



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Caracterización Molecular del hongo *Metarhizium spp*”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERIA EN AGROPECUARIA

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 3. Conservación de la Biodiversidad

Sublínea 3.1 Estudio, conservación y manejo de la biodiversidad

AUTORA: JOHANA ALEXANDRA CASTRO ARMAS.

ASESOR: ING. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE. MCs

Ibarra, 2019



Ibarra, 21 Enero del 2019

MCs. Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas Ambientales y Zootecnia (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f:)
MCs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

C.C.: 100265839-9



PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f):
M.C.s. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C:100265839-9

(f):
M.Sc. Diego Manuel León Tapia

M.Sc. Diego Manuel León Tapia

C.C.:171166889-5

(f):
M.S.c. Edwin Fernando Del Pozo Villacis

M.S.c. Edwin Fernando Del Pozo Villacis

C.C:100175656-6



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Johana Alexandra Castro Armas, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos o autorizar las utilizations de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 21 de Enero del 2019

f):

Johana Alexandra Castro Armas

C.C.: 100376946-8



AUTORÍA

Yo, Johana Alexandra Castro Armas, portador de la cédula de ciudadanía N°1003769468, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad de mi autoría y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Johana Castro', is positioned above a dotted line.

f):

Johana Alexandra Castro Armas

C.C.: 100376946-8



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo: Johana Alexandra Castro Armas, con CC: 1003769468, autora del trabajo de grado intitulado: “Caracterización molecular del hongo *Metarhizium spp.*”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniera Agropecuaria, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 21 de Enero del 2019

(f.)

Johana Alexandra Castro Armas

C.C.: 100376946-8



**DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN,
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN.**

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “Caracterización molecular del hongo *Metarhizium spp*”, lo propuesto en el Código de ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha de 15 de enero del 2018.

(f)

JOHANA ALEXANDRA CASTRO ARMAS

C.C. / Pasaporte: 100376946-8

Carrera: Ingeniería Agropecuaria.

DEDICATORIA

Este presente trabajo de investigación está dedicado con mucho cariño y amor.

Para mis padres Germán Castro y Luciana Armas (+), por el apoyo mutuo que me supieron dar día tras día, en este largo caminar de mi etapa estudiantil, gracias a sus consejos y enseñanzas que me ayudaron a superarme cada día para ser una mejor persona tanto en la parte ética como en la formación académica y ser mi fuente de inspiración para culminar con éxitos esta carrera que hoy termina.

A mi hermanas Vivian (+) y Estefanía Castro Armas por darme su cariño sincero, por sus palabritas de aliento que me ayudaron a salir adelante en los momentos de dificultad gracias.

A mi hijo Sebastián por ser mi inspiración y mi aliento para terminar este trabajo de investigación sé que fue difícil pero no imposible.

Johana Castro Armas.

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradecer a mi Dios por permitirme culminar con satisfacción esta carrera.

A mis padres Germán Castro y Luciana Armas (+) quienes me supieron alentar en este camino que hoy culmina con felicidad por sus palabras de aliento, consejos que me supieron brindar en cada momento.

A mi abuelita Bachita, quien me enseñó a luchar día a día por lo que deseo y que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo lo que se propone, gracias de manera especial también a mis tíos a mis primos y demás familiares quien me alentaron a culminar esta profesión.

También quiero agradecer a la Ingeniera Maritza Mier, por su paciencia en este trabajo de investigación, y por darme la oportunidad de trabajar junto a ella.

Al Ingeniero Santiago Mafla, que me ayudo en cada ocasión que necesitaba de sus conocimientos, gracias por la confianza que depositaron en mí.

Mil gracias a todos.

Johana Castro Armas.

ÍNDICE CONTENIDO

1	Resumen.....	xvii
2	Abstrac	xviii
3	Introducción	1
3.1	Problema	1
3.2	Justificación	2
3.3	Objetivos	3
3.3.1	Objetivo General	3
3.3.2	Objetivos Específicos.....	3
3.4	Hipótesis	3
4	Estado del arte	3
4.1	<i>Metarhizium spp</i>	4
4.2	Características del hongo <i>Metarhizium spp.</i>	5
4.3	Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos	6
4.4	Caracterización Molecular	7
4.4.1	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	8
4.4.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	8
4.4.3	Polimorfismo de ADN Amplificados al azar (RAPD)	9
4.5	Medio de cultivo	9
4.5.1	Medio de cultivo utilizado	9
4.5.1.1	Papa Dextrosa Agar (PDA).....	9
4.5.2	Condiciones que debe tener un medio de cultivo	10
4.5.3	Componentes minerales	10
4.6	Gen ITS	10
5	Metodología de la Investigación.....	11
5.1	Lugar de desarrollo de la Investigación	11
5.2	Materiales, Equipos e Insumos	12
5.2.1	Materiales.....	12
5.2.2	Equipos	13
5.2.3	Insumos	13

5.2.4	Metodología	14
5.3	Metodología para la fase de campo y laboratorio.	15
5.3.1	Preparación del Ensayo	15
5.3.1.1	Fase de Campo	15
5.3.1.2	Fase de Laboratorio.....	15
5.3.1.2.1	Aislamiento del gen target	15
5.3.1.2.2	Crecimiento del micelio.	16
5.3.1.2.3	Extracción de ADN.....	18
5.3.1.2.4	PCR.....	19
5.3.1.2.5	Electroforesis	21
5.3.1.2.6	Secuencialización.....	22
6	Resultados y discusión	23
6.1	Fase de laboratorio	23
6.1.1	Aislamiento del gen target de diferentes cepas de <i>Metarhizium spp</i> para su caracterización molecular.	24
6.1.2	Identificación de las cepas de <i>Metarhizium spp</i> mediante la secuencialización del gen target.....	25
7	Conclusiones y Recomendaciones	44
7.1	Conclusiones	44
7.2	Recomendaciones	45
8	Referencias Bibliográficas	46
9	Anexos	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>Metarhizium</i>	4
Tabla 2	Plagas de importancia económica controladas por hongos entomopatógenos	5
Tabla 3	Medio selectivo utilizado para el crecimiento del hongo <i>Metarhizium spp</i>	16
Tabla 4	Medio Líquido para crecimiento del micelio.....	17
Tabla 5	Extracción de ADN.....	20
Tabla 6	Reactivos que se colocó en la secuencialización	22
Tabla 7	Cepas encontradas en la investigación	30

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Estructura <i>Metarhizium</i> .	6
Figura 2. Mecanismo de acción de <i>Metarhizium</i> .	7
Figura 3. Genes ribosomales y sus espacios interunidades, espacios intergénicos y dominio de la subunidad grande. .	11
Figura 5. Crecimiento micelio del hongo. .	17
Figura 6. Electroforesis. .	21
Figura 7. Sitio Muestreado. .	23
Figura 8. Aislamiento gen target. .	24
Figura 9. <i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 549. .	31
Figura 10. <i>Metarhizium anisopliae</i> BRIP 53293. .	32
Figura 11. <i>Metarhizium anisopliae</i> BRIP 53284. .	33
Figura 12. <i>Metarhizium anisopliae</i> . .	34
Figura 13. <i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 549. .	36
Figura 14. <i>Metarhizium anisopliae</i> BRIP 53293. .	36
Figura 15. <i>Metarhizium anisopliae</i> BRIP 53284. .	37
Figura 16. <i>Metarhizium anisopliae</i> . .	37
Figura 17. Tabulación pregunta 1. ¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias .	38
Figura 18. Tabulación pregunta 2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?. .	39
Figura 19. Tabulación pregunta 3. ¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema? .	39
Figura 20. Tabulación pregunta 4. ¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?.....	40
Figura 21. Tabulación pregunta 5. ¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión? .	41
Figura 22. Tabulación pregunta 6. ¿Considera usted que el tema investigativo posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad? .	41
Figura 23. Tabulación pregunta 7. ¿Considera usted que ésta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores? .	42

Figura 24. Tabulación pregunta 8. ¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización empresa pública o privada, comunidad o institución?	43
Figura 25. Tabulación pregunta 9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron?	43
Figura 26 Microcentrifuga.....	50
Figura 27 Vortex.....	50
Figura 28. Incubador.....	50
Figura 29. Balanza analítica.....	51
Figura 30. Termociclador.	51
Figura 31. Cámara de electroforesis.	51
Figura 32. Elaborador de gel.....	52
Figura 33. Germinadora.....	52
Figura 34. Cámara de flujo laminar.	52
Figura 35. Reactivos para la preparación gel.....	53
Figura 36. Green Master Mix.	53
Figura 37. Reactivos Medio Especifico.....	53
Figura 38. Colocación de agua destilada en frasco boeco.	54
Figura 39. Pesaje de muestra.	54
Figura 40. Muestra de tierra.....	54
Figura 41 Pesaje de reactivos.....	55
Figura 42 Tubos de ensayo con agua destilada.....	55
Figura 43 Tubos de ensayo con la muestra de tierra.....	56
Figura 44. Dispensando el medio en cajas Petri.	56
Figura 45. Siembra en cajas Petri.	56
Figura 46. Hongo <i>Metarhizium</i>	57
Figura 47. Obtención del pellet.....	57
Figura 48. Digestión Buffer.....	58
Figura 49 Incubadora a 55°C.....	58
Figura 50. Agitación en el vortex.	58
Figura 51. Muestra en el Termociclador.....	59
Figura 52. ADN.....	59

Figura 53. Preparación gel.....	59
Figura 54. Elaboración gel.....	60
Figura 55. Presencia de ADN	60
Figura 56. Invitación.....	61
Figura 57. Encuesta.....	61
Figura 58. Lista participantes.....	62
Figura 59. Socialización.	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Equipos de Laboratorio.	50
Anexo 2. Reactivos	53
Anexo 3. Siembra de cajas Petri.	54
Anexo 4. <i>Metarhizium</i>	57
Anexo 5. Extracción de ADN.	57
Anexo 6. Electroforesis.....	59
Anexo 7. Invitación Socialización.	60
Anexo 8. Socialización.	61

1 RESUMEN

El objetivo de la investigación consistió en la caracterización molecular del hongo *Metarhizium spp*, con la finalidad de clasificar morfológicamente a través de técnicas moleculares, obteniendo como resultado cepas caracterizadas por morfología con ayuda de la secuencia del gen ITS ADN_r (Recalde, Aminaél, y Rodríguez, 2017) . La presente investigación se ejecutó en dos fases consecutivas: la primera en campo, que fue la toma de muestras de suelo en el provincia del Carchi cantón Mira en la parroquia Jijón y Caamaño en los sectores de San Jacinto y San Patricio de Chinambí y en el cantón Espejo parroquia El Goaltal en el sector las Juntas total de muestreos realizados 48. La segunda fase comprende a la de laboratorio en la que se aislaron 24 muestras de *Metarhizium spp* en medio de Potata Dextrosa Agar (PDA), y en un medio específico Neopeptone, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Glucosa, Agar, Erythrosin B, Chloramphenicol, Cycloheximide, Streptomycin sulfate salt teniendo en cuenta los factores de humedad, temperatura y pH. Para la extracción de ADN de cada aislamiento se amplificó mediante la técnica PCR con los primers R11 y F11, luego de esto se procedió al análisis de la secuencialización de los 24 aislamientos, dándonos como resultado la identificación de 4 cepas, siendo éstas: *Metarhizium anisopliae* ARSEF 549, *Metarhizium anisopliae* BRIP 53293, *Metarhizium anisopliae* BRIP 53284 y *Metarhizium anisopliae*.

Palabras clave: *Metarhizium*, hongos entomopatógenos, PCR.

2 ABSTRAC

The objective of the research consisted in the molecular characterization of the fungus *Metarhizium* spp, in order to classify morphologically through molecular techniques, obtaining as a result strains characterized by morphology with the help of the ITS rDNA gene sequence (Recalde, Aminael, y Rodríguez , 2017). The present investigation was carried out in two consecutive phases: the first in the field, which was the taking of soil samples in the province of Carchi Mira canton in the Jijón and Caamaño parishes in the sectors of San Jacinto and San Patricio de Chinambí and in the canton Espejo parish The Goaltal in the sector Las Juntas total of samples taken 48. The second phase includes the laboratory in which 24 samples of *Metarhizium* spp were isolated in the medium of Potata Dextrose Agar (PDA), and in a specific medium Neopeptone , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Glucose, Agar, Erythrosin B, Chloramphenicol, Cycloheximide, Streptomycin sulfate salt taking into account the factors of humidity, temperature and pH. For the DNA extraction of each isolate, it was amplified by means of the PCR technique with the first R11 and F11, after which the sequentialization of the 24 isolates was analyzed, giving as result the identification of 4 strains, being these: *Metarhizium anisopliae* ARSEF 549, *Metarhizium anisopliae* BRIP 53293, *Metarhizium anisopliae* BRIP 53284 and *Metarhizium anisopliae*.

Key Words: *Metarhizium*, entomopathogenic fungus, PCR.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 PROBLEMA

Para Monzón, (2011), el uso excesivo de plaguicidas por parte del agricultor provoca efectos degenerativos en el suelo, el agua y el medio ambiente, forjando un aumento de plagas debido a que las mismas han desarrollado una resistencia a los diferentes tipos de insecticidas, por la falta de rotación de cultivos, por tanto, cada día la implementación de nuevas alternativas son más necesarias como el caso de los controladores biológicos (González, 2003).

