



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía -Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

**Actividad enzimática e insecticida de seis cepas nativas
de *Metarhizium* spp para el control de *Aegorhinus
superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae)**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas
mención en Producción Vegetal

MARIA ESPERANZA SEPÚLVEDA SANHUEZA
CHILLAN-CHILE
2015

Profesor Guía: Marisol Vargas Concha
Dpto. de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción



ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INSECTICIDA DE SEIS CEPAS NATIVAS DE *Metarhizium*
spp PARA EL CONTROL DE *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae)

Aprobada por:

Prof. Marisol Vargas Concha

Ing. Agrónomo, Dr. Cs.

Profesora Guía

Prof. Macarena Gerding González

Ing. Agrónomo, Ph. D.

Evaluadora Interna

Prof. Ricardo Ceballos Cabezas

Ing. Forestal, Dr. Cs.

Evaluador Externo

Prof. Inés Figueroa Cares

Ing. Agrónomo, Dr. Cs.

Directora de Programa



Esta tesis ha sido realizada con el financiamiento de una beca de Postgrado de CONICYT y de INNOVA BIO BIO a través de la Línea para apoyar la realización de tesis de Pre y Post grado, 12.273-EM.TES.





*a mi amado hijo
Benjamín*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme, darme la oportunidad de alcanzar mis metas, y por poner mi camino a las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A mi hijo Benjamín, mi principal motivación, por su inmenso amor, por ser mi pequeño compañero y por permitirme sacrificar nuestras horas juntos para poder dedicarme a mis estudios.

A mis profesores:

A la Dra. Marisol Vargas por sus transmitirme sus conocimientos, por su dedicación, por alentarme en los momentos difíciles, por otorgarme su confianza y su amistad.

A la Dra. Macarena Gerding por su entusiasmo y buena disposición para ayudarme con la realización del análisis filogenético.

Al Dr. Ricardo Ceballos, por su paciencia al guiarme en los análisis estadísticos, por el tiempo dedicado y sus valiosos aportes a esta tesis.

A las Dras. Silvana Vero y Ana María Cantera, de la Universidad de la República, de Uruguay, por su desinteresada ayuda y por recibirme en sus respectivos laboratorios para aprender acerca de cuantificación de enzimas.

A la Dra. Natalí Fernández por su apoyo con la cuantificación de destruxina, por sus enseñanzas y buen humor.

A INIA, por permitirme realizar este desafío, en especial a los Sres. Rodrigo Avilés y Álvaro Vega, y al staff de Producción de Hongos Entomopatógenos.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional, en especial a mi madre, por enseñarme a ser perseverante, por acompañarme en las dificultades y celebrar mis triunfos.

A mis amigas y amigos, que siempre estuvieron alentándome a seguir adelante, brindándome su cariño y apoyo. A mis compañeros de Magister, por todos los buenos momentos compartidos, por las horas de estudios y de conversaciones entretenidas.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron, directa o indirectamente en la realización de este trabajo, por la paciencia, el ánimo y sus valiosos aportes.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
BIBLIOGRAFÍA	7
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
CAPITULO 1	
MOLECULAR, MORPHOLOGICAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF SIX STRAINS OF <i>Metarhizium spp</i> (DEUTEROMYCOTINA:HYPHOMYCETES) FOR THE CONTROL OF <i>Aegorhinus superciliosus</i> (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)	12
1. 1 Abstract	13
1.2 Introduction	14
1.3 Materials and methods	15
1.4 Results and discussion	17
1.5 Conclusions	20
1.6 Literature cited	21
CAPITULO 2	
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INSECTICIDA DE DEIS CEPAS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> PARA EL CONTROL DE <i>Aegorhinus superciliosus</i> (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)	30
2.1 Resumen	31
2.2 Introducción	32
2.3 Materiales y métodos	34
2.4 Resultados y discusión	37

2.5. Conclusiones	40
2.6 Literatura Citada	41
CONCLUSIONES GENERALES	48



ÍNDICE DE TABLAS

Table 1.1: Size of the conidia of the six strains of *M. anisopliae* grown in Potato Dextrose Agar after 14 days of incubation 25

Table 1.2: Mortality of adults of *Aegorhinus superciliosus* inoculated with different strains of *Metarhizium anisopliae*. 25

Tabla 2.1: Promedio de la actividad enzimática (U mg^{-1}) (\pm desviación estandar) de seis cepas de *Metarhizium anisopliae* durante 20 días de incubación. 46

