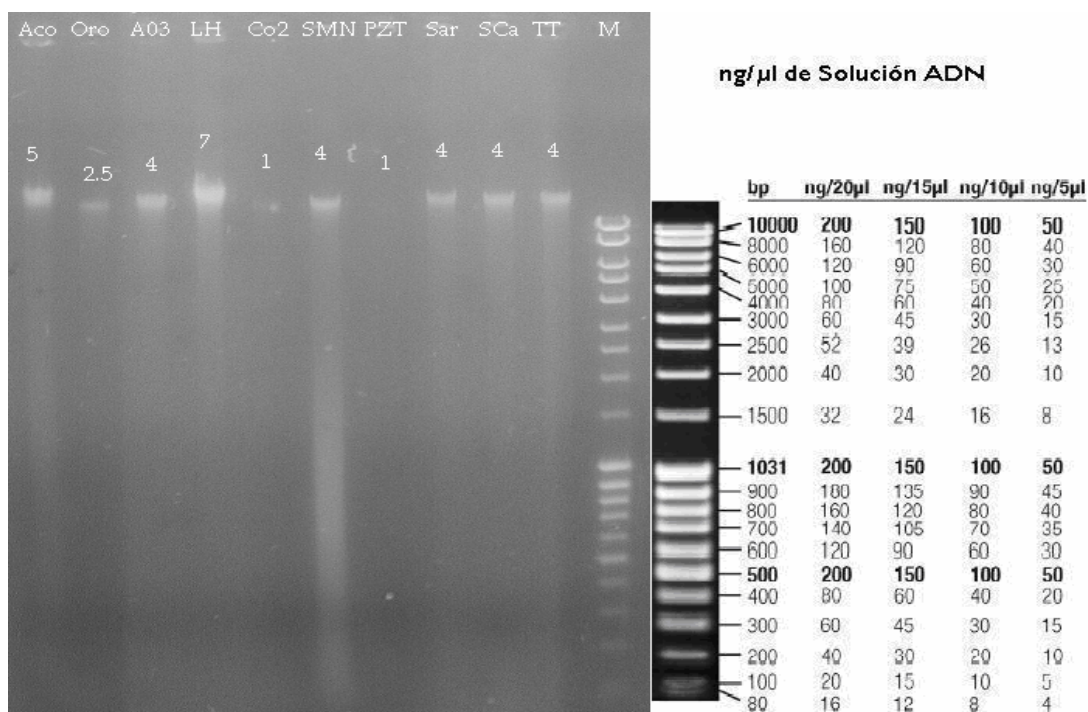


Fig. 21 Comparación del revelado de corrida de electroforesis para las diferentes extracciones de ADN de las muestras. Derecha: ilustración tomada de Fermentas (a) 2005. Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR.

Cada muestra se evaluó espectrofotométricamente para determinar la concentración de ADN (calculada por este otro método), y evaluar el grado de contaminación (Tabla 7).

Los datos de absorbancia en la evaluación por espectrofotometría revelaron que existe poca contaminación por fenol o proteínas en la mayoría de las extracciones, exceptuando A03 y SMN que son bastante puras, y Sar y PZT que parecen tener poca contaminación de ARN.

Tabla 7 Valor de absorbancia obtenido para evaluar la pureza y calidad del ADN extraído.

	Aislamiento									
	Aco	Oro	A03	LH	Co2	SMN	Sar	SCa	PZT	TT
Abs 260 nm	0,406	0,180	0,294	0,128	0,386	0,115	0,105	0,352	0,040	0,215
Abs 280 nm	0,294	0,127	0,164	0,112	0,292	0,066	0,054	0,260	0,021	0,132
Relación 260/280	1,381	1,417	1,793	1,142	1,322	1,742	1,944	1,354	1,905	1,629
Conc. ADN calculada (ng/μl)	4060	1800	2940	1280	3860	1150	1050	3520	400	1320

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR.

3.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y electroforesis

Las pruebas de PCR con los imprimadores RAPD's, mostraron únicamente bandas poco claras empleando los iniciadores OPE-01 y OPE-03. Por su parte, los iniciadores para microsatélites mostraron diferentes patrones de bandas, como se puede observar en la Figura 22. Ningún aislamiento presentó más de dos bandas que se consideraran dentro del límite aceptado, para cada pareja de iniciador evaluada.

Para la primera pareja evaluada, no fue posible obtener un patrón de bandas en las diferentes repeticiones.

A partir de la segunda pareja fue observable diferentes patrones de bandas. Con la pareja número 2, bajo el protocolo preestablecido, pudo ser posible observar dos bandas polimórficas menores de 200 bp en Co2 y SMN, y en A03 y LH.

Pareja	Aislamiento										M
	Aco	Oro	AO3	LH	Co2	SMN	Sar	SCa	PZT	TT	
1											— 1500
											— 850
											— 400
											— 200
											— 50
2			—	—	—	—					— 1500
											— 850
											— 400
											— 200
											— 50
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— 1500
											— 850
											— 400
											— 200
											— 50
4	—	—	==	==	==	—	—	—	—	—	— 1500
											— 850
											— 400
											— 200
											— 50
5	—	—	—	—	—	—	—	—	==	==	— 1500
											— 850
											— 400
											— 200
											— 50
6	—	—	—	—	—	—	—				— 1500
											— 850
											— 400
											— 200
											— 50
7	—	—	—	—	—	—	—		==	==	— 1500
											— 850
											— 400
											— 200
											— 50
8	—	—	—	—			—	==	—	==	— 1500
											— 850
											— 400
											— 200
											— 50

Fig. 22 Diagrama del patrón de bandas reveladas para la evaluación con microsátélites. Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR.

El revelado de la electroforesis para el PCR empleando la tercer pareja, permitió observar cinco bandas diferentes, algunas compartidas por más de tres aislamientos. Se obseraron en orden descendente bandas en Co2; LH; A03, SMN y Sar; Aco y Oro; y SMN, Sar, SCa, PZT y TT.

La pareja número cuatro desplegó gran número de bandas; sin embargo, muchas de ellas se encontraron por encima de los 300 pb, en los posos con aislamientos de Oro, A03, LH, Co2, SMN y SCa. En cuanto a las bandas por debajo de los 200 pb, se lograron observar tres en A03, LH y Co2, una en LH, otras tres en Aco, Co2 y SMN, y seis en Oro, A03, Sar, SCa, PZT y TT.

La quinta pareja de iniciadores, produjo la amplificación de nueve tamaños diferentes de fragmentos, siendo en donde, el mayor número de bandas fueron observadas entre los 200 y 50 pb de todas las parejas. Adicionalmente, la mayoría de las bandas fueron características de un solo aislamiento. Las bandas más grandes fueron de TT; Aco; LH y PZT; Oro; y A03. Seguidamente se observaron bandas de aproximadamente 100 pb en TT; PZT; SCa; SMN y Sar, y una muy abajo en Co2.

El gel de electroforesis para la sexta pareja, reveló cinco tamaños de fragmentos de alto peso, por encima de las 200 pb: Oro; LH; SMN y Sar; Aco y A03; y Co2.

Cinco bandas diferentes fueron observadas con la pareja número siete. Los aislamientos PZT y TT compartieron una banda. Otra banda fue observada para A03, mientras que para Aco, SMN, Sar, PZT y TT compartieron otra banda de menor tamaño. Los aislamientos Oro y LH compartieron otra banda más pequeña. El aislamiento Co2 mostró una banda de 200 pb aproximadamente.

La última pareja de microsatélites evaluada, presentó cinco bandas de tamaño diferentes, según los aislamientos TT; Aco y Oro; SCa, PZT y nuevamente TT; A03; y LH, SCa y Sar.