Los controladores ayudan a lograr un equilibrio poblacional, con una regulación de un organismo que se ve afectado por una plaga, identificando tres tipos: los Depredadores (insectos y arácnidos), los Parasitoides y los Entomopatógenos (hongos, bacterias y virus) (Rodríguez, 2010).

Es por tanto, interesante determinar la caracterización molecular, dada la explosión de tecnologías que permiten apostar a conocer modelos biológicos con diferentes profundidades, la aplicación de técnicas que permiten detectar e identificar, de manera individual o combinadas, moléculas propias de un sistema biológico (Ancizar, 2016).

El Ecuador es un país en vías de desarrollo, en el cual la investigación de hongos entomopatógenos a través de caracterización molecular no se encuentra muy difundido, lo cual es de suma importancia para poder identificar organismo puntuales que contribuyan a combatir plagas en general, permitiendo de esta manera disminuir la contaminación ambiental y el mejoramiento de los nutrientes de cada uno de los productos que se siembran en el país (Galán, 2012).

Por tanto, la presente investigación busca la identificación de cepas de *Metarhizium* presentes en suelos de potreros establecidos, con la finalidad de determinar su mecanismo de acción, importancia biológica y la conservación del mismo, con el objetivo de aumentar exponencialmente la cantidad de enemigos naturales, y por ende, llevar a cabo investigaciones en estudios específicos.

3.2 JUSTIFICACIÓN

Para Allendes (2007), la identificación de hongos entomopatógenos usualmente se realiza por morfología y por las características que presentan, por lo cual es necesario el empleo de técnicas más eficientes, confiables y sensibles (identificación molecular), las mismas que son aplicaciones específicas que permitan la diferenciación de entes entomopatógenos y puedan ser útiles en la implementación de medidas apropiadas para un buen control biológico

Para la identificación molecular de hongos entomopatógenos se utiliza el análisis de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADNr, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que es una de las herramientas o técnica molecular más empleadas para la caracterización e identificación de estos. Este método de identificación es rápida y confiable, lo que permite la identificación de hongos. (Ayra, *et al.*, 2001).

Una de las alternativas es el uso de organismos entomopatógenos, los cuales tienen la capacidad de reducir las poblaciones de plagas resistentes a los insecticidas, existen varios tipos, tales como virus, hongos, bacterias y nemátodos. Actualmente, se han identificado y estudiado diversas especies de hongos que afectan plagas de cultivos de importancia económica; muchos de ellos son utilizados exitosamente en programas de control biológico. Algunos de estos entomopatógenos son reproducidos masivamente y se venden comercialmente (Monzón, 2011).

Uno de los organismos entomopatógenos es el hongo ***Metarhizium***, el mismo que tiene múltiples ventajas en la eliminación de plagas en la parte agrícola como en la pecuaria los ácaros, además de disminuir el uso excesivo de insecticidas y acaricidas tóxicos para las plantas, animales y ser humano (Carolina, 2015).

Cruz (2009), establece que para el correcto análisis molecular del hongo ***Metarhizium*** es necesario contar con las condiciones necesarias para su investigación, tales como los niveles de temperatura adecuados de acuerdo a la actividad que se vaya a realizar como la desnaturalización y el alineamiento para que la secuenciación del hongo en estudio se de en los mejores ambientes.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo General

- Identificar cepas del hongo *Metarhizium spp* mediante técnicas de PCR y secuencialización para evaluar su nivel de patogenicidad.

3.3.2 Objetivos Específicos

- Aislamiento del gen target de diferentes cepas de *Metarhizium spp* para su caracterización molecular.
- Identificación de las cepas de *Metarhizium spp* mediante la secuencialización del gen target.
- Socializar los resultados obtenidos de la investigación a través de una charla a las personas interesadas con el fin de motivar su utilización.

3.4 HIPÓTESIS

Ha: Mediante la secuencialización se puede identificar cepas del hongo *Metarhizium spp*.

Ho: Mediante la secuencialización no se puede identificar cepas del hongo *Metarhizium spp*.

4 ESTADO DEL ARTE

El término hongos entomopatógenos se debe a que tienen la capacidad de atacar a diferentes tipos de insectos (Conchillo, *et al.*, 2006), o por ser un medio de control en relación a la disminución de insectos que son vectores de enfermedades que por ende causan daño al cultivo también se les puede llamar como parásitos obligados o facultativos con una alta capacidad de esporulación y sobrevivencia, la ventaja de estos es que tiene la capacidad de manipulación y adaptarse a diferentes medios como también tiene la facilidad de penetración directa por medio del tegumento.

Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas, se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de estos. Entre los más importantes: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*,

Zoophthora, Erynia, Eryniopsis, Akanthomyces, Fusarium, Hirsutella, Hymenostilbe, Paecilomyces y Verticillium (Ayra, et al., 2001).

4.1 *Metarhizium spp*

El hongo *Metarhizium spp* es un entomopatógeno imperfecto de la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae, que se caracteriza por tener una reproducción asexual y por atacar a un gran número de especies de insectos (Tabla 1).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Metarhizium

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Subfamilia	Tillandsioideae
Género	<i>Metarhizium</i>

Nota. Recuperado de (Leucona, RE. 1995).

El hongo *Metarhizium spp*, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y puede ser encontrado fácilmente en los suelos, donde sobrevive por largos períodos, en rastrojos de cultivos, estiércol, en las plantas, etc. Logrando un buen desarrollo en condiciones favorables como lugares frescos, húmedos y con poco sol, lo cual evita una erosión del suelo y por ende disminuye la contaminación al medio ambiente. Este hongo fue uno de los

primeros microorganismos en ser usado para el control biológico, también es uno de los más comunes con una distribución a nivel mundial. (Monzón, 2011).

Metarhizium spp., ataca a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Dentro de las plagas que son afectadas por este hongo está la salivita de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*) y chinches de diferentes cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco, pero se torna verde cuando el hongo esporula (DAGRIS, 2004).

Tabla 2

Plagas de importancia economía controladas por hongos entomopatógenos

Cultivo	Plaga	Hongos Entomopatógenos
Café	Broca	<i>Metarhizium anisopliae</i>
	Minador	
Caña de azúcar	Salivazo	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Diversos cultivos	Artrópodos	<i>Metarhizium anisopliae.</i>

Nota. Recuperado de (FAO, 2006)

4.2 Características del hongo *Metarhizium spp.*

Las colonias son adheridas completamente al medio, son de forma redonda totalmente de color amarillento, verdoso y marrón esto se presenta dependiendo del color que sea el aislamiento.

Conidióforo son ramificadas irregularmente, presentan de 2 -3 ramas en cada una de sus septos su longitud 4-14 µm y diámetro 1.5-2.5 µm.

Fiálides son de forma cilíndricas en forma de clava, adelgazadas en el ápice. Estas pueden medir longitud 6-13 µm y diámetro 2-4 µm.

Conidios son de forma generalmente uninucleadas estas pueden medir longitud de 3-9 μm y diámetro 1.5-3.5 μm de ancho (Bernal, 2000) (Figura 1).

La temperatura y humedad son importantes para la infección y esporulación del hongo ante la presencia de una agente extraño. En condiciones de laboratorio, la germinación puede ocurrir a partir de las 12 horas, a una temperatura de 23 a 30°C y humedad relativa mayor al 90% (Cañedo y Ames, 2004).

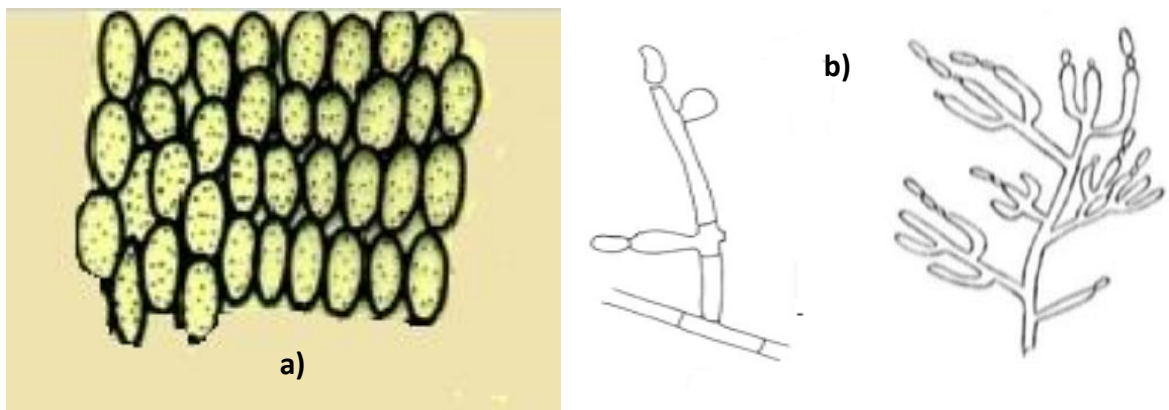


Figura 1. Estructura *Metarhizium* . Fuente. (Cañedo y Ames, 2004).

Nota. En la Figura 1 nos indica como es la estructura del hongo *Metarhizium*, donde, a) conidios que tienen forma circular y b) son los conidióforos que tienen forma de ramificaciones.

4.3 Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos

Para que el hongo entomopatógeno se desarrolle sobre su hospedador realiza las siguientes fases germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. El inóculo o unidad infectiva está constituido por las estructuras de reproducción sexual y asexual, es decir las esporas y conidios (Monzón, 2011).

- Como muestra en la Figura 2 el proceso inicia cuando la espora se adhiere a la cutícula del insecto; el cual produce un tubo germinativo y un apresorio, en el cual se fija la cutícula y se da la penetración al insecto.
- En la penetración participan dos mecanismos: el primero el físico, que consiste en romper las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula, y el mecanismo químico consiste en la acción enzimática (proteasas, lipasas y quitinasas), las cuales causan

descomposición del tejido en la zona de penetración (Sepúlveda, Gerding, y France, 2012).

- Después la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando totalmente el cuerpo del insecto (Figura. 2), (Maldonado, 2006).

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas, como dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero causando una gran actividad tóxica sobre el insecto (Alves y De Souza, 2014).



Figura 2. Mecanismo de acción de *Metarhizium*. Fuente. (Maldonado, 2006).

Nota. En la Figura 2 nos indica el mecanismo de acción del hongo *Metarhizium* que empieza adhiriéndose al cuerpo del insecto, para que luego se dé la esporulación y penetre al cuerpo del insecto, y por último el hongo se multiplica y libera toxinas como dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina causando la muerte del insecto infectado.

4.4 Caracterización Molecular

Para la identificación de las cepas de *Metarhizium spp* y poder estudiar el mecanismo de acción de cada cepa, se debe realizar la caracterización genética molecular, la cual permite el análisis de polimorfismos en determinadas moléculas proteicas y en marcadores de ADN, además, comprende la toma de muestras sobre el material biológico, extracción en laboratorio del ADN de las muestras, almacenamiento del ADN, ensayos de laboratorio (genotipaje o secuenciado), análisis de los datos, dictamen, y mantenimiento de una base de datos de información genética molecular, esta actividad se la puede combinar con las

encuestas y/o el seguimiento, ya que la información molecular por sí sola no se puede usar para tomar decisiones sobre utilización y conservación (Ayalew, *et al.*, 2003).

FAO (2006), determina que la caracterización molecular se basa en la exploración la diversidad genética dentro de una población y entre distintas poblaciones animales, y para determinar relaciones genéticas entre ellas, donde los resultados de esta investigación permitirán:

- Determinar los parámetros de diversidad dentro de una raza y entre razas;
- Identificar las localizaciones geográficas de determinadas poblaciones y/o de mezclas entre poblaciones de orígenes genéticos distintos;
- Proporcionar información sobre relaciones evolutivas (árboles filogenéticos) y determinar centros de origen y rutas migratorias;
- Iniciar actividades de cartografía génica, incluyendo la identificación de portadores de genes conocidos;
- Identificar relaciones de parentesco y genéticas (huella de ADN) dentro de las poblaciones.
- Apoyar la mejora genética de las poblaciones animales mediante el uso de marcadores; y
- Desarrollar depósitos de ADN para investigación y desarrollo.

4.4.1 Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Los AFLP son una combinación de la técnica del Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), esta se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción mediante PCR. Este método es sensible para caracterizar ADN y permite una exploración rápida del polimorfismo del genoma completo (Oulevey, 2009).

4.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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

Estos iniciadores son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región “blanco”. Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización de las cadenas de ADN, Alineamiento de la cadena y la Replicación del ADN., este ciclo se repite de 35 a 40 veces (Brunner, 2004).

4.4.3 Polimorfismo de ADN Amplificados al azar (RAPD)

RAPD es básicamente una variación del protocolo de PCR, con dos características distintivas: utiliza un primer único en vez de un par de iniciadores, y el iniciador único tiene secuencia arbitraria, por lo tanto, su “secuencia blanco” es desconocido. Debido a esto no se necesita conocimiento previo del genoma que se está analizando (Ferreira, 1998).