Tabla 2.2: Producción de destruxina A por seis cepas de *Metarhizium anisopliae* después de 7 días de incubación. 47



ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1.1: PCR products amplified with ITS1-ITS4 primers from six strains of *Metarhizium spp.* 26

Figure 1.2: Neighbor joining phylogenetic tree based on ITS-5.8S rDNA gene sequencing of six strains of *Metarhizium spp.* 27

Figure 1.3: Morphology of the conidia and of the colonies of six strains of *Metarhizium anisopliae* in different growth media after 14 days from the inoculation. 28

Figure 1.4: Radial growth of six strains of *Metarhizium anisopliae* grown in different solid media. 29

Figura 2.1: Mortalidad acumulada de adultos de *Aegorhinus superciliosus* inoculados con distintas concentraciones de destruxina A 47



RESUMEN

El cabrito de la frambuesa (*Aegorhinus superciliosus*) es una importante plaga en arándano (*Vaccinium corymbosum*) y otros frutales menores. Para el control de este insecto se ha evaluado el uso de hongos entomopatógenos como *Metarhizium* spp., sin embargo se ha observado variabilidad entre las distintas cepas de este microorganismo en cuanto a su patogenicidad hacia determinados insectos hospederos, así como también en su crecimiento, actividad enzimática y producción de toxinas. El objetivo de esta investigación fue caracterizar seis cepas de *Metarhizium* spp. promisorias para el control de *A. superciliosus*. Las cepas evaluadas fueron QuM173c; Qu-M363; Qu-M171a; Qu-M156a; Qu-M421, y Qu-M430 pertenecientes a la colección chilena de microorganismos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias. La caracterización molecular se realizó secuenciando la región ITS (Internal Transcribed Spacers, ITS-5.8S rDNA). La morfología de las conidias fue evaluada mediante microscopía electrónica, mientras que el crecimiento de las cepas fue evaluado en cuatro medios de cultivo: agar papa dextrosa (PDA), agar sabouraud (SDA), agar enriquecido con larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (GA) y agar enriquecido con adultos de *A. superciliosus* (AA). La patogenicidad de las cepas fue analizada en base a la mortalidad de adultos de *A. superciliosus* inoculados con conidias. Lipasas, proteasas y quitinasas fueron cuantificadas a partir de cultivos líquidos mediante métodos colorimétricos utilizando como sustratos α -nitrofenil butirato, azocaseína y α -nitrofenil N-acetil glucosamidina, respectivamente. La extracción y cuantificación de destruxina A fue realizada a partir de cultivos líquidos y evaluados mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Finalmente, se evaluó la mortalidad de adultos de *A. superciliosus* inoculados con 0; 0.1; 1, 10 y 100 mgL⁻¹ de destruxina A.

La secuenciación de la región ITS-5.8S rDNA y el análisis filogenético indicó que las cepas corresponden a *M. anisopliae* var *anisopliae*, excepto Qu-M171a, que se encontraría en el mismo clado que *M. anisopliae* var *lepidiotum*. Las cepas poseen conidias con un largo promedio de 5,09 μ m, y un ancho promedio de 1,92 μ m, valores que coinciden con los descritos para *M. anisopliae*. Se observaron diferencias en el crecimiento de cada cepa en los distintos medios de cultivo ($p < 0.05$), así como también entre los medios de cultivo utilizados ($p < 0.05$). El mayor crecimiento se alcanzó con el medio GA, mientras que el menor crecimiento se obtuvo en el medio AA ($p < 0.05$). La prueba de patogenicidad muestra que con la cepa Qu-M430 se alcanzan niveles de mortalidad del 90% ($p < 0.05$). La producción de enzimas es dependiente de la cepa y del tiempo de incubación, la máxima producción de lipasas la alcanzaron el día 3 las cepas Qu-M363 con 67.789 U μ g⁻¹ y 63.698 U μ g⁻¹, respectivamente. La mayor actividad de proteasas la presentó la cepa Qu-

M421 con 0.173 Umg^{-1} el día 1. La actividad quitinolítica presentó su mayor actividad en la cepa Qu-M363 los días 15 y 20 (26.956 y 27.268 Umg^{-1} , respectivamente). Todas las cepas evaluadas producen destruxina A en concentraciones que varían entre 818.02 y 0.2 mgL^{-1} . La mortalidad de *A. superciliosus* alcanzó el 100% a los 4 días post aplicación a una concentración de 100 mgL^{-1} de destruxina A. Los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática y la producción de toxinas son dependientes de la cepa.