Con excepción de la primera pareja de iniciadores, se obtuvo diferentes patrones de bandas, de variable intensidad pero de alta reproducibilidad. En la Tabla 8, se desglosan los rangos y números de bandas observadas para cada una de las parejas.

Tabla 8 Rango y número de fragmentos obtenidos con microsatélites

Pareja	Número de Fragmentos	Rango aproximado del tamaño de los fragmentos (pb)
1	0	-
2	2	200-50
3	5	400-50
4	4	200-50
5	9	200-50
6	5	400-200
7	5	400-150
8	5	400-150

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR.

Como se pudo observar en la Tabla anterior, existió un alto rango de fragmentos y polimorfismos, variando entre los diferentes aislamientos.

3.2.3 Tipificación

Con base en los patrones de las bandas, se realizó una matriz en código binario, dentro de una tabla en el programa SPSS 13.0 y se realizó una gráfica según la metodología descrita en Materiales y Métodos (2.5.4).

Las diferecias reveladas en el dendrograma, permitieron diferenciar las cepas, y clasificarlas dentro de subgrupos, los cuales presentan algún tipo de similitud para los diferentes imprimadores para microsatélites empleados.

En la Figura 23 se puede observar el grado de similitud entre los diferentes aislamientos. Se puede observar que las muestras se dividen en 6 subgrupos: un grupo conformado por SMN y Sar que son los más relacionados, con un coeficiente de similitud de 0,667. Seguidamente un grupo formado por TT y PZT, con un coeficiente de similitud de 0,500. Estos dos subgrupos pequeños están relacionados, debido a que SCa comparte un 0,375 con PZT, y un 0,273 con SMN.

Otro grupo lo conforma Oro y A03, que comparten un 0,250. Por su parte, Aco presenta un coeficiente de 0,182 con Oro, y por tanto se encuentran formando en conjunto, un grupo más grande.

De manera aislada, Co2 y LH comparten con Aco un 0,167 y un 0,154, respectivamente, por lo que se clasifican fuera de cualquier subgrupo. Ambos al parecer, no presentan similitudes con ningún subgrupo.

Según lo descrito anteriormente, al parecer existen similitudes genéticas entre algunos aislamientos, por lo que habría que analizar más a fondo las relaciones que tienen estos grupos, respecto a las características biológicas determinadas anteriormente.

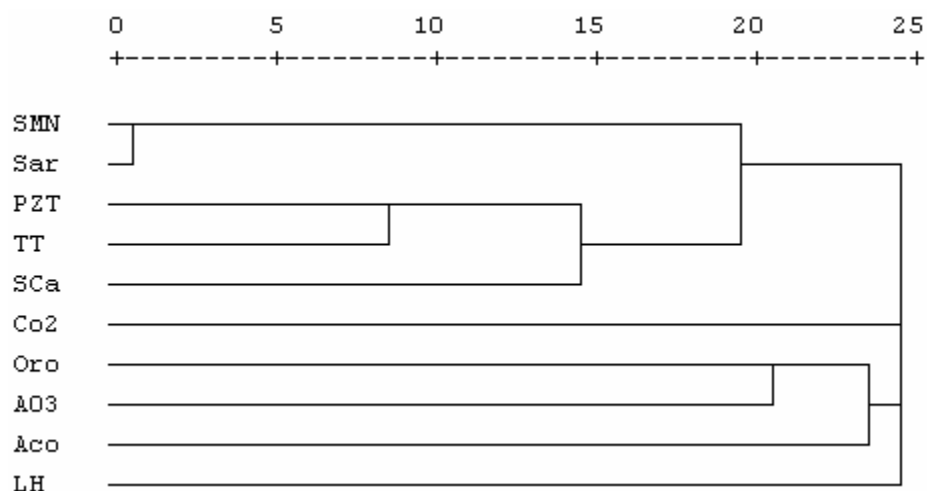


Fig. 23 Dendrograma basado en los marcadores de microsatélites en la caracterización molecular de los aislamientos de *Beauveria bassiana*. SPSS 13.0. Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR.

4. DISCUSION

Las diferentes evaluaciones, tanto moleculares como biológicas, permitieron observar un comportamiento natural muy disperso e interesante, característicos para cada aislamiento. Se pudo notar el alto grado de respuesta ante la irradiación ultravioleta, con algunos aislamientos capaces de resistir hasta 30 minutos de exposición directa. También se pudo evaluar el grado de colonización de la broca por parte de las cepas, indicando que existen factores posiblemente enzimáticos que favorezcan su rapidez y efectividad.

Adicionalmente, los parámetros biológicos sobre el crecimiento micelial y producción de esporas, han contribuido a predecir el nivel de desarrollo y persistencia en el ambiente una vez realizadas las aspersiones de los conidios, debido a que no todas las cepas respondieron de una misma forma. Algunas cepas mostraron un alto grado de esporulación, con lo cual se espera una mayor colonización y distribución en las plantaciones.

Por ello, a través del uso de herramientas de investigación en el área de la fitopatología y biología molecular, ha sido posible diferenciar los respectivos aislamientos y caracterizar su comportamiento biológico, información útil que permitirá comprender con mayor detalle su mecanismo de acción, y aprovechar de una mejor manera su potencial biológico.

A continuación se comentarán los resultados obtenidos en el presente trabajo, y se analizarán con base en su importancia práctica.

4.1 Grado de esporulación

Como se había aclarado anteriormente, cada muestra pertenece a un aislamiento de una zona geográfica distinta, con temperatura, humedad, intensidad lumínica, altura, entre otras condiciones ambientales específicas. Es en este sentido, que la diversidad debida al distanciamiento geográfico, puede representar una barrera natural en el surgimiento de cambios aleatorios que permitan a cada microorganismo, tener una mejor respuesta a su

medio. Sin embargo, se requieren de mayores estudios para comprender las razones por las cuales se originan estas diferencias.

La producción de esporas es en sí el medio por el cual se dispersa el hongo, y coloniza mayores zonas e insectos, por tanto una mayor producción de esporas es en el caso de emplearse como controlador biológico, una característica deseable, ya que la dispersión, transporte y permanencia en campo, serían conseguidos sin necesidad de mucho tiempo y esfuerzo.

Las muestras analizadas, mostraron diferencias significativas en cuanto a la producción de esporas, separándose principalmente en dos grupos: elevada esporulación (mayor de $2,08 \times 10^6$ esporas/ml) las cuales fueron de mayor a menor Sar, LH, A03, SMN, SCa, Aco, y Co2; y las de baja esporulación (menor de 0,8), a saber TT, Oro y PZT. Estas diferencias analizadas desde el punto de vista geográfico, pueden evidenciar que la temperatura, la humedad y la altura, pueden ser factores determinantes en la producción de esporas. Sin embargo, Vélez y colaboradores (2000), indican que la producción de esporas a nivel de laboratorio, depende más de la edad del cultivo y el sustrato de crecimiento, por ende, está sujeto a variables no estimadas en este estudio. Esto justifica el hecho de que debido posiblemente a interacciones tanto nutritivas, como de intercambios gaseosos y propios de su estado de desarrollo, el hongo en este estudio fluctuó en su número de producción de conidios.

La coloración de las colonias también conformaron una forma de determinar los aislamientos con mayor producción de esporas, puesto los colores pardos o grises en los medios de 15-22 días con LH, Sar, Co2, SMN, A03 y Aco, revelaron mayor producción de esporas que los blancuzcos de PZT, TT y Oro. En parte esto se debe a que el ciclo de vida en forma saprofita (micelial), cambia a patogénica cuando existe carencia de nutrientes (Duperchy, 2003). Aunque existe suficiente cantidad de alimento en las placas, conforme crece en forma concéntrica, en el centro del círculo se iniciará el agotamiento de los nutrientes y se da inicio la esporulación más acentuada.