4.5 Medio de cultivo

El medio de cultivo es un elemento fundamental que permite el crecimiento favorable de un microorganismo, mientras tanto, que el cultivo ayuda al desarrollo de un organismo; los medios de cultivos utilizados en microbiología para el crecimiento de hongo entomopatógenos deben tener suficientes nutrientes para su óptimo desarrollo, reproducción con un buen pH (6- 6.3), también a estos medios se puede añadir antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias que suelen contaminar la muestra (Cañedo y Ames, 2004).

Los medios pueden ser sólidos o líquidos; para tener un medio sólido se debe colocar una sustancia solidificante en este caso el Agar, el cual no tiene ningún valor nutritivo sino más bien sirve para tener una buena humedad por mucho más tiempo, lo que es muy favorable para el desarrollo del hongo(Cañedo y Ames, 2004).

4.5.1 Medio de cultivo utilizado

4.5.1.1 Papa Dextrosa Agar (PDA)

Este medio de cultivo es uno de los más usados en la microbiología, debido a que nos ayuda a aislar todo tipo de hongos como *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) y *Metarhizium*, cuando el hongo es aislado directamente del suelo se recomienda acidificar utilizando ácido láctico en un 25%, también se agrega de 3 a 4 gotas de agar solidificante

para evitar el crecimiento de bacterias saprofitas. Con los mismos ingredientes, excluyendo el agar, se obtiene el medio líquido de Papa Dextrosa (PDA), muy utilizado para la preparación del inóculo en forma masiva (Cañedo y Ames, 2004).

4.5.2 Condiciones que debe tener un medio de cultivo

Se debe tener en cuenta que para que exista un crecimiento de los microorganismos el medio debe tener lo siguiente

- Contener suficientes nutrientes teniendo en cuenta los factores de crecimiento.
- Temperaturas adecuadas.
- Humedad
- pH
- Oxígeno
- Evitar los microorganismos contaminantes con ayuda de una buena asepsia (Mondino, 2009).

4.5.3 Componentes minerales

Los medios de cultivo para un buen desarrollo de microorganismos deben tener como mínimo:

- Carbono (C)
- Nitrógeno (N)
- Azufre (S)
- Fósforo (P)
- Sales inorgánicas (K,Mg,Fe,Ca) (Mondino, 2009).

4.6 Gen ITS

La región del ADN nuclear de los hongos que más se usa en la identificación genética es la región ADN mitocondrial, ya que ésta región tiene un mayor interés de estudio de la filogenia de la taxonomía de hongos, puesto que estas son las que codifican el ARNr. El ADNr mitocondrial tiene 2 genes 16S y 23S que a lo largo de su genoma tiene espacios repetidos, y el ADNr nuclear tiene muchas copias que van desde 60 hasta 220 en el género *Coprinus*.

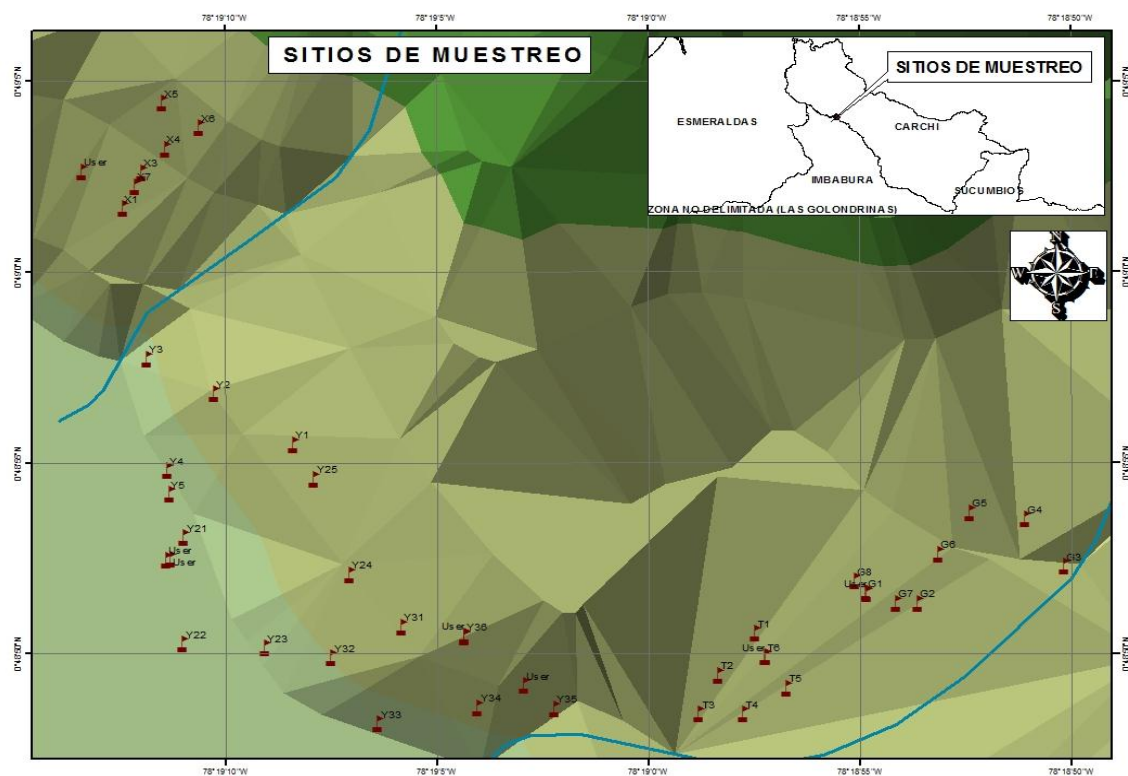


Figura 4. Sitio muestreado San Jacinto de Chinambí, San Patricio de Chinambí y las Juntas. Fuente. (Mejía 2017).

5.2 MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS

5.2.1 Materiales

- Cajas Petri
- Frasco Boeco
- Probeta
- Pipeta 1-10ul
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Mechero de busmen
- Vaso de precipitación
- Puntas de 1-10ul
- Puntas de 100 – 1000ul
- Tubos de eppendorf

- Alcohol
- Algodón
- Parafilm
- Papel Aluminio
- Asa bacteriológica
- Guantes
- Mandil
- Cuaderno de apuntes
- Esferográfico
- Cámara fotográfica

5.2.2 Equipos

- Balanza Analítica ADAM ®
- Cámara de Flujo Laminar N_BIOTEK®
- Autoclave ican CLAVE
- Congelador (Thermoscientific™)
- Microcentrífuga 6000 rpm (2000 x g) 110v prism.
- Incubadora Shaking NB-205L N_BIOTEK®
- Germinadora (Thermo Scientific™)
- Vortex VX-200 Vortex Mixe
- Termociclador MULTIGEN OPTIMAX
- Cámara de Electroforesis ENDURO™ Electrophoresis
- Transiluminador ENDURO™ UV Transilluminator

5.2.3 Insumos

- Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 (Merck)
- Fosfato di potasio mono básico KH_2PO_4 (Merck)
- Fosfato de sodio dibásico Na_2HPO_4 (Merck)
- Cloruro de potasio KCL (Merck)
- Sulfato de magnesio heptamidrato $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck)
- Nitrato de amonio NH_4NO_3

- Neopeptone (Merck)
- Extracto de Levadura (Merck)
- Glucosa (Merck)
- Potata Dextrose Agar (Merck)
- Erythrosin B (Aldrich)
- Choramphenicol (Sigma)
- Cycloheximide (Sigma)
- Streptomycin sulfate salt (Sigma - Aldrich)
- TAE 1x (Invitrogen)
- Agarosa (Promega)
- Lonza
- Green MM (Master Mix)
- Primers (Thermo Scientific™)
- Proteinasa K (Thermo Scientific™)
- RnasaA(Thermo Scientific™)
- PureLink Genomic Digestión (Thermo Scientific™)
- PureLink Genomic Lisis (Thermo Scientific™)
- PureLink Genomic Buffers 1 (Thermo Scientific™)
- PureLink Genomic Buffers 2 (Thermo Scientific™)
- PureLink Genomic Elución (Thermo Scientific™)
- Etanol
- Agua destilada esterelizada

5.2.4 Metodología

El objetivo de la investigación fue caracterizar molecularmente el hongo *Metarhizium ssp*, con la finalidad de clasificar morfológicamente a través de técnicas moleculares, obteniendo como resultado cepas caracterizadas por morfología con ayuda de la secuencia del gen ITS ADNr (Recalde, Aminael, y Rodríguez, 2017).

El uso de herramientas de caracterización molecular se ha incrementado, debido a que estas técnicas se basan en la amplificación de una porción del ADN y se clasifican según su resolución taxonómica (Vargas, *et al.*, 2015).

5.3 METODOLOGÍA PARA LA FASE DE CAMPO Y LABORATORIO.

5.3.1 Preparación del Ensayo

5.3.1.1 Fase de Campo

Para la identificación del hongo *Metarhizium spp* se procedió al muestreo de suelo, el cual se lo realizó en la provincia del Carchi, cantón Mira, en la parroquia Jijón y Caamaño, en los sectores de San Jacinto y San Patricio de Chinambí así como en el cantón Espejo, parroquia El Goaltal, en el sector las Juntas, aplicando la metodología de Flores (2005), donde el muestreo del suelo se lo realizó en forma de Zigzag en terrenos dedicados al cultivo de pasto, como alimento forrajero para el ganado, a una profundidad de 10 cm ya que esta es la más adecuada para este tipo de cultivos perennes, y se encuentra mayor cantidad de materia orgánica, donde se desarrollan favorablemente un cierto número de microorganismo como el hongo *Metarhizium spp*, se lo hizo con ayuda de un barrenador desinfectado previamente, donde, se tomó una submuestra a la profundidad antes mencionada, para luego colocar cada una de estas en bolsas de polietileno con autocierre, luego de esto se realizó una mezcla homogénea y de esta muestra se obtuvieron 200g, los mismos que se colocaron en una funda plástica de polietileno etiquetada. Este procedimiento se realizó en cada uno de los potreros seleccionados para este estudio. Las muestras obtenidas en campo se llevaron a los laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la PUCE-SI para sus respectivos análisis.

5.3.1.2 Fase de Laboratorio

5.3.1.2.1 Aislamiento del gen target

- En el laboratorio de Microbiología se realizó el pesaje de las muestras de suelo, se pesó 1g de cada muestra con la ayuda de la balanza analítica, se realizaron diluciones de suelo en tubos de ensayo, cada uno contenía 9ml de agua destilada tapados con algodón y papel aluminio, luego de esto, se llevaron al autoclave para su esterilización, luego se procedió a colocar en cada tubo 1g de suelo, donde la dilución 10^{-1} con la ayuda de una pipeta de 1-10ul, se tomó 1ml de esta muestra para la siembra en las cajas Petri, donde por cada muestra se realizó un duplicado, obteniendo un total de 48 muestras.

- En cuanto a lo que se refiere para la siembra en cajas Petri se lo realizó en la cámara de flujo laminar, las cajas Petri contenía a razón de 20ml de medio selectivo, el cual estaba conformado por: Neopeptone, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Glucosa, Agar, una vez esterilizado el medio se procedió a añadir los siguientes compuestos Erythrosin B, Chlorampfenicol, Cycloheximide, Streptomycin sulfate salt (Tabla 3).
- Para finalizar con el procedimiento del aislamiento del hongo *Metarhizium*, se selló con parafilm cada una de las cajas Petri y se llevó a la germinadora de semillas alrededor de 15 a 20 días para evaluar el crecimiento del hongo.

Tabla 3

Medio selectivo utilizado para el crecimiento del hongo Metarhizium spp

Medio Selectivo	
	1000 g/ml
Neopeptone	6 g
K_2HPO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Glucosa	10 g
KH_2PO_4	0,5 g
Agar	20 g
Cycloheximide	200 mg
Chlorampfenicol	200 mg
Erythrosin B	80 mg
Streptomycin sulfate salt	100 mg

Nota. Recuperado de “Caracterización morfológica, biológica y molecular de 20 cepas de *Metarhizium anisopliae*” Fuente. (Machado, 2013)

5.3.1.2.2 Crecimiento del micelio.

- Para el crecimiento del micelio se procedió a esterilizar 48 tubos de ensayo, mismos que contenían 9 ml de agua destilada tapados con algodón y papel aluminio, la

siembra en los tubos se realizó tomando con un asa bacteriológica un raspado de la muestra del hongo que se encontraba en cajas Petri aislado, misma que se sembró en los tubos de ensayo y se llevó a la germinadora de semillas alrededor de 15 días, para posteriormente proceder la extracción de ADN (Tabla 4).

Tabla 4

Medio Líquido para crecimiento del micelio

Medio Líquido.	
	1000 g/ml
KH ₂ PO ₄	0,36 g
Na ₂ HPO ₄	1,6 g
KCL	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,6 g
NH ₄ NO ₃	0,7 g
Extracto Levadura	5 g
Glucosa	10 g

Nota. Protocolo del Laboratorio de (Microbiología) PUCE-SI . Fuente. Castro, J. 2018 (La autora).