INTRODUCCIÓN

La expansión de la superficie destinada al cultivo de berries en Chile, y que actualmente supera las 14.500 hectáreas (ODEPA, 2014), se ha realizado frecuentemente en zonas en las que existía previamente bosque nativo. Los huertos de berries se transformaron en un agroecosistema nuevo, originando un cambio de hábitat para insectos nativos (Parra et al., 2009), los que se han transformado en plagas provocando importantes pérdidas económicas, además del efecto negativo en las exportaciones debido a que están clasificadas como plagas cuarentenarias (Aguilera, 1995).

Tal es el caso del cabrito de la frambuesa, *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae), especie presente en Chile entre la región de El Maule y la región de Los Lagos (Arias, 2009; Zavala et al., 2011), asociada a bosques de Fagáceas (Elgueta, 1974). Sin embargo, con el inicio del cultivo de berries, *A. superciliosus* pasó a ser una de las principales plagas de frutales menores en Chile, atacando arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), frambueso (*Rubus idaeus* L.), zarzaparrilla (*Ribes nigrum* L.), Mora (*Rubus constrictus* Muell et Lef.), grosellero (*Ribes grosularia* L.) y avellano europeo (*Corylus avellana* L.) (Carrillo, 1993; Grau et al., 2001).

El daño de *A. superciliosus* es provocado principalmente por la larva, la cual se alimenta de la raíz y perfora en ella una galería hasta el cuello de la planta hospedera, pudiendo causar la muerte de ésta. Si bien el adulto ocasiona daño a frutos y brotes, en la mayoría de los casos no constituye un problema grave en los huertos afectados, y el control de la plaga se concentra en evitar que la larva provoque el daño antes señalado (Cisternas et al, 2000).

El control de *A. superciliosus* se basa en la utilización de productos químicos. En este sentido, Aguilera (1995) señala que insecticidas organofosforados no selectivos, tales como azinfos, azinfos etil y azinfos metil son efectivos para el control de adultos en condiciones semicontroladas, mientras que Carrillo (1993) recomienda la utilización de insecticidas de la familia de los carbamatos. Sin embargo, es posible utilizar estrategias de control biológico, en base al uso de hongos entomopatógenos, tales como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., los cuales son ampliamente utilizados a nivel mundial en programas de manejo integrado de plagas, contra distintas especies de insectos que causan daño a cultivos, existiendo actualmente 13 especies o sub especies de ambos hongos que han sido formulados y registrados como micoinsecticidas o micoacaricidas (De Faria y Wraight, 2007).

Metarhizium anisopliae se encuentra disperso en la naturaleza, principalmente en el suelo, como saprófito y en insectos parasitados. Fue el primer hongo entomopatógeno producido en forma masiva para su uso en control de plagas, debido a su efecto patogénico contra insectos de siete órdenes (Roberts y St. Leger, 2004). Si bien el rango de hospederos susceptibles a la acción de *M.*

anisopliae como especie es amplio, las distintas cepas pueden presentar especificidad hacia determinados hospederos (Schrank and Vanstein, 2010).

En Chile, pruebas de patogenicidad realizadas con cepas nativas de *M. anisopliae* para el control de adultos de *A. superciliosus* muestran una gran diversidad entre los aislamientos utilizados, observándose distintos efectos en la mortalidad de los insectos (France et al., 2000). Esta diversidad entre aislamientos se observa además en diferencias en el tamaño y pigmentación de las conidias, lo cual ha sido analizado mediante microscopía electrónica de barrido y en la variabilidad genética analizada mediante técnicas moleculares utilizando las regiones Espaciadores Internos Transcritos (ITS, del inglés Internal Transcribed Spacers) (Schrank and Vanstein, 2010). Características asociadas a la virulencia de los hongos entomopatógenos, tales como germinación, crecimiento vegetativo y formación de conidias también representan una fuente de variabilidad entre aislamientos, cuya expresión están fuertemente relacionada a las características nutricionales del medio de cultivo (Shah et al., 2005).