4.2 Crecimiento radial

La Tasa Diaria de Crecimiento Radial (TDCR) para las diferentes muestras, estadísticamente reveló diferencias significativas, probablemente porque la temperatura a la cual fueron cultivadas (25°C), puede no ser la más adecuada para el crecimiento de todos los aislamientos. Sin embargo, dos cepas (Sar y SMN) y una cepa en especial (SCa) mostraron un crecimiento sobresaliente, debido al crecimiento micelial acelerado.

En cuanto a su medio de cultivo, la evaluación realizada no evidencia una inhibición del crecimiento, puesto que para notarlo, se hubiese necesitado cultivar bajo otras condiciones; sin embargo, debido a los diferentes ambientes en los cuales los aislamientos provienen, no puede evitarse que se favorezcan a unos aislamiento y a otros no. Estudios de termotolerancia realizados por McGuire y colaboradores (2005), revelaron que en diferentes muestras recolectadas en diferentes países, el mejor crecimiento se produce a los 28°C, teniendo una TDCR máxima de 2,09 mm/día, y una mínima de 0,91. Este rango de crecimiento concuerda con las obtenidas en este estudio, donde se obtuvo un máximo de 2,43 (SCa), y un mínimo de 0,78 (TT) mm/día; con lo cual se puede sustentar el hecho que existe potencial en nuestro país con miras en la persistencia y dispersión más efectiva dentro de los campo cafeteros.

Es importante considerar que el crecimiento en todas las cepas inició a partir del tercer día de incubado, lo cual revela que es posible que el bactericida (bacteriostático) adicionado haya ejercido una presión de adaptación que frenase el crecimiento inicial del hongo. Si bien es cierto esta etapa fue superada, pudo inhibir el crecimiento del hongo mientras adaptaba su metabolismo. Esto se debe a que es posible que la oxitetraciclina, inhiba el crecimiento de algunos hongos, como es el caso de *Phytophthora* sp (Inge, 1993).

4.3 Tolerancia a la luz Ultravioleta

La resistencia a la luz ultravioleta es un parámetro interesante de tomar en cuenta. Esto debido a que en campo, los hongos están expuestos a radiaciones solares durante más de 12

horas por día (Tobar *et al.*, 1999). Estas radiaciones pueden afectar directa o indirectamente el ADN, debido a que los ácidos nucleicos absorben la luz cuya longitud de onda se encuentra entre 210 y 400nm (Cagán & Svercel 2001; Tobar *et al.*, 1999). Directamente se puede ver afectado mediante deleciones, uniones cruzadas (dímeros de timina), o ruptura de bandas; lo cual provocaría daños irreparables pero heredables, lo cual a mediano y largo plazo podrían generar pérdidas de su capacidad y por tanto su utilidad. Indirectamente pueden inducirse a cambios en la producción de metabolitos encargados de la absorción de nutrientes y función entomopatógena, como es el caso de enzimas proteolíticas, lipolíticas y quitinasas, además de afectar su nutrición en general (Cagán & Svercel, 2001; Devotto & Gerding, 2003). Estas alteraciones posiblemente sean ocasionadas no tanto por el momento mismo de la exposición a la radiación, sino en el momento de reparación del ADN (Tobar *et al.*, 1999).

Las alteraciones a nivel genético luego de la irradiación, pueden influir en el comportamiento biológico del organismo. Muestras irradiadas de *Bb*, han demostrado tener un menor crecimiento radial con exposiciones entre 30-60 minutos, pero un mayor crecimiento y producción de esporas luego de 1.5 horas; mayores dosis al parecer reducen o detienen la actividad (Cagán & Svercel, 2001; Tobar *et al.*, 1999). La sobrevivencia de las conidias, parece disminuir conforme aumentan las dosis de luz ultravioleta.

La importancia por ende de evaluar este parámetro, no es solo comparativo y discriminatorio, sino de importancia ecológica y económica. En el caso de la viabilidad de los conidios por ejemplo, si las esporas no son resistentes, su persistencia en el campo podría decaer, disminuyendo su eficiencia, aumentando costos debidos al aumento en el número de aplicaciones necesarias para combatir las plagas, especialmente aquellas de largo periodo de emergencia (Devotto & Gerding, 2003). Por ello, pequeñas pruebas en laboratorio conforman una guía predecible a nivel de campo.

Los resultados obtenidos en este estudio para la resistencia a la luz ultravioleta, muestran datos diversos, que en términos generales, manifiesta que pueden existir aislamientos resistentes a la luz ultravioleta.

Como se mencionó anteriormente, los aislamientos Aco, Sar y SCa, mostraron un porcentaje de germinación del 100% aún a los 30 minutos de exposición. Seguidamente los aislamientos Co2, TT y LH tuvieron cierta resistencia, sin embargo, fueron susceptibles en tiempos cortos, lo cual refleja cierta sensibilidad ante la radiación.

Cagán y Svercel (2001) mencionan que la pigmentación de las esporas, puede influir en la tolerancia a la luz ultravioleta. Estos autores encontraron que conidias pigmentadas con colores negros, fueron menos susceptibles a la estimulación de la luz solar, y que esta es una característica fenotípica deseable para procesos de producción de micopesticidas. Aunque esto se contradice con la teoría de que las esporas no son pigmentadas (Barron, 2001), pero que las vemos de colores blancos, no se observó en ningún momento esporas de otra tonalidad.

En cuanto a la influencia de la luz ultravioleta en la patogenicidad ante *H. hampei*, parece no estar correlacionados. Sin embargo, estudios reportados por otros autores, demostraron que existe un aumento en la producción de toxinas como fosfatasa ácida, naftol-ASBI fosfohidrolasa y beta glucosidasa, luego de exposiciones a la irradiación (Tobar *et al.*, 1999, Cagán & Svercel, 2001).

4.3 Agresividad ante la broca

La respuesta de los aislamientos ante la broca, sugieren la existencia de cepas muy agresivas, de rápida colonización y alta actividad invasiva. Un parámetro tomado en cuenta para este ensayo, fue contabilizar el número de brocas muertas con el pasar de los días. Sin embargo, debido a que no se pudo determinar si la muerte fue provocada por inanición o por el ataque del hongo, no se puede correlacionar lo uno con lo otro, y por tanto, se limita la discusión al tipo de colonia y número de brocas esporuladas luego del tratamiento. De igual forma tampoco se pudo calcular la Dosis Letal Media, para comparar la mortalidad ocasionada de acuerdo a una concentración de hongos determinada (Abbott, 1925).

Los resultados sugieren un tiempo límite donde la actividad del hongo es visible externamente, que es menor a 12 días (9 días en Sar y Co2). Después de este periodo ninguna alteración al resultado fue observada. Esto puede suceder debido a que las esporas colonizan su huésped internamente hasta después de muerto. Este proceso en el presente estudio se observó que es sumamente rápido. Podría ser que luego de los 12 días, las brocas colonizadas no aportan nutrientes al hongo, y por ello cesa la actividad patogénica.

Además de lo anterior, fue posible notar que en algunos aislamientos se produjeron las primeras esporulaciones antes de los tres días, con lo cual es posible asegurar que la colonización en éstas, tienen un tiempo muy corto de activación y un ataque masivo y efectivo, logrando adecuadamente la mortalidad de la totalidad de los insectos.

En cuanto a la relación entre la cantidad de esporas producidas (o inclusive la resistencia a la luz UV) sobre la patogenicidad, al parecer, no existe ninguna correlación, sugiriendo que la agresividad de cada aislamiento está determinada más por la actividad enzimática, que por la cantidad de esporas a las cuales el insecto fue expuesto (Valdés *et al.*, 1999).