Figura 5. Crecimiento micelio del hongo. Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

5.3.1.2.3 Extracción de ADN

- Para empezar la caracterización molecular del hongo *Metarhizium spp*, se utilizaron cepas cultivadas en caldo nutritivo de PDA (Potata Dextrosa Agar).
- Se trabajó con el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (InvitrogenR) el cual provee 7 reactivos (Genomic Lysis/binding buffer, Genomic Digestion Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Genomic Elution Buffer, RNase A y Proteinase K) para la extracción de ADN, atendiendo al protocolo del producto (Martínez, 2012).
- Obtención del Pelet.
 - a) Tomamos 1 ml de la muestra del caldo nutritivo líquido a base de KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCL , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NH_4NO_3 , Extracto de levadura y Glucosa de los tubos de ensayo donde se encuentra el hongo *Metarhizium* y los trasparamos a tubos eppendorf con su respectivo código.
 - b) Los tubos eppendorf colocamos en la centrifuga de manera equidistante y dejamos trabajar por 5 minutos a 10 000 RPM en la centrifuga.
 - c) Una vez que sale de la centrifuga baseamos el caldo nutritivo y solo nos quedamos con el pellet esto repetimos varias veces hasta terminar con la muestra del tubo de ensayo de esta manera obtenemos más pellet.
- En el tubo de eppendorf con el pellet añadir 180ul de PureLink Genomic tampón Digestión y 20 ul de proteinasa K, llevar al Vortex por 10 segundos para que se homogenice.
- Incubar a 55°C por 1 hora y en intervalos de cada 10 minutos pasamos los tubos eppendorf en el vortex por 1 minuto.
- Añadir a los tubos de eppendorf Rnasa A llevar al vortex por 20 segundos, retiramos del vortex y dejamos a temperatura ambiente por 2 minutos.
- Añadir 200 ul de PureLink Genomic tampón lisis llevamos al vortex por 2-3 segundos.
- Añadir 200 ul de etanol y llevamos al vortex por 2-3 segundos.
- Cambiar de los tubos eppendorf a tubos con filtro.
- Llevamos a la centrifuga 1 minuto por 10 000 RPM.
- Botar el líquido que queda por debajo del filtro.

- Añadir el PureLink Genomic Lavado Buffers 1 y llevar a la centrifuga por 1 minuto a 10 000 RPM, botamos el líquido que queda debajo del filtro.
- PureLink Genomic Lavado Buffers 2 llevar a la centrifuga por 1 minuto a 10 000 RPM, botamos el líquido que queda debajo del filtro.
- Añadir PureLink Genomic tampón de Elución llevamos a la centrifuga por 1 minuto a 10 000 RPM, repetimos una vez más.

5.3.1.2.4 PCR

- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se utilizó el termociclador (Pro Flex), siguiendo el protocolo, y estableciendo la temperatura y los tiempos adecuados para este análisis.
- Para realizar el PCR se comenzó con la limpieza de la cámara de flujo laminar con alcohol.
- Para la extracción del ADN en un microtubo de 200 ul se colocó agua libre de nucleasa (Dnase, Rnase) 4,5 ul, primers F11 y R11 añadir 1 ul, posteriormente añadir Green MM 12,5 ul y por ultimo añadir el ADN 5ul en total de muestra será de 24 ul (Tabla 5).
- Sacar la temperatura media de los primer's se hizo contabilizando sus bases tanto en Adenina, Guanina, Citosina y Timina como se indica a continuación para posteriormente mandar al termociclador a esa temperatura.

Primers 1 que corresponde a F11 (GTCAGTAGCTGCAAATCCTTGAG)

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

$$T_m = 2(6 + 6) + 4(6 + 5)$$

$$T_m = 24 + 44$$

$$T_m = 68$$

Primers 2 que corresponde a R 11 (AATTAAGGGAGAGAGGCGAAG)

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

$$T_m = 2 (9 + 2) + 4(9 + 1)$$

$$T_m = 22 + 40$$

$$T_m = 62$$

Temperatura media

$$\bar{X} = \frac{68+62}{2} = 65^{\circ}\text{C}$$

- El PCR se realizó en el termociclador Multigene, Optimax de Labnet a 65° de temperatura alrededor de 2 horas. El protocolo de amplificación de ADN en el termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; luego de 35 ciclos de desnaturalización 94°C durante 30 segundos, seguido un lineamiento a 55.6°C por 45 segundos y una elongación a 72°C por 90 segundos. Posterior a este proceso se realizó una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos seguido de un alineamiento a 55.6°C por 45 segundos. Para finalizar se realizó una extensión a 72°C por 90 segundos.
- Estas muestras fueron colocadas en el Refrigerador del Laboratorio de Biotecnología a -30°C para luego ser enviadas a secuenciar a la empresa Macrogen ubicada en Corea para determinar especie de las cepas aisladas.
- Tabla 5

Extracción de ADN

Extracción de ADN	
Agua libre de nucleasas	4,5 ul
Primers 1 F11	1 ul
Primers 2 R11	1 ul
Green MM	12,5 ul
ADN	5 ul
Total muestra	24 ul

Nota. Protocolo del laboratorio de (Biotecnología) PUCE-SI. Fuente: Castro, J. 2018 (La autora).

5.3.1.2.5 Electroforesis

- Preparación del gel
- Pesar 1,5 g de agarosa.
- a) Medir 100 ml de TAE1x.
- b) Mezclamos la agarosa y TAE1x y llevamos al microondas por 30 segundos hasta ebullición luego añadir 5 ul de lonza y la mezcla colocar en la placa de gel y dejar que se condense.
- Se utilizó una micropipeta mediante la cual se cargó en el primer pocillo del gel 5µl del indicador de peso molecular DNA Ladder 100ppb, seguidamente fueron cargados a los pasillos restantes muestras de 8µl, compuestas por una mezcla de 5µl de los productos de la PCR más 1 µl de Primer F11 y 1 µl R11. Una vez colocadas las muestras se procedió a tapar la cámara de electroforesis y se colocó los electrodos en la fuente de energía. La electroforesis corrió a un voltaje de 160v (voltios) y 500 A (Amperios) durante un lapso de 120 minutos.
- Finalmente se verifico si existe presencia de ADN mediante el Transiluminador como se muestra en la figura 6.

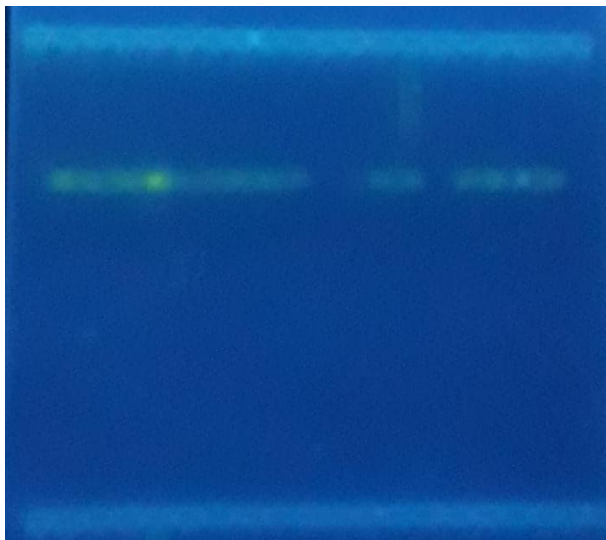


Figura 6. Electroforesis. Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Nota. En la Figura 6 nos indica la presencia de ADN en un gel de agarosa al 1%.

5.3.1.2.6 Secuencialización

- En la cámara de flujo en una caja de 96 pocillos se colocó 5 ul de ADN, 2 ul de los primer's F11 y R11 con su respectivo etiquetado (Tabla 6).
- Las muestras de la caja de 96 pocillos se enviaron a la empresa MACROGEN para la secuenciación de ADN.
- Una vez obtenidas las secuencias de ADN se alinearon con el programa estadístico BLAST para determinar la especie de hongo y su homologación, posteriormente con el programa bioinformática PRIMER 7 se efectuó los emparejamientos de las secuencias así se estableció la familiaridad de las secuencias obtenidas.

Tabla 6

Reactivos que se colocó en la secuencialización

Secuencialización	
ADN	5 ul
Primers 1 F11	1 ul
Primers 2 R11	1 ul
Total muestra	7 ul

Nota. Datos obtenidos el laboratorio de (Biotecnología) PUCE-SI Fuente: Castro, J. 2018 (La autora).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 FASE DE LABORATORIO

De las muestras de suelo que se tomaron en la provincia del Carchi cantón Mira en la parroquia Jijón y Caamaño en los sectores de San Jacinto y San Patricio de Chinambí y en el cantón Espejo, parroquia El Goaltal en el sector las Juntas. Se llegaron a identificar 4 cepas de *Metarhizium spp* presentes en los potreros de la zona en estudio las 4 cepas identificadas son: *Metarhizium* ARSEF 549, *Metarhizium* BRIP 53293, *Metarhizium* BRIP 53284 y *Metarhizium anisopliae*.

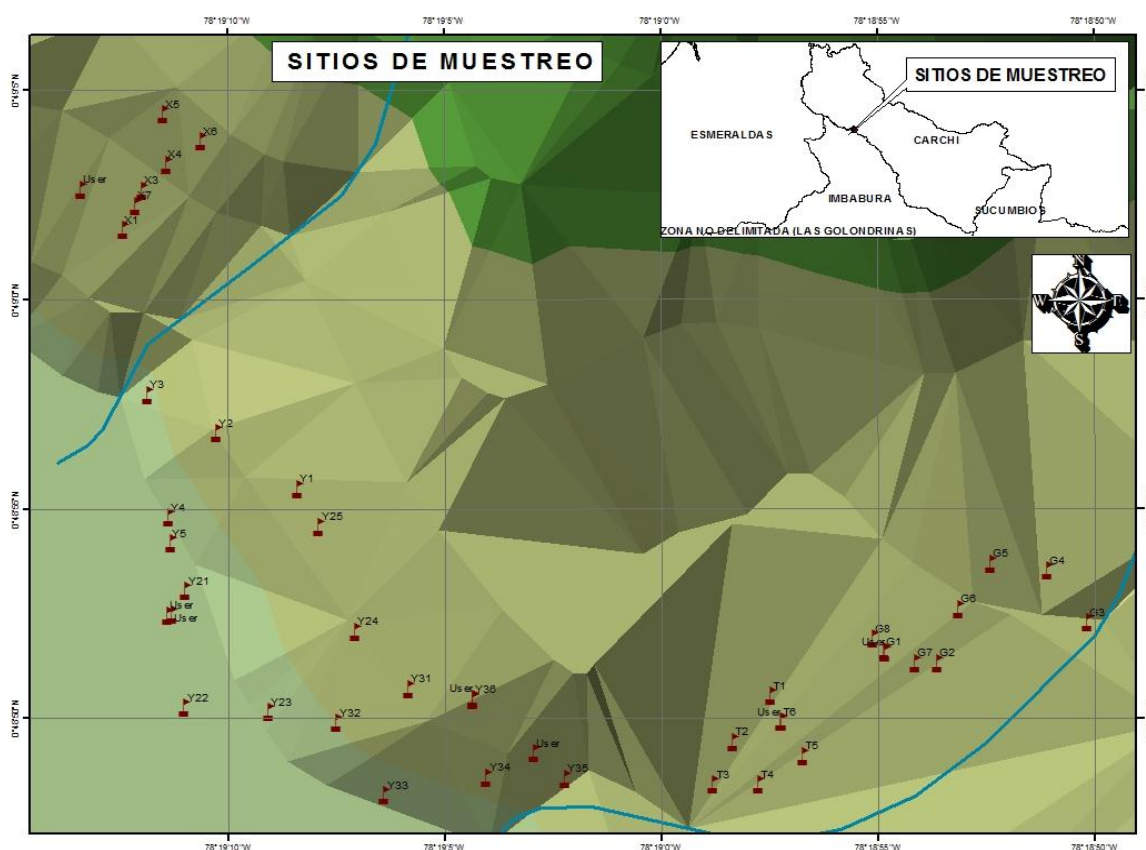


Figura 7. Sitio Muestreado. Fuente. (Mejía, 2017).

Nota. En la Figura 7 nos muestra los 48 sitios muestreados con ayuda del GPS, en la provincia del Carchi cantón Mira en la parroquia Jijón y Caamaño en los sectores de San Jacinto y San Patricio de Chinambí y en el cantón Espejo, parroquia El Goaltal en el sector las Juntas ubicado al Sur Occidente de la provincia a una escala de 1: 6000.

6.1.1 Aislamiento del gen target de diferentes cepas de *Metarhizium spp* para su caracterización molecular.

Una vez realizado el aislamiento del gen target se observó la presencia de *Metarhizium spp*, de manera visual, para corroborar la existencia de dicho hongo se procedió a la secuencialización.