El modo de infección de un hongo entomopatógeno comienza cuando una conidia (espora asexual) entra en contacto con la cutícula de un insecto susceptible, formando un tubo germinativo que permitirá el ingreso del hongo al hemocele gracias a una serie de enzimas que degradan la cutícula del hospedero. Una vez en el interior del cuerpo del insecto, el hongo comienza a colonizar distintos órganos, liberando toxinas que inhiben el desarrollo fisiológico y que finalmente provocan la muerte del insecto (Tanada y Kaya, 1993). Del desarrollo de este ciclo dependerá del éxito de la primera etapa de infección, proceso en el cual es fundamental la degradación de la cutícula del insecto, y en el que se encuentran implicadas varias enzimas del tipo hidrolasas (Frazzon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002, Boldo *et al.*, 2009).

La cutícula de los insectos está formada por dos capas, la epicutícula y la procutícula, que en conjunto actúan como una barrera de protección ante el ataque de patógenos. La epicutícula es la capa externa, que está compuesta principalmente de cera, lípidos y proteínas, y carece de fibras de quitina; actúa como una barrera ambiental y contribuye, en menor medida, a dar forma y firmeza a la cutícula. La procutícula proporciona firmeza y estabilidad mecánica, y se divide en exocutícula y endocutícula, las cuales contienen quitina y una matriz proteica (Chen et al., 2002). De este modo, las principales enzimas que hidrolizan la cutícula del insecto corresponden a lipasas, proteasas y quitinasas, las que están condicionadas por los mecanismos de invasión del hongo y por la composición de la cutícula, existiendo una relación entre la actividad enzimática de estos microorganismos, y su patogenicidad hacia el insecto a controlar (Frazzon et al., 2000; Wang et al., 2002, Boldo et al., 2009; Ali et al., 2011).

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de las uniones éster de los lípidos, generando alcoholes y ácidos grasos; y tienen diversos roles en el proceso de infección. Una de las funciones de las enzimas lipolíticas es el aumento de la adhesión a la cutícula del insecto hospedero, mediante el incremento de las interacciones hidrofóbicas por la liberación de ácidos grasos. Estas enzimas son las primeras en actuar, puesto que los lípidos de la epicutícula son la primera barrera contra microorganismos patógenos, siendo fundamentales en la penetración y en los estados iniciales del proceso infectivo (Ali et al., 2010).

Posteriormente, actuarán las proteasas, que tienen un importante rol en el proceso infectivo de los hongos entomopatógenos, puesto que el 70% de la cutícula de los insectos corresponde a proteína. Los hongos entomopatógenos producen distintos tipos de proteasas extracelulares, tales como subtilisina, tripsina, metaloproteasas y peptidasas. La enzima Pr1, proteasa de la familia de la subtilisina es la principal enzima producida por los hongos entomopatógenos durante el proceso infectivo (Gillespie et al., 1998). Antisueros contra la proteasa Pr1 interfieren con la penetración en la cutícula del hospedero y reducen la infección, indicando que el nivel de Pr1 activa es capaz de determinar la capacidad del hongo de causar enfermedad (St. Leger et al., 1988).

La degradación de la cutícula finalizará con la acción de las enzimas quitinolíticas, que degradan la quitina en monómeros de N-acetilglucosamina, y se dividen en N-acetilglucosaminidasas y quitinasas. Las primeras catalizan la liberación de monómeros de N-acetilglucosamina desde dímeros o desde multímeros no reducidos, mientras que las quitinasas pueden ser clasificadas en endoquitinasas, que rompen el polímero de la quitina en cualquier punto, y las exoquitinasas, que lo hacen desde extremos no reducidos del polímero y liberan dímeros de N-acetilglucosamina (Seidl, 2008). La gran mayoría de las enzimas quitinolíticas analizadas en hongos entomopatógenos corresponden a quitinasas, de las cuales existen diversos grupos, dependiendo de la existencia o no de una vinculación con carbohidratos. Considerando el gran número de quitinasas secretadas por *Metarhizium*, es probable que, además de actuar en forma directa, actúen en sinergismo con otras hidrolasas durante el proceso de infección, con el objetivo de solubilizar la cutícula del insecto, proporcionar nutrientes y permitir la penetración del hongo entomopatógeno para colonizar al insecto hospedero (Schrank y Vainstein, 2010).

La virulencia y especificidad de los aislamientos de hongos entomopatógenos depende en gran medida de la habilidad de producir este complejo enzimático, como una respuesta a la conformación específica de la cutícula de una determinada especie de insecto, siendo esta selectividad una ventaja de los hongos entomopatógenos, por lo que es necesario investigar la diversidad de estas enzimas y determinar cuál de las múltiples actividades es la más relevante en la patogenicidad (Schrank y Vainstein, 2010).