Por su parte, la relación de la apariencia física de la esporulación sobre los insectos, y su influencia sobre el nivel de agresividad, no está clara, puesto la consistencia algodonosa de Sar, PZT y Sca, aunque coincide con una alta colonización reflejada por el alto grado de brocas esporuladas; también ocurre en LH, TT y Co2, de consistencia dura. A pesar de lo anterior, Oro de apariencia dura, presenta una reducida esporulación. Puede ser que Oro sea una excepción, y con ello se descarta que la apariencia algodonosa sea una característica deseable, puesto en ambas la esporulación fue alta, o bien, que la apariencia algodonosa indique una mayor agresividad, debido a la extensión de las hifas en búsqueda de más alimento. Aunque no está clara esta característica, es importante considerar el hecho que la alta esporulación luego de la momificación del insecto, podría facilitar la dispersión de mayor número de esporas, y con ello, aumentar la probabilidad de contacto con otros individuos huéspedes. Las diferencias estadísticas en las cepas Co2, Sar, LH y PZT, no pudo relacionarse con las diferencias en la apariencia de la esporulación, por tanto, solo se puede alegar que

presentan un mayor nivel de esporulación, pero que habría que comprobar si también ocasionan mayor mortalidad en las brocas, lo cual las haría deseables para el control de la plaga.

Adicionalmente, es importante considerar que las hembras son más susceptibles que los machos, según un estudio realizado por Tafoya y colaboradores (2004), y que en esta investigación, no fueron preseleccionados los sexos, por tanto no se puede argumentar sobre esa variable.

4.5 Extracción del ADN

Las sucesivas modificaciones del procedimiento de extracción del ADN, al parecer permitieron equilibrar de buena forma la calidad y la cantidad necesaria para análisis de PCR.

En las primeras ocasiones se modificó las cantidades de material a utilizarse. Se procedió luego a utilizar vidrio molido para macerar, lo cual facilitó el rompimiento de las células. Se procuró siempre realizar el proceso de extracción en hielo, para que no se produjeran reacciones de degradación del ADN. Estas modificaciones de alguna forma se ven reflejadas favorablemente en los geles de electroforesis, los cuales mostraron bandas más densas y con menor degradación.

Los protocolos analizados variaron en los tipos de reactivos empleados. Zambrano *et al.*, (2002) y Vélez *et al.*, (2000) emplearon en el amortiguador de extracción el CTAB para proteger al ADN y degradar proteínas. El protocolo Wizard modificado por su parte, utilizó el SDS. Estos no son parámetros que se evaluaron como puntos de comparación, sin embargo, es importante mencionarlo para futuras investigaciones. Adicionalmente, el empleo de SDS, permite trabajar con volúmenes más pequeños, menor cantidad de material, menor toxicidad e interferencia en el PCR, y evita el uso de solventes orgánicos (Valadez & Kahl, 2000; Saghai-Marooif *et al.*, 1984).

En cuanto a la evaluación de la concentración y pureza del ADN, se puede decir que no pudo precisarse la concentración adecuada, debido a que por un lado, el método de valoración por electroforesis, brindó una manera sencilla y fácil de comparar y determinar la concentración de ADN, sin embargo, a pesar de lo anterior, es muy influenciado por la interpretación, debido a que la intensidad de las bandas a comparar, dependen en parte al punto de vista del observador. Por otro lado, la cuantificación por espectrofotometría, parece no haber brindado información real, debido a que tales concentraciones de ADN calculadas, están muy elevadas como para que durante las PCR's hubiese funcionado. Además, según Caetano y Gresshoff (1997), interferencias en el valor de la concentración de ADN, pueden deberse a cantidades 10 veces mayor de ARN. Como se demostró en los geles, ninguna banda se encontraba por debajo de la de ADN, descartando que esa posibilidad exista.

Empleando el protocolo de Wizard (Promega, 2005) y las soluciones respectivas, fue posible la obtención de mejor y mayor cantidad de ADN, siendo las sucesivas modificaciones en cantidades y proporciones, que habilitaron la amplificación en PCR, puesto que la concentración final de ADN al parecer fue adecuada para el PCR. El protocolo modificado demostró ser rápido, sencillo, con menores cantidades, volúmenes y agentes contaminantes, y suficientemente eficiente como para aplicarse en rutinas de laboratorio.

4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Tipificación

Debido a que las concentraciones de reactivos y protocolo de amplificación ya habían sido modificados y optimizados por McGuire y colaboradores (2005), se redujo un poco la carga y el tiempo de dedicación en este paso.

Las modificaciones principalmente se realizaron para obtener mejor resolución en los geles. El disminuir un grado centígrado la temperatura de hibridación, facilita que los iniciadores se apareen más específicamente, ya que como se puede observar en la Tabla 3, la mayoría presenta una temperatura óptima de hibridación de 53°C. El disminuir un grado la temperatura de alineación, permite que aún los cebadores con temperaturas mayores (55°C),

también puedan ser corridas bajo el mismo procedimiento, sin afectar la especificidad de las demás parejas. Esto se debe a que por ejemplo, en las parejas 3, 4 y 6, existe un par que requiere una mayor temperatura de hibridación. El disminuir la temperatura para hacer más específica un iniciador, permite que las bases nucleotídicas complementarias se enlacen con mayor facilidad al iniciador que con la cadena opuesta, debido a que las fuerzas de enlace químico tienden a favorecer la unión con una secuencia lineal pequeña, como lo es el caso del imprimador, que con la hebra complementaria de ADN que tiende a rotar sobre su eje; y se ve favorecida además por la disminución en la agitación molecular, debida a la desaceleración de las partículas al disminuir la temperatura. Contrariamente, la inestabilidad ocasionada por la alta temperatura, favorece la desnaturalización de las hebras, disminuyendo la probabilidad de hibridación con los iniciadores.

Se incluyó un ciclo más de hibridación seguidamente del primer ciclo de amplificación, debido a que de esta forma, se aumentaría el número de fragmentos sintetizados que entrarían en la segunda etapa de amplificación, y con ello, mayor probabilidad de alinearse con los iniciadores (Alberts *et al.*, 1996).

Cada reacción que se realizó, ocupó cierta cantidad de ADN molde. Las primeras reacciones no fueron fructíferas, debido a que al parecer, las muestras se encontraban muy concentradas. Aplicando diluciones 1:10, se resolvió el problema. La razón de ello es que tanto concentraciones altas como bajas de ADN, no son adecuados para el PCR. Si las concentraciones son muy bajas (dependiendo de la técnica), puede existir poca probabilidad de alineación con las secuencias iniciadoras complementarias, pero si son muy altas, las mismas bandas intentarán unirse frecuentemente, compitiendo con los cebadores (Valadez & Kahl, 2000).

Como se evidenció en las electroforesis, las parejas de iniciadores específicos de tipo STMS, lograron amplificar en la mayoría de las muestras, fragmentos bastante polimórficos, generando patrones de una o dos bandas por aislamiento en cada ciclo. La muestra del aislamiento TT, parece tener un comportamiento heterocigoto para las parejas de

microsatélites 5, 7 y 8; PZT para las parejas 5 y 7; 3 para SMN y Sar; 4 para LH y A03; y la pareja número 8 para SCa. Esta información codominante es también muy informativa acerca de sus relaciones de similitud, puesto en la mayoría de los casos, una de las dos bandas era compartida por otro aislamiento, y ello se ve reflejado en el dendrograma, donde por ejemplo SMN y Sar presentan un alto grado de similitud genética; similar con PZT y TT. Análisis de otro tipo como RAPD's o RFLP, probablemente no hubiesen permitido tal comparación, por no ser codominantes (Valadez & Kahl, 2000; Goldstein *et al.*, 2005).