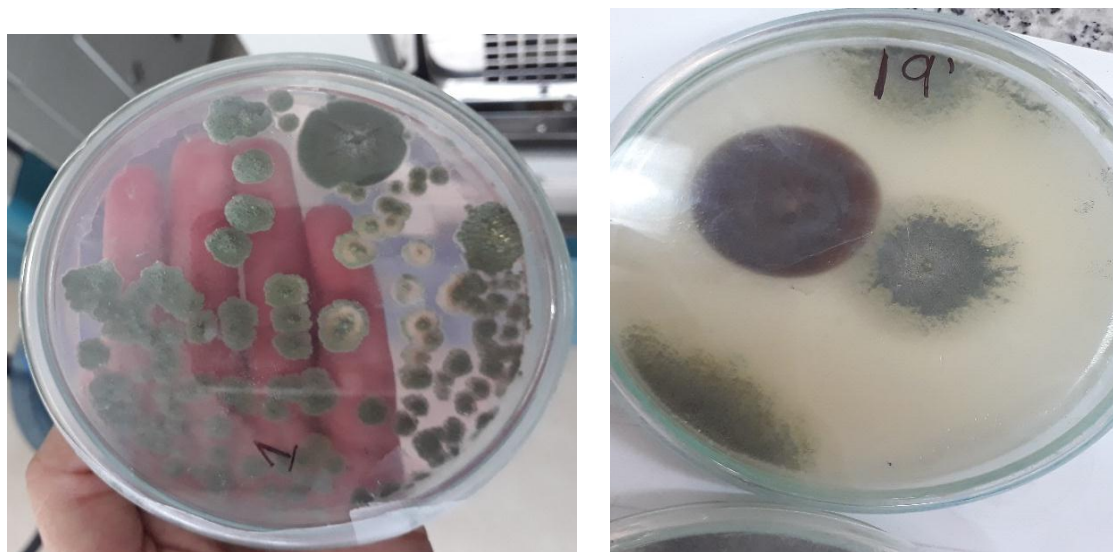


Figura 8. Aislamiento gen target. Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Nota. En la Figura 8 podemos visualizar al hongo *Metarhizium spp* en cajas Petri en Potata Dextrosa Agar (PDA), a los 15 días en la germinadora de semillas.

Para Cañedo (2004), la esterilización de equipos y materiales de laboratorio es crucial para inhibir el crecimiento de ciertos patógenos y así poder aislar organismos específicos como en este caso *Metarhizium spp*.

Al comparar datos obtenidos en la investigación de (Conchillo, *et al.*, 2006), podemos corroborar que el medio de siembra utilizado en nuestra investigación para el aislamiento del gen target fue el adecuado, obteniendo resultados similares, donde las colonias que se obtuvieron en PDA fueron de color blanco y algodonosas al inicio, pero con el transcurso del tiempo se tornaron amarillo verdoso y finalmente verde olivo oscuro.

La obtención de cepas de *Metarhizium spp*, se obtuvo en un promedio de 15 a 20 días, incubadas a 28°C, donde el medio selectivo y la técnica utilizados en nuestra investigación fueron los adecuados al comparar con datos similares que se muestran en la investigación

“Viabilidad de cepas de *Metarhizium*” realizada por López (2014), donde la germinación y crecimiento del hongo prospera en un tiempo de 20 días a una temperatura de 28°C.

En nuestra investigación la extracción de ADN se la realizó con la ayuda del protocolo de Invitrogen y para la verificación del ADN un gel de agarosa al 1% y el uso de primer's N° Accesoión AY842949 F/R F11 (GTCAGTAGCTGCAAATCCTTGAC y R11 (AATTAAGGGAGAGAGGCGAAG), este mismo protocolo como los primer's fueron utilizados en la investigación denominada “Identificación de las cepas de *Metarhizium spp*”, realizado por Machado (2013), siendo esta técnica favorable para la obtención de cepas de *Metarhizium spp*.

Comparando datos obtenidos de la investigación de López, (2014) acerca de viabilidad de la cepa de *Metarhizium anisopliae*, se puede comparar que los datos alcanzados en el trabajo realizado son factibles ya que utiliza la misma técnica en comparación con la nuestra (López, 2014) para la extracción se usa el ADN genómico, con la ayuda del micelio del hongo para obtener el pellet, y para la verificación de calidad de ADN utiliza la electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

6.1.2 Identificación de las cepas de *Metarhizium spp* mediante la secuencialización del gen target.

- Una vez aisladas y caracterizadas molecularmente las cepas de *Metarhizium spp*, se enviaron a la empresa Macrogen para su respectiva caracterización, obteniendo como resultado 4 cepas (Tabla 7).

Tabla 7

Cepas encontradas en la investigación

Nombre	Código	Tamaño (Mb)	GC Guanina y Citosina (%)	Genes	Proteína
<i>Metarhizium</i> ARSEF 549	ARSEF 549	38.5043	50.90	10891	10891
<i>Metarhizium</i> BRIP 53293	BRIP 53293	38.6725	51.40	11415	11415
<i>Metarhizium</i> BRIP 53284	BRIP 53284	38.08888	51.50	11456	11456
<i>Metarhizium anisopliae</i>	E6	38.4771	50.50	10958	100796

Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).



Figura 9. *Metarhizium anisopliae* ARSEF 549. Fuente: Macrogen.

File: 19E6HAB001_A1_premix.ab1
Sample: 19E6HAB001_A1_premix

Run Ended: 2018/8/7 22:16:8
Lane: 47

Signal G:116 A:397 C:457 T:315
Base spacing: 15.456842

1046 bases in 15893 scans

Page 1 of 2

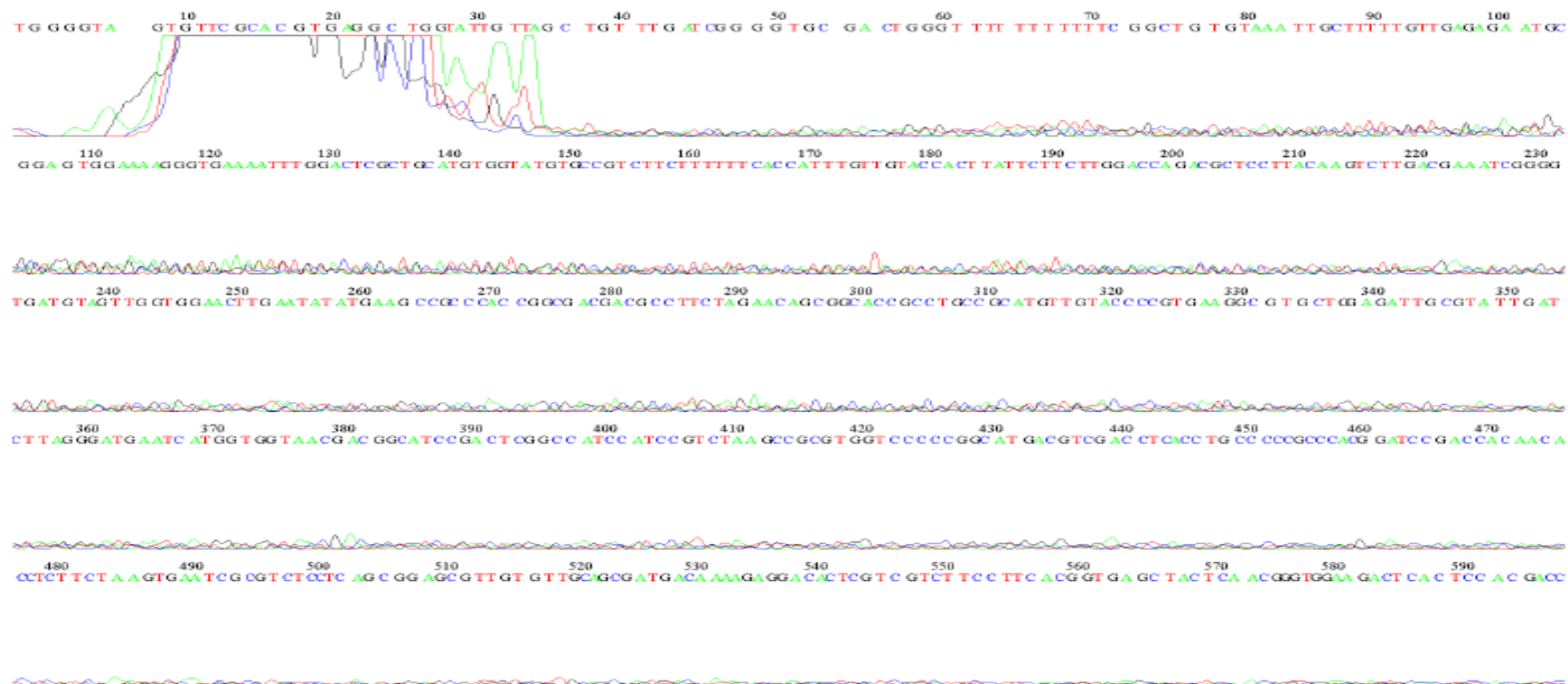


Figura 10. *Metarhizium anisopliae* BRIP 53293. Fuente: MacroGen.

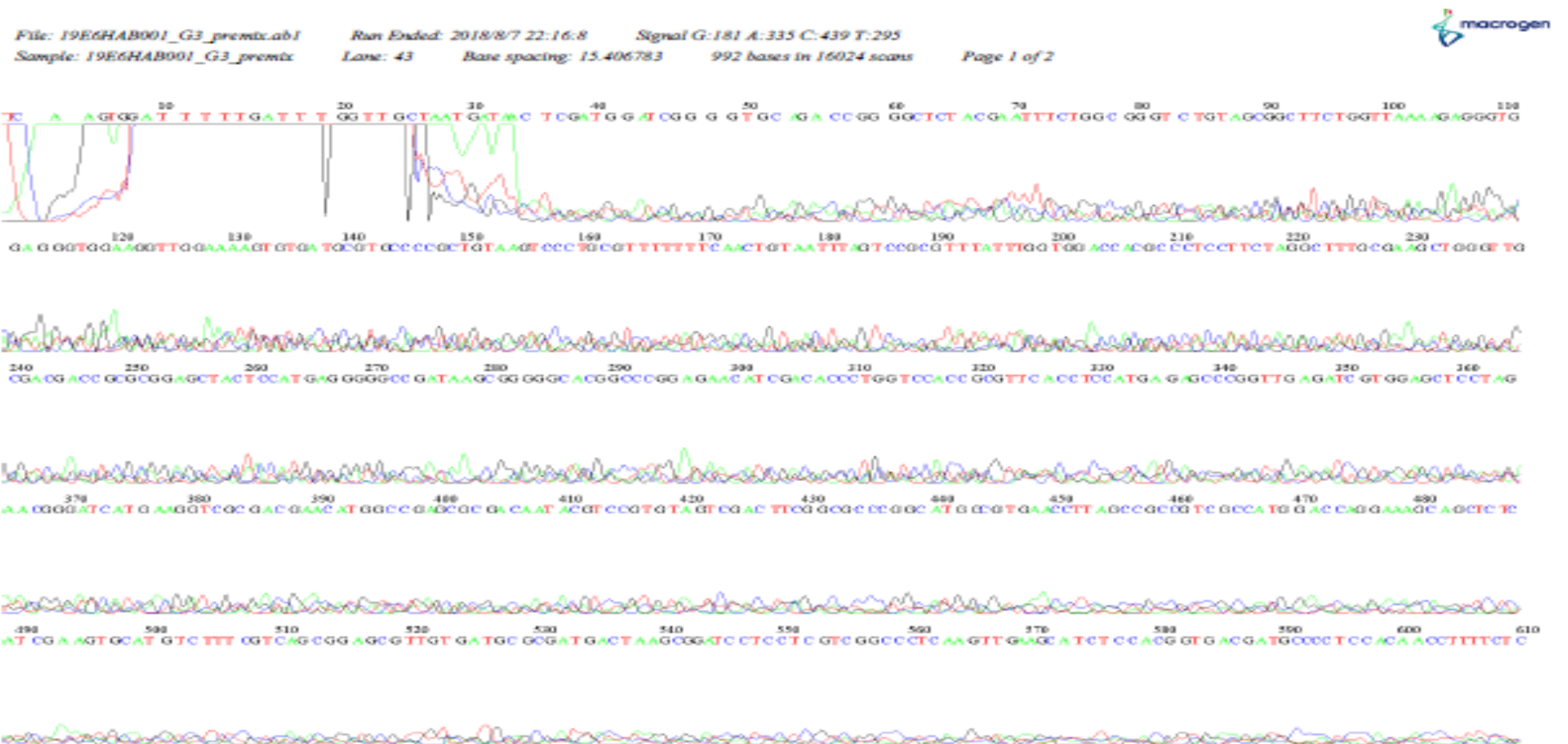


Figura 11. *Metarhizium anisopliae* BRIP 53284. Fuente. MacroGen

File: 19E6HAB001_H3_premitx.ab1 Run Ended: 2018/8/7 22:16:8 Signal G:144 A:428 C:412 T:254
 Sample: 19E6HAB001_H3_premitx Lane: 41 Base spacing: 15.451789 996 bases in 16300 scans Page 1 of 2