Una vez que el hongo ha degradado la cutícula del insecto y se encuentra en el hemocele, comienza la colonización y la producción de toxinas de bajo peso molecular producto del metabolismo secundario, o complejos ciclopeptidos y enzimas, de los cuales pocos compuestos han sido encontrados en insectos infectados en cantidades suficientes para explicar el desarrollo de la micosis. Una excepción es un grupo de toxinas denominadas destruxinas (Charnley, 2003).

Las destruxinas son ciclodepsipéptidos con propiedades insecticidas, antivirales, fitotóxicas e incluso anti cancerígenas. Son el tipo de metabolito secundario más frecuentemente producido por *Metarhizium anisopliae* en fermentación, y son las toxinas más exhaustivamente estudiadas de los hongos entomopatógenos, consideradas un importante factor de virulencia, que acelera la muerte de insectos infectados (Schrank y Vainstein, 2010). Existen más de 38 destruxinas, divididas químicamente en cinco grupos, denominados destruxinas A, B, C, D y E (Pedras et al., 2002), siendo las destruxinas de los grupos A, B y E las que han mostrado actividad insecticida (Thomsen y Eilenberg, 2000). Estas toxinas ejercen un importante rol en el debilitamiento del sistema inmunológico, daño al sistema muscular y tubos de Malphigi, afectando la excreción y dificultando la movilidad, alterando los mecanismos de defensa comportamental (Kershaw et al., 1999; Pal et al., 2007). Usualmente los insectos infectados buscan lugares con altas temperaturas, con el objetivo de aumentar la temperatura corporal y de esa manera inhibir el desarrollo de la infección provocada por el microorganismo (Elliot et al., 2002). Por lo tanto, una reducción en la movilidad del hospedero podría afectar sus mecanismos de defensa comportamental. En efecto, aislamientos de *Metarhizium* que producen mayores cantidades de destruxinas son más virulentos (Sree et al., 2008).

En *M. anisopliae* se ha observado que existe una gran variabilidad intraespecífica, incluso entre aislamientos provenientes de una misma área geográfica, en cuanto a características morfológicas, adaptación a condiciones ambientales, actividad catalítica de este complejo enzimático, y producción de toxinas, dando lugar a aislamientos con distintos niveles de patogenicidad y virulencia (Bridge et al., 1997; Tigano-Milani et al., 1994; Wang et al., 2002).

En Chile, se han llevado a cabo diversos estudios, cuyos resultados demostraron distintos niveles de patogenicidad entre aislamientos nativos de *M. anisopliae* y permitieron seleccionar aquellos con los que se alcanzó la mayor mortalidad hacia una plaga de importancia económica, como es *Aegorhinus superciliosus* (France et al., 2000; Parra et al., 2009). Tales resultados podrían deberse a la variabilidad genética descrita para *M. anisopliae* lo que a su vez podría traducirse en diferencias en la patogenicidad y la virulencia de los aislamientos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera, A 1995. Control selectivo de plagas frutales de la zona sur. Pp 141-180. En Aguilera, A., O. Andrade, J. Díaz, N. Espinoza, R. Galdamez, y H. Norambuena (eds). Seminario de Protección Vegetal. INIA Carillanca (Temuco, Chile).
2. Ali, S., Ren, S. X., Huang, Z. and Wu, J. H. 2010. Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi. Current Research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendez-Vilas (Ed).
3. Ali, S., Huang, Z., QeZang, W. and Ren, X. 2011. Production and regulation of extracellular proteases from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the presence of diamondback moth cuticle. Pakistan Journal of Zoology. 43(6):1203-1213.
4. Arias, E. 2009. Coleópteros en Chile. Ocho Libros Editores Limitada. Santiago, Chile
5. Boldo, J.T., Junges, A., Amaral, K. B., Staats, C. C., Vainstein, M.H. and Schrank, A. 2009. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. Current Genetics. 55:551-560.
6. Bridge, P. D., Prior, C., Sagbohan, J., Lomer, C. J. and Buddie, A. 1997. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locust and grasshoppers. Biodiversity and conservation. 6(2):177-189.
7. Carrillo, R. 1993. Plagas insectiles en arbustos frutales menores. Pp 63-86. En Barriga, P. y Neira, M. (Eds) Cultivos no tradicionales. Uniprint (Valdivia, Chile).
8. Charnley, A. K. 2003. Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. Advanced in Botanical Research. 40:241-321.
9. Chen, B., Peng, X., Wang, W., Zhang, J. and Zhang, R. 2002. Research on the microstructure of insect cuticle and the strength of a biomimetic preformed hole composite. Micron 33:571-574.