Sin embargo, no todas las parejas de iniciadores amplificaron todas las muestras. Las parejas de iniciadores 1, 2, 6 y 7, presentaron casos de aislamientos que no amplificaron; en las demás parejas, amplificaron en todas las muestras. Probablemente esto se debe a errores de manipulación de las muestras de ADN y/o productos del PCR o la redistribución de los reactivos dentro de los recipientes, debido a que aunque la preparación de la Master Mix y trasvase a los tubos de PCR se realizaron a 4°C, el tiempo entre la preparación de una solución y otra pudo haber sido crucial.

En cuanto a la pareja número 4, esta presentó bandas fuera del tamaño esperado, por ello no se contemplaron en el análisis de similitud genética. Estas bandas parecen ser artefactos o alineaciones inespecíficas durante el PCR. De acuerdo con Lai y Sun (2003), estas alteraciones son esperables, y aumenta la probabilidad de encontrarlas casi linealmente con el número de unidades repetidas, y en el momento en que la probabilidad de contracción de las bandas es mayor que la probabilidad de expansión cuando el desprendimiento sucede.

Estas bandas observadas fuera del rango de estudio pueden ser también producto de errores de la enzima *Taq* polimerasa sobre el microsatélite (Valadez & Kahl, 2000). Se descarta una última explicación, la cual, sugiere que estas bandas son debidas a que estuviesen amplificando microsatélites dinucleótidos (AT o GC por ejemplo); sin embargo, esta pareja flanquea secuencias trinucleótidas.

El análisis de los aislamientos por medio de los microsatélites, permitió diferenciar todas las muestras de Bb, darles una identidad genética y agruparlas según sus similitudes genéticas. Las muestras por sus diferencias tanto biológicas como genéticas, podrían clasificarse como cepas de Bb. Los imprimadores empleados en total generaron 35 fragmentos diferentes para las 10 muestras analizadas, variando de tamaño de pares de bases entre 400 y 50. De los 35 alelos observados, el 51,43% son polimórficas. Para el reducido número de muestras, es un porcentaje alto, considerando que estudios con 82 muestras, generaron 44 amplicones (McGuire *et al.*, 2005).

La mayoría de las parejas se diferenciaron en cantidad de alelos y tamaño de los fragmentos de acuerdo con reportes en diferentes estudios, por lo que hace pensar que en nuestro país existe mucha diversidad y un gran potencial (McGuire *et al.*, 2005, Rehner & Buckley, 2003) (Tablas 3 y 8). A pesar de ello, la pareja número 6 fue con la que se obtuvo fragmentos más grandes, igual a lo reportado por McGuire y colaboradores (2005), y la pareja número 5 ha sido en el presente y los anteriores estudios mencionados, el que ha proporcionado los fragmentos más estrechos en cuanto a su tamaño.

La pareja anteriormente mencionada, logró obtener 9 alelos, y fue la que mayor cantidad de alelos produjo de todas las demás parejas. Esta además, reveló gran polimorfismo, siendo posible la diferenciación entre cada una de las cepas analizadas. Esto implica que podría ser posible que en los alelos encontrados, se halle gran variedad de, valga la redundancia, variaciones a nivel genético, determinantes para cada cepa costarricense. Estas pequeñas mutaciones de los alelos en los loci de los microsatélites, dan como resultado alelos con secuencias similares a los alelos de los cuales fueron derivados, y brindan a su vez, gran cantidad de información, para lo cual, se han diseñado algoritmos matemáticos especializados para evaluarlos (Golstain *et al.*, 1995).

El grado de similitud genética entre las cepas varió entre un 0,154 y 0,667, por lo que se puede decir que las cepas presentan algún nivel de parentesco, pero aún así gran diversidad. Las diferencias en las relaciones de similitud entre los grupos no es tan elevada, debido a que

el distanciamiento mostrado no es muy grande, sin embargo, hay que considerar el hecho de que el número de muestras es muy pequeño como para poder observar grandes rangos en las similitudes genéticas. Estos datos son de esperar, puesto otros estudios han muestreado un número mayor, proveniente de diferentes zonas geográficas y hospederos, con los cuales han obtenido un gran distanciamiento genético (McGuirre *et al.*, 2005).

En cuanto al análisis geográfico, la obtención de las muestras de Bb, en sí, favoreció la diferenciación genética. Esto debido a que las muestras fueron colectadas de granos con broca, restringiendo el hospedero del hongo. Además fueron obtenidas de zonas geográficas diferentes, por tanto, existía ya una barrera natural.

Estudios de diversidad genética han concluido que las mayores diferencias genéticas, no se producen a nivel de hospedero, sino más bien, a nivel geográfico (Wang *et al.*, 2003). De la mano con el dendrograma, puede observarse que existen diferencias significativas entre los aislamientos, que pueden estar influidas por su locación geográfica. Comparando con la Figura 2, puede observarse como las muestras de SMN y Sar, están geográficamente muy cercanas, y muestran gran similitud genética. Similar sucede con los aislamientos Sca y TT, los cuales presentan gran similitud genética. Al parecer, se encuentran influenciados por el clima de la zona atlántica del territorio. Sin embargo, no era de esperarse que el aislamiento PZT presentase gran similitud con Sca y TT, puesto ésta se encuentra más al sureste del territorio, donde las condiciones climáticas son más secas. Al parecer, es posible que esta cepa sea derivada de TT, puesto muestra mayor relación que con Sca.

Las cepas A03, Aco y Oro son también muy similares según el dendrograma, sin embargo, no puede decirse que es debida a su cercanía geográfica, ni el clima. Las cepas Co2 y LH por su parte, no mostraron similitud genética entre ellas ni entre las demás muestras (a excepción de Aco). Por su distanciamiento geográfico, puede esperarse una alta variación genética en el caso de Co2, pero en el caso de LH, puede deberse a modificaciones genéticas inducidas por condiciones ambientales o espontáneas, que no están realmente claras.

Un factor que es elemental de considerar, es que se realizó una selección azarosa de la muestra representativa de cada aislamiento en el momento mismo que se realizó el cultivo monospórico. Sin embargo, al ser una única espora la que estaría evaluándose, pudo darse el caso que esa muestra no fuera tan representativa de la población, y por ello, brindar ciertos resultados no acordes al aislamiento como grupo. Sin embargo, diferentes estudios han hecho hincapié en la importancia de reducir la variabilidad genética, principalmente para la caracterización molecular y patogénica (Vélez *et al.*, 2000; Estrada *et al.*, 1999).

Relacionado con los parámetros biológicos evaluados, en el dendrograma, puede observarse como según las relaciones de similitud entre los aislamientos, no corresponden con los grupos de producción de esporas. Es evidente que no existe una correlación genético con este parámetro, puesto subgrupos como Aco, A03 y Oro; y PZT, SCa y TT, pueden observarse dos aislamientos de alta producción de esporas, y una de baja producción muy emparentada; y su viceversa con el segundo subgrupo mencionado. Esto implica que existe una alta influencia externa, favorecida por condiciones ambientales posiblemente.

Por otra parte, en cuanto al crecimiento radial, comparando los datos de TDCR con los del dendrograma, no se puede realizar ningún tipo de relación genética, aún más cuando en un grupo genéticamente similar donde se encuentran SCa, PZT y TT, se encuentran los extremos de máximo y menor crecimiento.