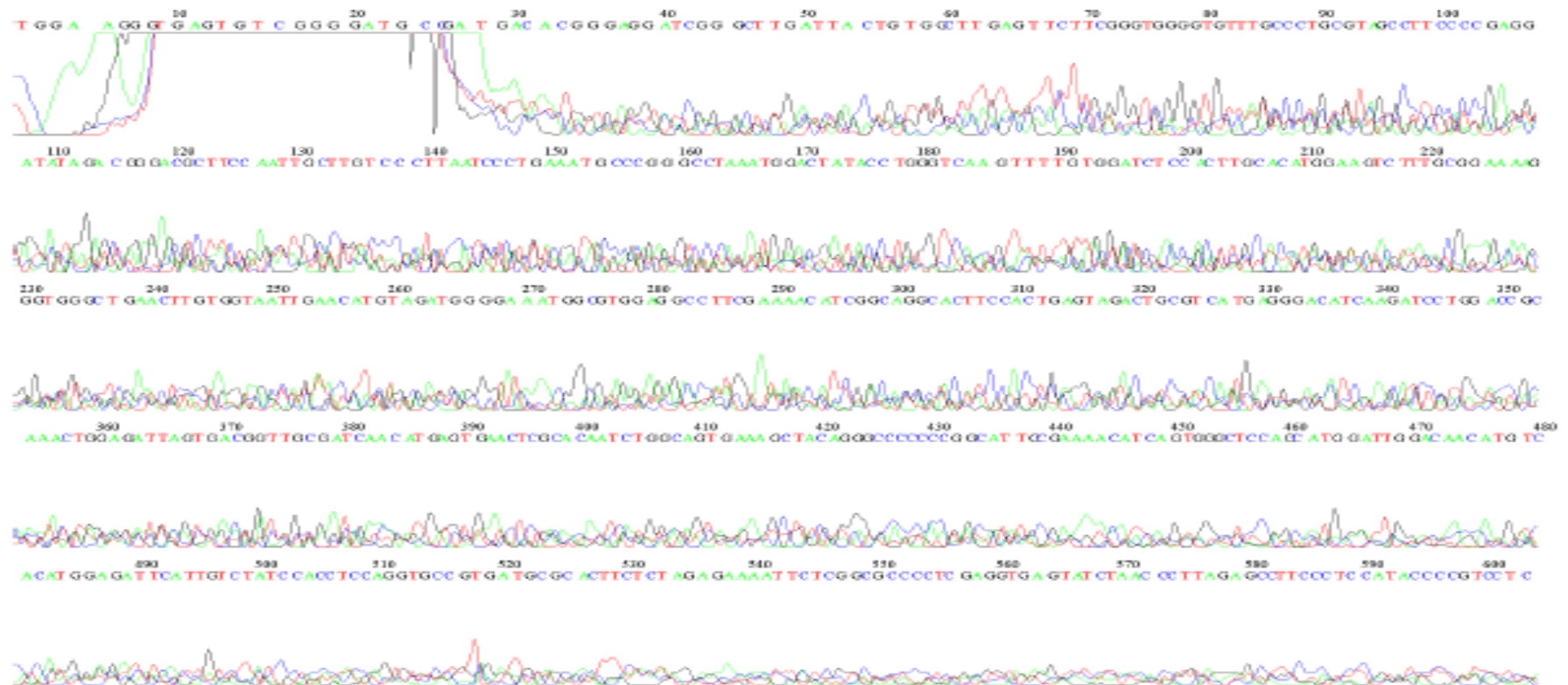


Figura 12. *Metarhizium anisopliae*. . Fuente. MacroGen

Al obtener los resultados de la secuencialización se puede concluir que existe presencia de ***Metarhizium spp***, en el suelo donde se realizó la investigación; esto se debe a que este hongo está dentro de los más frecuentes en suelo a nivel mundial, debido a su alta eficiencia y facilidad de multiplicarse (Allendes, 2007).

Las cepas identificadas en esta investigación se desarrollan naturalmente en los suelos de todo el mundo, las cuales son:

Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (Colección de cultivos de hongos entomopatógenos) (**ARSEF**) y Research of fungal bioprotection in entomology (Investigación de bioprotección de hongos en entomología) (**BRIP**)

- ✚ ***Metarhizium anisopliae* ARSEF 549** y ***Metarhizium anisopliae* BRIP 53293**, este hongo causa enfermedades a insectos de orden coleópteros, y actúa como parasitoide, por tanto, tienen ventajas como controladores biológicos (Allendes, 2007).
- ✚ ***Metarhizium anisopliae* BRIP 53284**, debido a que se presenta en el suelo sin dificultad esta cepa es ampliamente empleada como un agente biocontrolador de artrópodos en la agricultura y ganadería, atacando a una amplia gama de hospedadores. (Carrer, 2016).
- ✚ ***Metarhizium anisopliae***, ataca a un sin número de insectos en condiciones naturales causando la enfermedad conocida como *Muscardina verde*. Durante la patogénesis de hongo, sintetiza enzimas que degradan polímeros de la cutícula (lípidos, proteínas y quitinas), aprovechando los nutrientes para su desarrollo (Padilla, 2000).

En una investigación realizada por Jaramillo (2005), para el debido aislamiento de ***Metarhizium*** desde el suelo utilizó la técnica de Zig-Zag a la misma profundidad en la que realizamos en el presente trabajo, se verificó la presencia de ***Metarhizium anisopliae***, este hongo en la investigación que realizaron es un buen controlador biológico en la broca de café ***Hypothenemus hampei*** tiene como porcentaje de mortalidad de un 94%.

En una investigación realizada por Bernal, (2000) en base a caracterización molecular de variedades de ***Metarhizium anisopliae*** y ***var. majus***; se caracterizaron 51 aislamientos de los cuales encontró una variedad de ***anisopliae*** la cual fue la más común y solamente obtuvieron 4 aislamientos de variedad ***majus***. En investigaciones realizadas en China se

registraron 3 nuevas especies *Metarhizium cylindrospora*, *Metarhizium guizhouense* y *Metarhizium pingshaense*

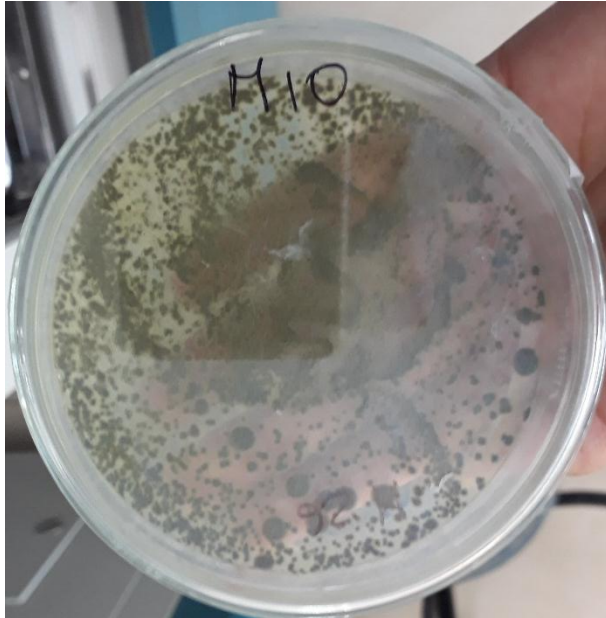


Figura 13. *Metarhizium anisopliae* ARSEF 549. Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Nota. Muestra del Sector San Patricio de Chinambí ubicado en la provincia del Carchi cantón Mira en la parroquia de Jijón.

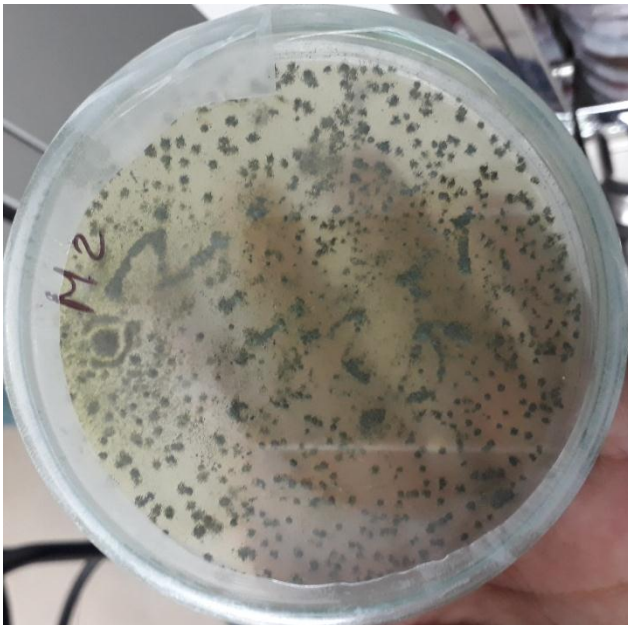


Figura 14. *Metarhizium anisopliae* BRIP 53293. Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Nota. Muestra del Sector San Patricio de Chinambí ubicado en la provincia del Carchi cantón Mira en la parroquia de Jijón.

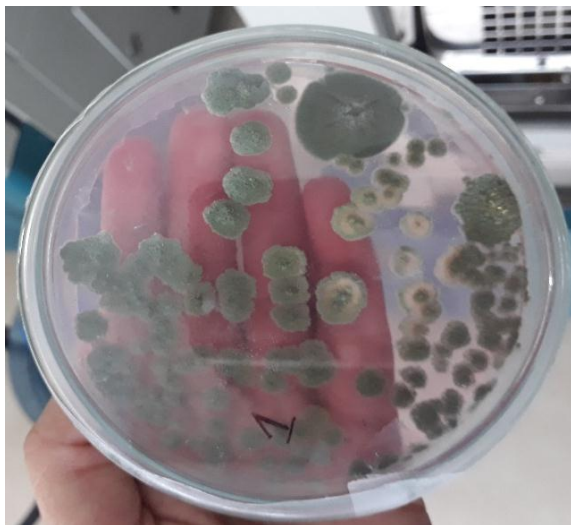


Figura 15. Metarhizium anisopliae BRIP 53284. Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Nota. Muestra del Sector las Juntas ubicado en el cantón Espejo parroquia El Goaltal



Figura 16. Metarhizium anisopliae. Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Nota. Muestra del Sector San Patricio de Chinambí ubicado en la provincia del Carchi cantón Mira en la parroquia de Jijón.

Resultados de la Socialización

La socialización de esta investigación se realizó en el Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, Al curso y personas interesadas en donde se dio a conocer la importancia del hongo *Metarhizium spp.*

A los participantes de la socialización se realizó una encuesta para evaluar el nivel de interés, de la investigación. La encuesta consta de nueve preguntas las cuales son evaluadas al 100%.

Pregunta 1. ¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?

La Figura 17 nos indica el resultado de la pregunta 1 donde un 92% muy alto de las personas encuestadas consideran que el lugar donde se realizó la socialización tiene las comodidades necesarias y un 8% alto.

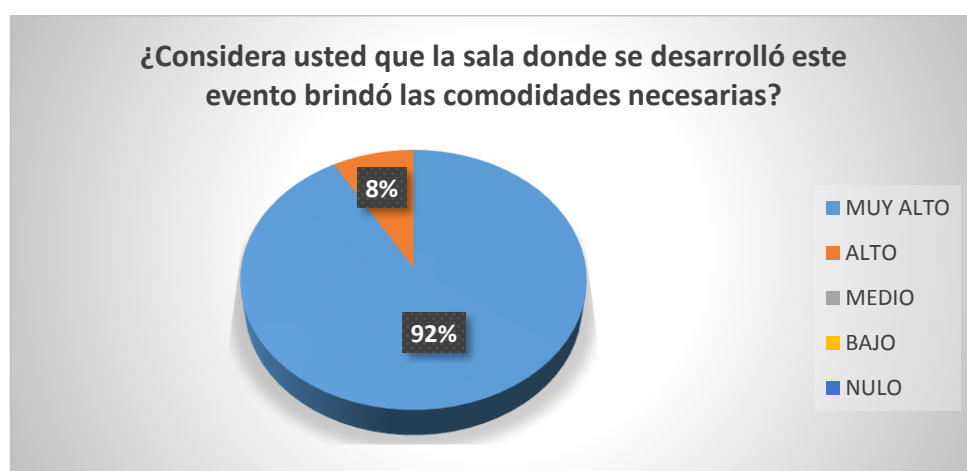


Figura 17. Tabulación pregunta 1. ¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Pregunta 2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?

En la Figura 18 nos indica el resultado de la pregunta 2, en donde el 92 % de los asistentes consideran muy alto que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado; mientras que el 25 % lo considera alto.



Figura 18. Tabulación pregunta 2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado? Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Pregunta 3. ¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema?

En la Figura 19 nos indica el resultado de la pregunta 3, en donde el 100 % de los asistentes consideran muy alto que el expositor mostró dominio del tema.



Figura 19. Tabulación pregunta 3. ¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema? Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Pregunta 4. ¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?

En la Figura 20 nos indica el resultado de la pregunta 4, en donde el 75% de los asistentes consideran muy alto que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado, mientras que el 25% lo considera alto.

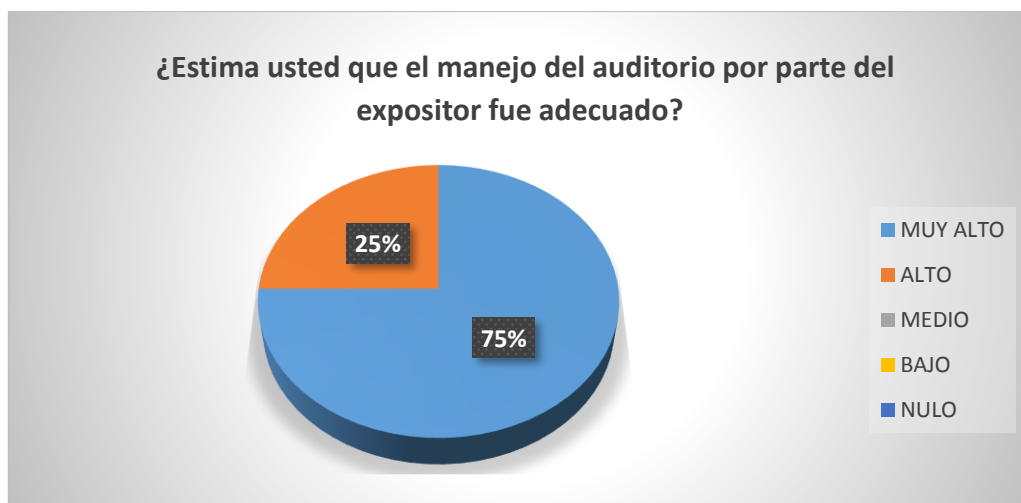


Figura 20. Tabulación pregunta 4. ¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado? Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Pregunta 5. ¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión?