10. Cisternas, E., A. France, L. Devotto y M. Gerding 2000. Insectos, ácaros y enfermedades asociadas a la frambuesa. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile.
11. De Faria, M. R., and S. P Wraight. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43:237-256.
12. Elgueta, M. 1974. Una nueva especie de *Aterpinae* (Coleoptera:Curculionidae). *Revista Chilena de Entomología*. 8:133-134.
13. Elliot, S. L., Blanford, S. and Thomas, M. B. 2002. Host-pathogen interactions in a varying environmental temperature, behavioural fever and fitness. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences*. 269:1599-1607.
14. France, A., Gerding; M., Gerding, M. y Sandoval, A. 2000. Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium spp* y *Beauveria spp* en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* y *Otiorhynchus sulcatus*. *Agricultura Técnica (Chile)* 60(3):205-215.
15. Frazzon, A. P., Vaz Junior, I., Masuda, Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 94:117-125.
16. Gillespie, J., Bateman, R. and Charnley, K. 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium spp*. for the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71:128-137.
17. Grau, P., A. France, M. Gerding, A. Lavín, and A. Torres. 2001. Preliminary evaluation of hazelnut performance in Chile. *Acta Horticulturae*. 556:49-58
18. Kershaw, M. J., Moorhouse, E. R., Bateman, R., Reynolds, S. E. and Charnley, A. K. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74:213-223.
19. ODEPA 2014. Superficie de frutales por región. Oficina de estudios y políticas agrarias. Available at <http://www.odepa.cl/superficie-de-frutales-por-region-2/> (accessed August 2014).

20. Pal, S., St Leger, R. J. and Wu, L. P. 2007. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*. 282:8969-8977.
21. Parra, L., Mutis, A., Aguilera, A., Rebolledo, R. y Quiroz, A. 2009. Estado del conocimiento sobre el cabrito del frambueso (CF), *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera:Curculionidae). *Idesia (Chile)*. 27(1):57-65
22. Pedras, M. S. C., Zaharia, L. I. and Ward, D. E. 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*. 59:579-596.
23. Roberts, D. and St. Leger, R. 2004. *Metarhizium spp.*, Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. p. 1-70. In Laskin, A., J. Bennett, and G. M. Gadd. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press
24. Schrank, A. and Vainstein, M. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 56(7):1267-1274.
25. Seidl, V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*. 22(1): 36-42.
26. Sree, K. S; Padmaja, V. and Murthy, L. N. 2008. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales) against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*. 64:119:125.
27. St. Leger, R. J., Durrands, P. K., Charnley, A. K. and Cooper, R. M. 1988. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 52:285-293.
28. Tanada, Y. and Kaya, H. K. 1993. *Insect pathology*. Academic Press. New York, USA.
29. Thomsen, L. and Eilenberg, J. 2000. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera:Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera:Noctuidae) larvae from different destruxins. *Environmental Entomology*. 5:1041-1047

30. Tigano-Milani, M., Gomes, A. M.; Sobral, B. 1994. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 65:206-210.
31. Wang, C. S., Typas, M.A. y Butt, T.M. 2002. Detection and characterization of pr1 gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Federation of Europeans Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*. 213:251-255
32. Zavala, A., Elgueta, M., Abarzúa, J., Aguilera, A., Quiroz, A. and Rebolledo, R. 2011. Diversity and distribution of the *Aegorhinus* genus in the La Araucanía Region of Chile, with special reference to *A. superciliosus* and *A. nodipennis*. *Ciencia e Investigación Agraria*. 38(3):367-377



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de este estudio es:

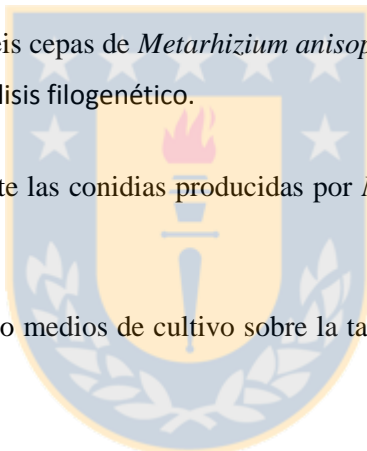
Las cepas de *Metarhizium anisopliae* Qu-M156a, Qu-M171a, Qu-M173c, Qu-M363, Qu-M421 y Qu-M430, presentan diferencias intraespecíficas en cuanto a su relación filogenética, morfología de conidias, crecimiento en distintos medios de cultivo, actividad enzimática y producción de toxinas.