En cuanto a la agresividad ante la broca, parece ser que existe cierta relación de los subgrupos SMN, Sar, PZT, TT y SCa, y el subgrupo conformado por Oro, A03 y Aco. Esto se debe a que el primero, todas las cepas presentaron más de un 52,5% de esporulación, siendo la mayoría más altas del 60%. Por su parte, el segundo subgrupo, mostró un nivel de esporulación sobre el insecto menor del 55%. Esta coincidencia podría reflejar algún comportamiento natural similar, sin necesidad de ser influida por algún factor genético. Sin embargo, se requiere de investigación genética más específica.

5. CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar la técnica de obtención de cultivos monospóricos de *Beauveria bassiana* a partir de cultivos multiespóricos.
- Se comprobó que las matrices sólidas son medios de producción masiva eficaces.
- Los diferentes aislamientos mostraron alta heterogeneidad en las evaluaciones biológicas realizadas.
- La mayor producción de esporas se observó en las cepas A03, Aco, Sar, SMN, SCa y LH.
- La Tasa de Crecimiento Radial Diario fue estadísticamente mayor en SCa, Sar y SMN.
- Las cepas con mayor resistencia a la luz ultravioleta son Aco, TT, Co2, Sar y SCa.
- Existen cepas de *Beauveria bassiana* altamente patogénicas para la broca.
- Las cepas que ocasionaron mayor número de brocas esporuladas son Co2, Sar, PZT y LH.
- La cepa Sar presentó mayor producción de esporas, velocidad de crecimiento, resistencia a la luz UV y gran agresividad ante la broca.
- No existe relación entre la producción de esporas, crecimiento radial, resistencia a la luz ultravioleta o agresividad para con ninguna de las características biológicas mencionadas.
- Se estandarizó el protocolo de extracción de ADN a partir de cultivo fresco en placa de Bb apto para análisis de microsatélites.
- El protocolo de extracción de ADN influye significativamente en el PCR.
- Se obtuvo un protocolo de tipificación por microsatélites específicos de Bb.
- La caracterización molecular por microsatélites específicos es altamente reproducible, confiable y polimórfica.
- Se encontró una pareja de microsatélite con alto grado de polimorfismo, capaz de diferenciar entre cualquiera de las 10 cepas evaluadas.
- Los diferentes aislamientos mostraron diferencias moleculares y biológicas que permiten clasificarlas como cepas.

- Se construyó un dendrograma que revela un distanciamiento genético considerable para las diferentes cepas según los imprimadores empleados.
- No se encontró relación entre la ubicación geográfica y las similitudes genéticas de las cepas estudiadas.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar mayor cantidad de repeticiones y tiempos de exposición para evaluar la resistencia a la luz ultravioleta en laboratorio.
- Evaluar la producción de esporas y el crecimiento radial luego de las irradiaciones.
- Valorar en campo los diferentes aislamientos en cuanto a su resistencia a la luz ultravioleta y agresividad ante la broca.
- Para la evaluación de la agresividad ante la broca, cultivar el ensayo con alimento para el insecto y con diferentes concentraciones de esporas expuestas, para calcular la mortalidad y la dosis letal media (DL_{50}).
- Identificar machos y hembras de broca al realizar la evaluación anterior y procurar que todos los insectos colectados estén vivos cuando se cierra la placa.
- Utilizar matrices sólidas para el mantenimiento y reproducción del hongo.
- Realizar mayores repeticiones para las evaluaciones del crecimiento radial, evitando el uso de antibióticos que pueden retardar el desarrollo del hongo.
- Utilizar mayor cantidad de muestras, preferentemente algunas muy cercanas geográficamente, para comparación y análisis de poblaciones.
- Realizar las extracciones de ADN en frío.
- Emplear geles de poliacrilamida para el revelado de los productos amplificados.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott, W. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18:265-267.

Adoutte, A; Balavoine, G; Lartillot, N; Lespinet, O; PNUD`homme, B; Rosa, R. 2000. The new animal phylogeny: Reliability and implications. *PNAS*. 97 (9): 4453-4456.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J; *et al.*, 1996. *Biología Molecular de la Célula*. 3ª Edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1387 p.

Alcazár, J; Raman, K; Torres, E; Yabar, E. 1999. *Beauveria* sp: Hongo amigo del agricultor. *MEDIO AMBIENTE*. 45: 44-46. Lima, Perú. Consultado 26 noviembre 2005. Disponible en: <http://www.redepapa.org/index.htm>

Baker, P; Lea, S. 2002. Integrated management of the Coffee Berry Borer. CABI Commodities Project. CABI Bioscience. Consultado 15 mayo 2005. Disponible en: <http://www.cabi-commodities.org/Coffee/Cfp/CfpcpIMC.htm>

Barker, P. 1999. La broca del café en Colombia; Informe final del proyecto MIP para el café DFID-Cenicafé-CABI Bioscience. DFID. Chinchiná, Colombia. 148 p.

Barron, G. 2001. George Barron`s Website on Fungi. Universidad de Guelph, Ontario, Canada. Consultado 27 noviembre 2005. Disponible en: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>

Bielikova, L; Landa, Z; Osborne, L; Curn, V. 2002. Characterization and identification of entomopathogenic and mycoparasitic fungi using RAPD-PCR technique. *Plant Protection Science*. 38 (1): 1-12.

Blanford, S; Chan, B; Jenkins, N; Sim, D, Turner, R; Read, A; Thomas, M. 2005. Fungal Pathogen Reduces Potential for Malaria Transmission. *Science*. 308: 1638-1641.

Brun, L; Suckling, D. 1997. Resistencia de la broca del cafeto al endosulfán. *Memorias XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultora*. Editorama. San José Costa Rica. p 65-79.

Budak, H; Pedraza, J; Cregan, P; Baenziger, P; Dweikat, I. 2003. Development and Utilization of SSRs to Estimate the Degree of Genetic Relationships in a Collection of Pearl Millet Germplasm. *Crop Science Society of America*. 43:2284-2290

Bull, A; Ward, A; Goodfellow, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (3): 573-606.

Bustillo, A. 2005. Manejo Integrado de Plagas. Cenicafé-Federacafé. Colombia. Consultado 15 mayo 2005. Disponible en:

http://www.cenicafe.org/modules.php?name=Manejo_Plagas&file=informacion&Id=3

_____; Bernal, M; Benavides, P; Chaves, B. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Florida Entomologist. 82(4):491-498

Caetano, G; Gresshoff, P. 1997. DNA markers: Protocols, applications and overviews. Wiley-Liss, Inc. Nueva York, EEUU. 353 p.

Cagán, L; Svercel, M. 2001. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Central European Agriculture. 2 (3-4): 228-232.

Campos, E. 2001. Comisión de Broca del ICAFE Informa. Boletín Técnico. Oficina Regional de Pérez Zeledón, ICAFE. Setiembre, Año 1, Número 4. Costa Rica. pp. 7-8.

Carrillo, L. 2005. Los hongos de los alimentos y forrajes: Estructuras. Universidad Nacional de Salta. Facultad de Ciencias Agrarias. Consultado 27 noviembre 2005. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>

Cascade Biologics. 2002. Using a Hemacytometer. Cascade Biologics Inc. Consultado 19 Julio 2005. Disponible en:

<http://www.cascadebio.com/pdfdocs/Cell%20Documents/hemat.pdf>

Claros, G. 2005. Marcadores Moleculares. Universidad de Málaga. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Consultado 14 mayo 2005. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>

Coll, P; Coque, T; Domínguez, A; Vázquez, J; Vila, J. 2005. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 18. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Consultado 12 octubre 2005. Disponible en:

<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap18.htm>

Collinge, D. 2000. Fungal and bacterial taxonomy, diagnostics, and ecology. The Royal Veterinary and Agricultural University. Department of Plant Biology. Frederiksberg, Dinamarca. Consultado 14 mayo 2005. Disponible en:

<http://www.plbio.kvl.dk/~dacoj3/diag/tax-diag.htm#Fungal%20taxonomy>

Creighton, C. 1999. Encyclopedia of Molecular Biology. John Wiley & Sons. New York, EEUU. 4334 pp.