En la Figura 21 nos indica el resultado de la pregunta 5, en donde el 92% de los asistentes consideran muy alto que el expositor mostro facilidad de expresión, mientras que el 8% lo considera alto.

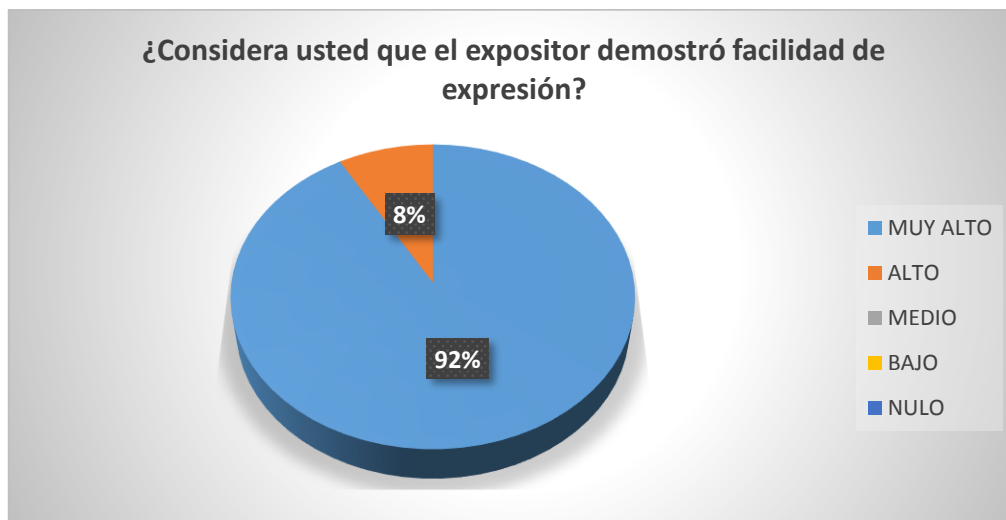


Figura 21. Tabulación pregunta 5. ¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión?

Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Pregunta 6. ¿Considera usted que el tema investigativo posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?

En la Figura 22 nos indica el resultado de la pregunta 6, en donde el 100 % de los asistentes consideran muy alto que el tema investigativo pose relevancia para un sector de la sociedad.

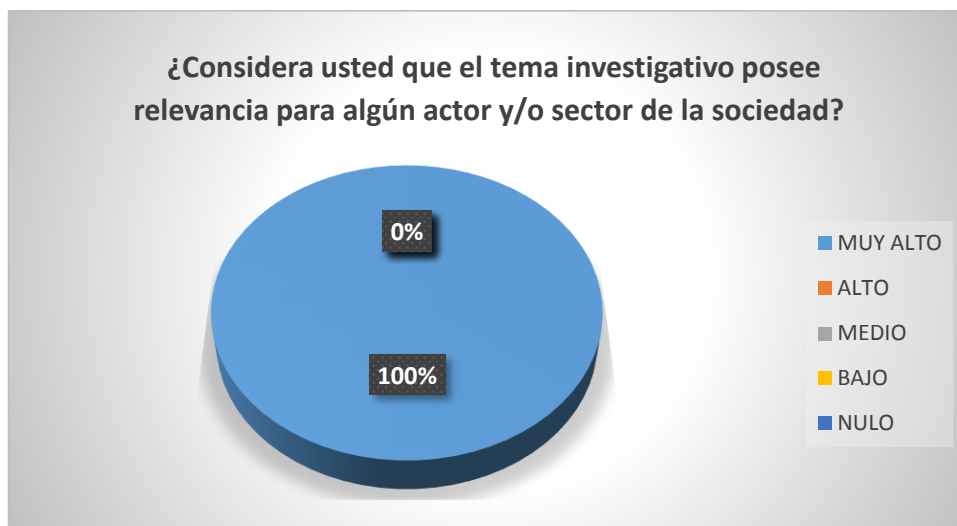


Figura 22. Tabulación pregunta 6. ¿Considera usted que el tema investigativo posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad? Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Pregunta 7. ¿Considera usted que ésta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores?

En la Figura 23 nos indica el resultado de la pregunta 7, en donde el 83% de los asistentes consideran muy alto que la investigación posee una perspectiva para estudios complementarios, mientras que el 17% lo considera alto.



Figura 23. Tabulación pregunta 7. ¿Considera usted que ésta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores? Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Pregunta 8. ¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización empresa pública o privada, comunidad o institución?

En la Figura 24 nos indica el resultado de la pregunta 8, en donde el 83% de los asistentes consideran muy alto que la investigación genera beneficios para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución, mientras que el 17% lo considera alto.

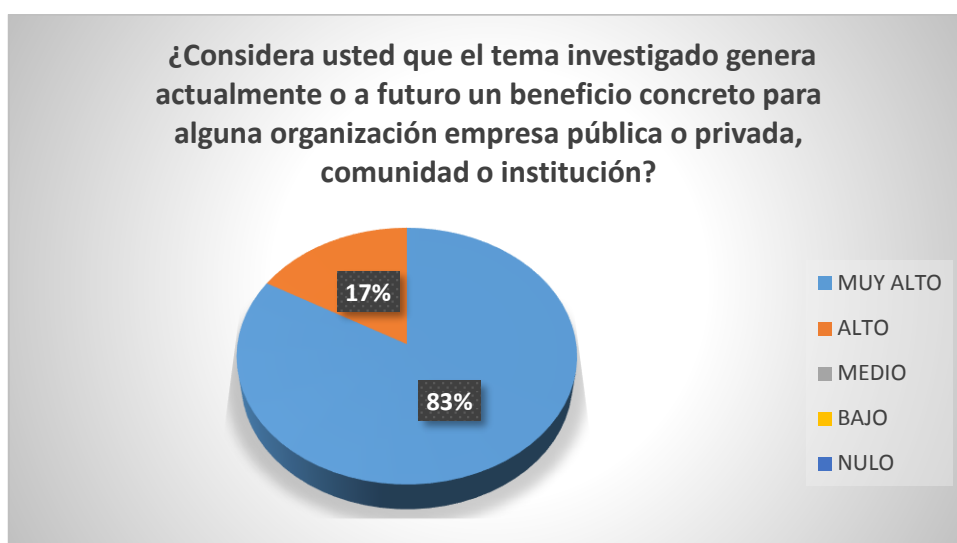


Figura 24. Tabulación pregunta 8. ¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización empresa pública o privada, comunidad o institución? Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora).

Pregunta 9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron?

La Figura 25 nos indica el resultado de la pregunta 9, en donde el 92% de los asistentes consideran muy alto que en función de los objetivos planteados se cumplieron, mientras que el 8% lo considera alto.

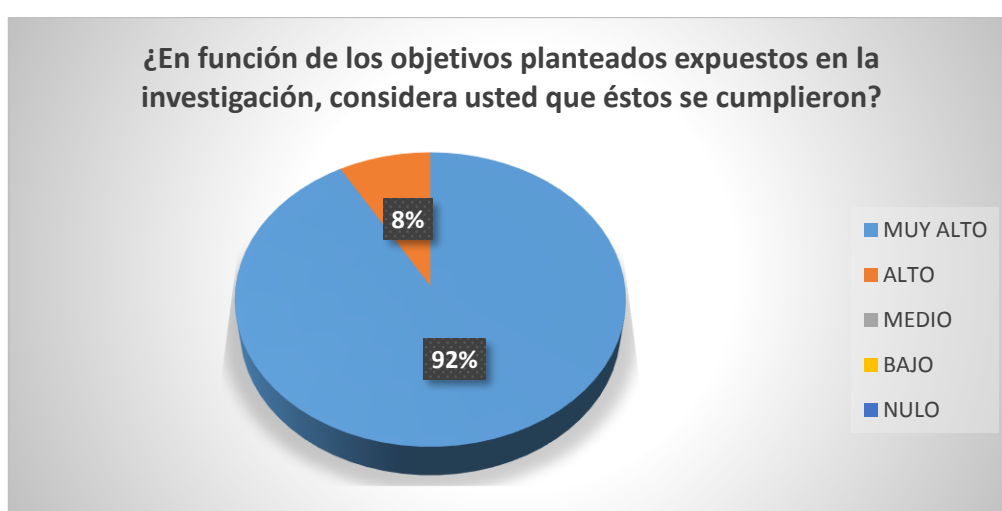


Figura 25. Tabulación pregunta 9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron? Fuente: Castro, J. 2019 (La Autora)

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- El uso del gen ITS en nuestra investigación fue fundamental para la identificación de especies como cepas del hongo *Metarhizium*, debido a que este es el gen más utilizado en diversas investigaciones en hongos, puesto que posee gran viabilidad para trabajar con genes del reino fungí.
- De los 24 aislamientos se pudieron identificar 4 hongos de las siguientes cepas *Metarhizium* ARSEF 549, *Metarhizium* BRIP 53293, *Metarhizium* BRIP 53284 y *Metarhizium anisopliae*, lo que estas se encuentra fácilmente en el suelo.
- La Caracterización molecular nos permitió conocer la especie del hongo *Metarhizium*, debido a que nos ayuda a saber el orden de las bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Citosina y Timina).
- La utilización de controladores biológicos como en este caso el hongo *Metarhizium*, hace que el grado de contaminación de los productos sea menor al grado, al del manejo producto químicos como plaguicidas, fungicidas los mismo que tienen un alto grado de toxicidad para el medio ambiente y el ser humano.
- La socialización realizada en la PUCE-SI en el laboratorio de Biotecnología fue un éxito ya que hubo participación por parte de los presentes.

7.2 RECOMENDACIONES

- El uso de marcadores moleculares en futuras investigaciones es de vital importancia debido a que se puede conocer a ciencia cierta los organismos tratados, sean estos patógenos u hospederos.
- Se recomienda realizar futuras investigaciones utilizando las cepas ***Metarhizium ansiospilae***, ***Metarhizium ARSEF 549*** y ***Metarhizium BRIP 53293***, puesto que estas cepas son fáciles de encontrar en el suelo y por su uso como controladores biológicos en artrópodos.
- Incentivar a los estudiantes a realizar investigaciones utilizando organismos entomopatógenos, a fin de ser usados como controladores biológicos, siendo organismos que se desarrollan de manera natural en el ambiente y se pueden reproducir a nivel de laboratorio.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allendes, (2007). *Evaluación de ocho cepas nativas de Metarhizium anisopliae*

var. anisopliae (Metsch) Sorokin para el control de Aleurothrixus floccosus Maskell.

Ancizar Aristizabal, Fabio. (2016). *Evolución en caracterización molecular en procesos de investigación biológica.* Revista Colombiana de Biotecnología, 18(2), 5.
<https://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61559>

Ayalew, W., Rege, J.E.O., Getahun, E., Tibbo, M. y Mamo, Y. 2003. *Delivering systematic information on indigenous animal genetic resources – the development and prospects of DAGRIS.* En Proceedings of the Deutscher Tropentag 2003. Technological and Institutional Innovations for Sustainable Rural Development. 8-10 de octubre de 2003. Göttingen, Alemania (disponible en [http:// www.tropentag.de/2003/abstracts/full/28.pdf](http://www.tropentag.de/2003/abstracts/full/28.pdf)).

Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., & Hernández, D. (2001). Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. *Dpto. de Ácaros Y Hongos Entomopatógenos, Instituto de Investigaciones En Fruticultura Tropical (IIFT). Habana.*

Bernal, M. (2000). *Caracterización patogénica y morfológica Metarhizium anisopliae.* Obtenido de Caracterización patogénica y morfológica Metarhizium anisopliae: <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc051%2801%29028-040.pdf>

Brunner, H. (2004). *La PCR según Mullis Eritrocitos sanos Thermus aquaticus:* Taq polimerasa, 1–6.

Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos.* Centro Internacional de la Papa. <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org

Carrer, F. (2016). *Metarhizium BRIP 53284.* Obtenido de Metarhizium BRIP 53284: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/150723>

Carolina, A., González, M., Argaiz, D. V., Chaparro Gutiérrez, J. J., Arizala, J. A., María, L., & Ledesma, M. (2015). Aproximación al uso de hongos entomopatógenos y vacunas para el control sostenible de garrapatas en sistemas ganaderos. *Avances En L Investigación Agropecuaria*, 19(3), 55–71. Retrieved from <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2015/sept/5.pdf>.

Conchillo, A., Valencia, I., Puente, A., & Astiasarán, D. A. I. (2006). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309226444013>.

Cruz-avalos, A. M. (2009). *Aislamiento e identificación molecular de cepas de hongos entomopatógenos con actividad hacia el gusano cogollero del maíz (Spodoptera frugiperda)* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), 197–202.

DAGRIS, (2004). *Domestic Animal Genetic ResourcesInformation System* (DAGRIS). J.E.O. Rege, W. Ayalew y E. Getahun, eds. Addis Ababa. Instituto internacional de investigaciones agropecuarias.

Echeverría, B. F. (2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin*. Instituto Tecnológico de Costa Rica, 105.

FAO, (2006). *A system of integrated agricultural censuses and surveys, volume 1, World Programme for the Census of Agriculture 2010*. Statistical Development Series No. 11 <http://www.fao.org/es/ess/census/default.asp>.

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

Floria, R. (2005). *El Muestreo de los Suelos*. Obtenido de El Muestreo de los Suelos: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/muestreo_suelos.pdf

Galán Franco, L. A. (2012). *Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de las diferentes zonas citrícolas de México*, 110.

González, M. (2003). *Aislamiento, cultivo e identificación morfológica y molecular de hongos*. obtenido de aislamiento, cultivo e identificación morfológica y molecular de hongos:

<https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/II/carteles/CII-41.pdf>

Iturralde, J. (2005). *Identificación genética de hongos*. Obtenido de Identificación genética de hongos: <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias30.html>

Jaramillo, J. (2005). *Metarhizium anisopliae para el control de broca*. Obtenido de Metarhizium anisopliae para el control de broca: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v41n1/v41n1a15.pdf>

Jacquot E, D van Tuinen, S Gianinazzi, V Gianinazzi-Pearson (2000) *Monitoring species of arbuscular mycorrhizae fungi in planta and in soil by nested PCR*: application to the study of the impact of sewage sludge. Plant and Soil 226:179-188.

Leucona, (1995). *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de insectos Plaga*. Argentina 338p.

López, V. (2014). SciELO. Obtenido de SciELO: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572014000100005

Machado, A. (2013). *Caracterización morfológica, biológica y molecular de 20 cepas de Metarhizium anisopliae*”. Obtenido de Caracterización morfológica, biológica y molecular de 20 cepas de Metarhizium anisopliae”: <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25159>

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

Mondino, P. (2009). Cultivo, 1–6.

Monzón, A. (2011). *Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos*. Obtenido de Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>.

Oulevey C., Widmer F., Kölliker R., y Enkerli J.,. *An optimized microsatellite marker set for detection of Metarhizium anisopliae genotype diversity on field and regional scales*. Switzerland : Mycological Research, 2009. págs:1016-1024.

Pascale, M. (Junio de 2017). *INRA Science & Impact*. Obtenido de *INRA Science & Impact*: <http://www.inra.fr/es/Investigadores-y-estudiantes/Biotecnologia/Todas-las-noticias/Por-que-secuenciar-el-genoma>

Raúl Rodríguez Herrera. *Manual de Biología Molecular*. pp, 7,12, 15- 19. 2009. 5.- Fabián E.

Recalde, X., Aminael, R., & Rodríguez, S. (2017). *Caracterización molecular y conservación de hongos del suelo asociados con la respuesta a estrés por nitrógeno*. Molecular characterization and conservation of soil fungi associated with the stress response by nitrogen *Materiales y Métodos*, 442–447.

Rodríguez, A., Guillén, C., Valle, H., Uva, V., Segura, R., Laprade, Se., & Sandoval, J. (2010). 8. *Aspectos a considerar sobre el control biológico*. *Corbana*, 2, 2–3.

Rogério dos Santos Alves; Alex Soares de Souza, et all. (2014). *El control integrado de garrapatas (CIG) consiste en la asociación del medio ambiente y la dinámica de población de las especies de plagas-* www.ujat.mx/era 300 Rodríguez-Vivas et al. 1(3):295-308,2014 gas, utilizando una combinación de técnicas y métodos sus. *Igarss 2014*, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.

Sepúlveda, M. E., Gerding, M., & France, A. (2012). *Control de plagas con hongos entomopatógenos*. *Centro Tecnológico de Control Biológico*. Retrieved from <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/bioleche/NR37160.pdf>.

Vargas,A. P., O., Paredes,D. O., & Rivera, M. (2015). *Caracterización molecular de peptidos antimicrobianos a partir de muestras de piel de Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae), 57-65.

9 ANEXOS

Anexo 1. Equipos de Laboratorio.



Figura 26 Microcentrifuga.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 27 Vortex.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 28. Incubador.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 29. Balanza analítica.

Fuente Castro, J. 2019 (La autora).

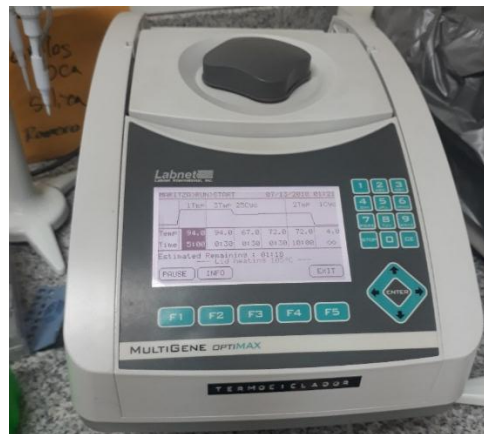


Figura 30. Termociclador.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

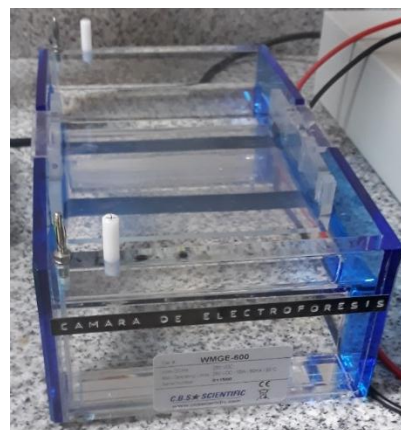


Figura 31. Cámara de electroforesis.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 32. Elaborador de gel.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 33. Germinadora.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 34. Cámara de flujo laminar.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Anexo 2. Reactivos

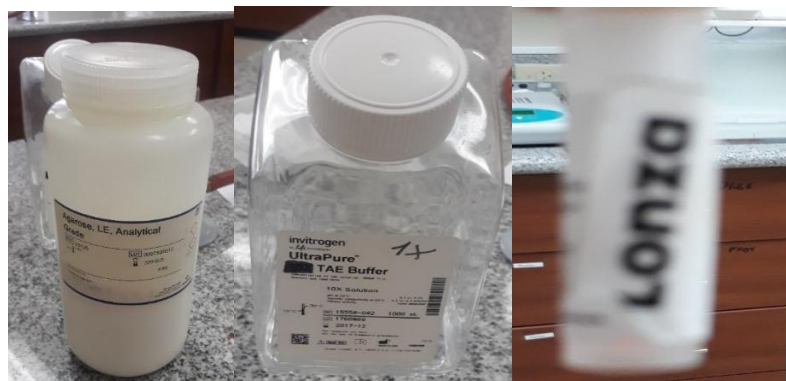


Figura 35. Reactivos para la preparación gel

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 36. Green Master Mix.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 37. Reactivos Medio Especifico.

Fuente. Castro, J 2019 (La autora).

Anexo 3. Siembra de cajas Petri.



Figura 38. Colocación de agua destilada en frasco boeco.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 39. Pesaje de muestra.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 40. Muestra de tierra

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 41 Pesaje de reactivos.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 42 Tubos de ensayo con agua destilada.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 43 Tubos de ensayo con la muestra de tierra

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 44. Dispensando el medio en cajas Petri.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 45. Siembra en cajas Petri.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Anexo 4. *Metarhizium*.



Figura 46. Hongo Metarhizium.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Anexo 5. *Extracción de ADN.*



Figura 47. Obtención del pellet.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 48. Digestión Buffer.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 49 Incubadora a 55°C.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 50. Agitación en el vortex.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

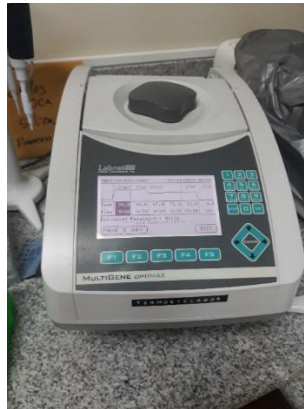


Figura 51. Muestra en el Termociclador.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

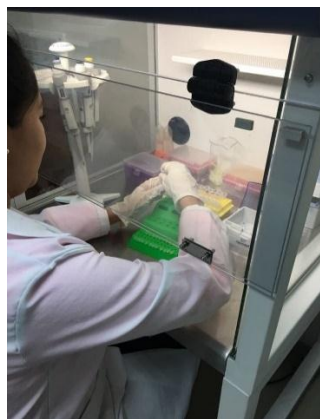


Figura 52. ADN.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Anexo 6. Electroforesis.



Figura 53. Preparación gel.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 54. Elaboración gel.

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

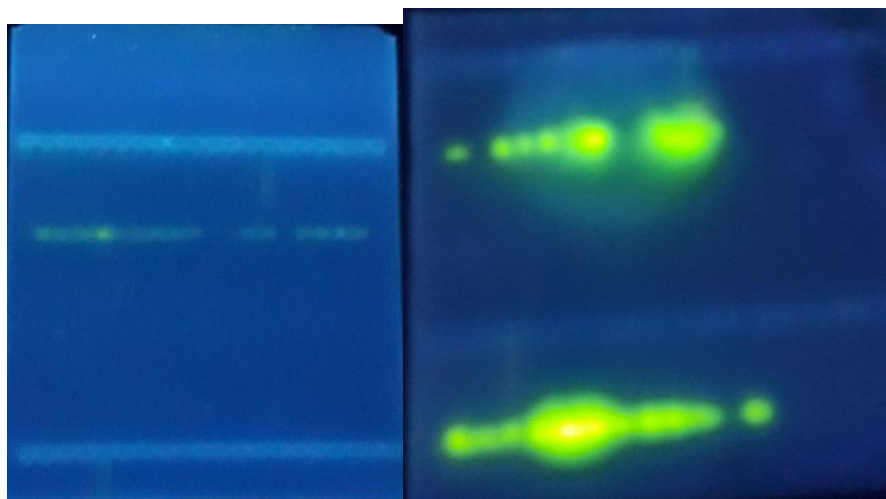


Figura 55. Presencia de ADN

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

Anexo 7. Invitación Socialización.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Le extienden la más cordial Invitación a la socialización del trabajo de investigación:

"Caracterización molecular del hongo Metarhizium spp"

cuyo autor es la señorita JOHANA ALEXANDRA CASTRO ARMAS, de la carrera de AGROPECUARIA

Fecha: 31 de Octubre del 2018

Lugar: Laboratorio de Biotecnología PUCE-SI

Hora: 09: 00 am

Figura 56. Invitación.

Fuente:Castro, J. 2019 (La autora)..

Anexo 8. Socialización.

Pontificia Universidad Católica del Ecuador
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
SEDE DE INVESTIGACIÓN IBARRA

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El presente es un instrumento de evaluación de la socialización de la investigación, el cual debe ser llenado por el investigador o investigador(a) antes de la socialización de la investigación.

Nombre: JOHANA ALEXANDRA CASTRO ARMAS
Carrera: AGROPECUARIA
Institución: PUCE-SI

NOTA IMPORTANTE: Con base a la siguiente escala evaluar la socialización de la investigación.

5: MUY ALTO / 4: ALTO / 3: MEDIO / 2: BAJO / 1: MUY BAJO

ÍTEM	5	4	3	2	1
1. ¿Considera usted que la tesis donde se desarrolla este evento cubre los contenidos necesarios?					
2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					
3. ¿Considera usted que el lenguaje usado durante la tesis?					
4. ¿Considera usted que el material de auditorio por parte del expositor fue adecuado?					
5. ¿Considera usted que el Expositor demostró dominio de la exposición?					
6. ¿Considera usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					
7. ¿Considera usted que esta investigación genera perspectivas para estudios complementarios posteriores?					
8. ¿Considera usted que el tema investigado genera conocimientos o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					
9. ¿En función de los objetivos planteados en la investigación, considera usted que estos se cumplieron?					

Demuestra un alto dominio del tema y un uso de material claro y conciso al tema tratado.

¿Considera usted que esta investigación genera perspectivas para estudios complementarios posteriores?

¿Considera usted que el tema investigado genera conocimientos o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?

¿En función de los objetivos planteados en la investigación, considera usted que estos se cumplieron?

INSTITUCIÓN Y ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO: ECA - PUCE-SI

Figura 57. Encuesta..

Fuente: Castro, J. 2019 (La autora).

NOMBRE DEL EXPONENTE	CARRERA	FECHA	NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCIÓN A LA QUE PERTENECE	FIRMA
Johanna Galán				100418420-6	E.C.P.A.	[Signature]
Isabel Arango				100418420-6	E.C.A.	[Signature]
Lucy Beltrán Salazar				10073187901	E.C.A.	[Signature]
María Chacón				10060044078	E.C.P.A.	[Signature]
Olivia Sanguino				100418420-6	E.C.A.	[Signature]
Geidy Estro				10073187901	E.C.A.	[Signature]
Geidy Estro				10060044078	E.C.A.	[Signature]
Geidy Estro				100418420-6	E.C.A.	[Signature]
Isabel Arango				10073187901	E.C.A.	[Signature]
Isabel Arango				10060044078	E.C.A.	[Signature]
Isabel Arango				100418420-6	E.C.A.	[Signature]

Figura 58. Lista participantes.

Fuente:Castro, J. 2019 (La autora).



Figura 59. Socialización.

Fuente:Castro, J. 2019 (La autora).