- Crick, F. 1970. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*. 227: 561-563.
- Crop Protection Compendium. 1999. Broca del Café. Global Module. Consultado 14 mayo 2005. Disponible en:
http://www.senasa.gob.pe/sanidad_vegetal/programas_fitosanitarios/mip_cafeto/broca_del_cafe.htm
- Dávila, M; Zambrano, K; Castillo, M. 2001. Uso de la técnica RAPD para la identificación de fragmentos de ADN posiblemente relacionados con virulencia en hongos entomopatógenos. *Bioagro*. 13 (3): 93-98.
- Devotto, L; Gerding, M. 2003. Respuesta de dos aislamientos chilenos de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Srokin a la adición de un protector solar. *Agricultura Técnica (Chile)*. 63(4): 339-346.
- Duperchy, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 p.
- EDAFON. 2005. Fundación Agroecológica. Consultado 26 noviembre 2005. Disponible en:
<http://www.controlbiologico.com/bassianil.htm>
- Enkerli, J; Widmer, F; Gessler, C; Keller, S. 2001. Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Mycol. Res*. 9:1079-1087.
- Estrada, V; Vélez, A; Montoya, R. 1997. Caracterización de cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé*. 48 (4): 217-224.
- Estrada, M; Romero, M; Rivero, M; Barroso, F. 2004. Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Bullí. en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. *Rev. Iberoam. Micol.* 21:43-43.
- Fermentas (a). 2005. MassRuler™ DNA Ladders, ready-to-use. Consultado 11 octubre 2005. Disponible en: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/massrulers.htm>
- Fermentas (b). 2005. FastRuler™ DNA Ladders, ready-to-use. Consultado 11 octubre 2005. Disponible en: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/fastrulers.htm>
- GenBank. 2005. NCBI: GenBank Overview. Consultado 2 diciembre 2005. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
- Goldstein, D; Ruiz, A; Luca, L; Feldman, M. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics Society of America*. 139: 463-471.

Hansen, P. 2000. Hemacytometer. Department of Animal Sciences, University of Florida. Consultado 19 Julio 2005. Disponible en:
<http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacytometer.htm>

Haraprasad, N; Niranjana, S; Prakash, H; Shetty, H; Wahab, S. 2001. *Beauveria bassiana*—a potential mycopesticide for the efficient control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. *Biocontrol Science and Technology*.11: 251-260.

Hegedus, D; Khachatourians, G. 1993. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolyptocladium* and *Metarhizium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (12): 4283-4288.

_____; _____. 1996. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 67(3): 289-299.

Henke, M; How, S; Gross, U; Zimmermann, G; Kraemer, D; Weig, M. 2002. Human Deep Tissue Infection with an Entomopathogenic *Beauveria* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(7): 2698-2702.

Iáñez, E. 2005. Curso de Microbiología General. Universidad Nacional del Nordeste. Consultado 4 marzo 2005. Disponible en:
http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/18_micro.htm

ICAFFE. 2005. Atención Señor Caficultor. El País, 11A, 27 Junio. Periódico La Nación. Costa Rica.

ICAFFE. 2004. Historia del Café de Costa Rica (en línea).CATIE, Costa Rica. Consultado 25 octubre 2005. Disponible en: <http://www.online.co.cr/icafe/index.htm>

ICAFFE. 2003. Boletín Informativo. Oficina Regional Valle Central, Icafe. Heredia, Costa Rica. Año 3, Núm. 2. Abril-Junio 2003.

Infoagro. 2004. Enemigos Naturales. Consultado: 26 noviembre 2005. Disponible en:
http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/enemigosnaturales.asp

Inge, K. 1993. Metodología para la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad “Tristeza del palto” Aislamiento, identificación y patogenicidad de cepas de *Phytophthora* asociadas. Facultad de Agronomía. Universidad de Valparaíso. 99 p.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Caud. Sci. Nat.* 44, 223-270

Jenkins, John B. 1990. *Human Genetics*. 2^{da} Ed. Nueva York. Harper y Row. 461 p.

Kouassi, M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Universidad de Québec, Montreal, Canada. VertigO. La revista en ciencias ambientales de la web. 2 (2). Consultado 27 noviembre 2005. Disponible en: www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html

Loxdale, H; Lushai, G. 1998. Molecular markers in entomology. Bulletin of Entomological Research. 88. pp. 577-600.

Luna, D; *et al.*, 1999. PCR Isolation of Microsatellite Arrays (PIMA). Molecular Ecology. 8: 891-894.

McGuire, M; Ulloa, M; Young-Hoon, P; Hudson, N. 2005. Biological and molecular characteristics of *Beauveria bassiana* isolates from California *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) populations Biological control. 33: 307-314

Ministerio de Comercio Exterior de Costa Rica (COMEX). 2004. Exportaciones: Comercio de Costa Rica, Cifras Globales. Consultado 8 de octubre 2005. Disponible en: <http://www.comex.go.cr/estadisticas/exportaciones/default.htm>

Monzón, A. 2004. Control biológico de la broca (*Hypothenemus hampei*) en el cultivo de café. Universidad Nacional Agraria (UNA). Dirección de Investigación, Extensión y Postgrado (DIEP). Serie Técnica N° 6. Managua, Nicaragua. pp. 1-16.

Mora, J; Avilés, J. 2003. Resumen: Evaluación de la patogenicidad de aislamientos de *B. bassiana* para el control de la broca del café en Costa Rica / Eficacia de dos aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* para el combate de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). Instituto de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), MAG. V Congreso Nacional de Fitopatología, V Congreso Iberoamericano de Agroplasticultura, IV Congreso Nacional de Suelos. Alianza Tecnológica para la Agricultura con Calidad. Costa Rica. Consultado 9 octubre 2005. Disponible en: http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a01-8385_memoria.pdf

Mora, O. 2003. Boletín Informativo: Acción contra la Broca del café en la regional de occidente. Oficina Regional Naranjo, Valle Central Occidental, Icafe. Naranjo, Alajuela, Costa Rica. Año 3, Núm. 2. Abril 2003.

NLP Tools. 2004. SPECIALIST Natural Language Processing (NLP) Tools (Base de Datos). Consultado 27 noviembre 2005. Disponible en: http://specialist.nlm.nih.gov/nls/GSpell_web/data/2004LexiconTerms.txt

Pest Cabweb. 2005. Coffee Berry Borer. Pest of the Month. Consultado 15 mayo 2005. Disponible en: <http://pest.cabweb.org/Archive/Pestofmonth/Cbb.htm>

Polini, A. 2001. Memoria 2001. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Biblioteca Virtual. Consultado 15 mayo 2005. Disponible en: www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/memoria_2001.pdf

Prohl, H; Adams, M; Mueller, U; Rand, S; Ryan, M. 2002. Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci from the túngara frog *Physalaemus pustulosus*. Molecular Ecology Notes. 2:341-343.

Promega. 2005. Wizard R Genomic DNA Purification Kit. Promega Corporation. Technical Manual. Part# TM050. pp. 1-20

Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER). 2003. Costa Rica: Estadísticas de Exportación 2003. Consultado 8 de octubre 2005. Disponible en: http://www.procomer.com/est/mercados/libro_2003.cfm

Rehner, S; Buckley, E. 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Molecular Ecology Notes. 3 (3): 409-411.

Robles, J; Koreen, L; Park, S; Perlin, D. 2004. Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology. 42 (6): 2480-2488.

Saghai-Marooif, M; Soliman, K; Jorgensen, R; Allard, R. 1984. Fungal DNA isolation. PNAS. 81:8014-8018.

Scholte, E; Knols, B; Samsom, R; Taken, W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. Journal of Insect Science. 4(19): 24 pp.

SIGICAFE. 2005. Sistema de Información Geográfica: Estadísticas del café de Costa Rica: Hectáreas por Distrito. Consultado 25 setiembre 2005. Disponible en: http://sigicafe.icafe.go.cr/FAQ_esp_Hectareas.htm

Solter, I. 2004. Biological control pathogens: Conidiophore structure. Illinois Natural History Survey. Midwest Institute for Biological Control. EEUU. Consultado 27 noviembre 2005. Disponible en: www.biocontrol/pathogens/typesofpathogens/photos/fungi1.html

Tafoya, F, Zúñiga, M; Alatorre, R; Cibrian, J; Stanley, D. 2004. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the cactus weevil, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. Florida Entomologist. 87(4): 533-536.

Tenzer, I; Ivvanishevich, S; Morgante, M; Gessler, C. 1999. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. The American Phytopathological Society. 89(9): 748-753.

Tobar, S; Vélez, P; Montoya, E. 1999. Selección en laboratorio de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por resistencia a la luz ultravioleta. *Cenicafé*. 50 (4):327-337.

Ukers, William. 1922. All About Coffee. The Tea and Coffee Trade Journal Company. Nueva York. Estados Unidos de América. 796 p.

Valadez, E; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa México S.A. México. 141 p.

Valdés, B; Vélez, P; Montoya, E. 1999. Caracterización enzimática y patogenicidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Cenicafé*: 50(2): 106-118.

Vélez, A. 2002. Análisis de enzimas de restricción. Laboratorio de Fisiología Celular. Departamento de Biología. Universidad de Puerto Rico. Disponible en: <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/biol3010.htm>

Vélez, P; González, G; Valderrama, F; Estrada, V; Bustillo, P; Montoya, R. 2000. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Cenicafé*. 51 (3): 196-206.

Viaud, M; Counteaudier, Y; Riba, G. 1998. Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (1): 88-93.

_____; _____; _____; Lewis, C. 1996. Genome Organization in *Beauveria bassiana*: Electrophoretic Karyotype, Gene Mapping, and Telomeric Fingerprint. *Fungal Genetics and Biology*. 20:175-183.

Wang, C; Shah, F; Pate, N; Li, Z; Butt, T. 2003. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*. 5(10): 908-915

Wong, H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 147 p.

Westwood, G; Huang, S; Keyhani, N. 2005. Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Clinical and Molecular Allergy*. 3(1): 1-8.

Yu, K; Park, S; Pysa, V; Gepts, P. 2000. Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The American Genetic Association*. 91:429-434.

Zambrano, K; Dávila, M; Castillo, M. 2002. Detección de fragmentos de ADN de hongos y su posible relación con la síntesis de proteínas de actividad entomopatógena. Revista Fac. Agronómica. (LUZ). 19: 185-193.

Zamora, L. 1998. Manual de Recomendaciones para el Cultivo del Café. 1ª ed. Instituto del Café de Costa Rica, Unidad de Producción Agrícola. Heredia, Costa Rica.

Zane, L; Bargelloni, L; Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1-16.

ANEXOS

Anexo 1

Preparación de medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa)

Se pesan en balanza analítica 39 g de PDA y se disuelven en un balón aforado con 1 litro de agua destilada, agitando y a alta temperatura hasta que el color amarillento desaparezca y se vuelva traslúcido. Pasado este tiempo se autoclava durante 15 minutos y luego se dispensan 15-20 ml en placas de Petri.

Anexo 2

Preparación de medio de cultivo PDA con tetraciclina

Se pesan 10 g de oxitetraciclina (98% i.a.) y se disuelven en 100 ml de agua destilada. Se prepara el medio de PDA según Anexo anterior, sin embargo antes de dispensar, se deja enfriar el recipiente hasta alcanzar los 40-50°C. A esta temperatura, se disuelve con agitación los 100 ml de solución de oxitetraciclina con un litro de medio PDA, y se dispensa en placa.

Anexo 3

Protocolo para obtención de cultivos monospóricos

Tabla 9 Cálculos empleados para la obtención de soluciones diluidas de esporas para cada muestra de Bb, utilizadas para el crecimiento de micelios monospóricos

Cepa	Número de Esporas Totales (Σ_{ET})	Número de Esporas por mililitro aproximado (E/M)*	Volumen a adicionar aproximado ($\pm 0,01\mu l$)**
A03	83	$3,5 \times 10^7$	2,83
Oro	65	$2,8 \times 10^7$	3,62
Aco	96	$4,0 \times 10^7$	2,45
TT	140	$6,0 \times 10^7$	1,68
Sar	93	$4,8 \times 10^7$	2,53
SMN	34	$1,5 \times 10^7$	6,92
PZT	39	$1,7 \times 10^7$	6,03
SCa	147	$6,3 \times 10^7$	1,60
LH	13	$5,5 \times 10^6$	18,10
Co2	21	$8,9 \times 10^6$	11,21

* El cálculo del # esporas/ml se obtuvo según la fórmula: $\Sigma_{ET} \times 50.000 \times$ Volumen de Disolución (8.5ml)

** Volumen de disolución madre necesarios para disolver en 10 ml de agua estéril, que al tomar 2 μ l, existan aproximadamente 20 esporas. Se calculó de la siguiente forma: $1 \times 10^8 / E/M$

Fuente: Laboratorio de Fitopatología del CICAPE.

Anexo 4

Protocolo de PCR para microsatélites

Tabla 10 Concentraciones y volúmenes requeridos de reactivos de PCR para la preparación de la Master Mix

Reactivo	Concentración Inicial	1 RXN (µl)	12 RXNs (µl)*	Concentración final
Agua PCR	---	10	120	---
Buffer PCR	10X	2	24	1 X
MgCl ₂	25mM	2	24	2.5mM
dNTP's	10mM	0.4	4.8	0.2mM
Primer F	10 µM	0.2	2.4	0.1µM
Primer R	10 µM	0.2	2.4	0.1µM
<i>Taq</i> polimerasa	5 µg/µl	0.2	2.4	1 U
Muestra ADN**	4 ng/µl	5	-	20 ng
Total	---	20 µl	180 µl	---

* Para emplear un solo par de primers en las 10 muestras (más un control negativo y error de pipeteo)

** Realizar la respectiva dilución 1/10 como paso previo. No se incluye dentro de la Master Mix

Anexo 5

Preparación de Buffer TAE 1X (1 Litro)

Primero se prepara la solución madre 50 X. Se pesan 242,0 gramos de Tris-HCl y adicionaron en un balón aforado de 1 litro. Se adicionan en la cámara de extracción de gases 100 ml buffer de EDTA 0,5M pH 8.0 y 57.1 ml de Ácido Acético Glaciar con cuidado (lentamente por reacción exotérmica), se afora con agua destilada estéril, revuelve bien y almacena en un frasco ambar.

De ésta dilución se toman 20 ml y agregan 980 ml de agua destilada estéril.

Anexo 6

Preparación de gel de agarosa 3%

Se pesan 3 gramos de agarosa (para electroforesis) y se disuelven en 100 ml de Buffer TAE 1X en un erlenmayer de 250 ml mediante agitación y calentamiento en microondas (aproximadamente 40 segundos en intervalos de 10 segundos). Cuando la temperatura se encuentra a 60 °C, adicionar 2µl de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), agitar con cuidado y dispensar en una cámara para electroforesis con el peine colocado, y se deja gelificar en una cabina de extracción de gases (15 minutos aproximadamente).