Objetivo general:

Identificar molecularmente seis cepas de *Metarhizium anisopliae* y evaluar diferencias en cuanto al crecimiento vegetativo, actividad de enzimas degradadoras de la cutícula de insectos, producción de destruxina A y efecto de la aplicación de esta toxina sobre *Aegorhinus superciliosus*.

Objetivos específicos:

1. Identificar molecularmente seis cepas de *Metarhizium anisopliae*, mediante la secuenciación de la región ITS-5.8S rDNA y análisis filogenético.
2. Caracterizar morfológicamente las conidias producidas por *M. anisopliae* en medio Agar Papa Dextrosa.
3. Determinar el efecto de cuatro medios de cultivo sobre la tasa de crecimiento de seis cepas de *M. anisopliae*.
4. Evaluar la patogenicidad de seis cepas de *M. anisopliae* sobre adultos *A. superciliosus*.
5. Cuantificar la actividad enzimática y la producción de destruxina A de seis cepas de *M. anisopliae*.
6. Evaluar el efecto de la aplicación de destruxina A sobre adultos de *A. superciliosus*



CAPITULO 1

MOLECULAR, MORPHOLOGICAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF SIX STRAINS OF *Metarhizium spp* (DEUTEROMYCOTINA:HYPHOMYCETES) FOR THE CONTROL OF *Aegorhinus superciliosus* (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)

María Sepúlveda, Marisol Vargas, Macarena Gerding-González, Ricardo Ceballos, Pía Oyarzúa.

2015

Chilean Journal of Agricultural Research. Reception 23-03-2015



MOLECULAR, MORPHOLOGICAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF SIX STRAINS OF *Metarhizium spp* (DEUTEROMYCOTINA:HYPHOMYCETES) FOR THE CONTROL OF *Aegorhinus superciliosus* (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)

1. 1 Abstract

Aegorhinus superciliosus is an important pest on blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and other fruit trees. The use of entomopathogenic fungi as *Metarhizium spp* has been evaluated for the control of this insect, but variability has been observed among different strains of this microorganism. The aim of this study was to characterize six promising strains of *Metarhizium spp* for the control of *A. superciliosus*. The studied strains were QuM173c; Qu-M363; Qu-M171a; Qu-M156a; Qu-M421; and Qu-M430, all of which belonged to the Chilean Collection of Microbial Genetic Resources (ChCMGR) of the Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Molecular characterization was made by sequencing the ITS region (Internal Transcribed Spacers, ITS-5.8S rDNA). The morphology of the conidia was evaluated through scanning electron microscopy and the radial colony growth was evaluated in Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Agar enriched with larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (GA) and Agar enriched with adults of *A. superciliosus* (AA). Pathogenicity was studied based on the mortality of adults of *A. superciliosus* inoculated with conidia. Sequencing of the ITS-5.8S rDNA region indicates that the strains belong to the clade of *M. anisopliae* var *anisopliae*, except for Qu-M171a, which was identified as *M. anisopliae* var *lepidiotum*. Conidia average length for the six strains was 5.09 μm and average conidia width was 1.92 μm . Radial colony growth differences were observed between strains ($p < 0.05$) and between the different growth media that were used ($p < 0.05$). The strains exhibited the highest colony growth in the GA medium, while in the AA medium they showed the lowest ($p < 0.05$). Pathogenicity tests show that strain Qu-M430 reached a 90% mortality rate ($p < 0.05$). Results show that there is variability between the studied strains, which is expressed in their morphology, molecular characteristics and pathogenicity towards *A. superciliosus*.

Key words: *Aegorhinus superciliosus*, biological control, entomopathogen, *Metarhizium anisopliae*, radial growth, ITS regions (Internal Transcribed Spacers).

1.2 Introduction

Expansion of the area destined to berries production in Chile, which currently surpasses 14,500 hectares according to ODEPA (2014), has been primarily through native forests replacement, forcing native insects into a change of habitat (Parra et al., 2009). Thus native insects have become pests in commercial crops and orchards, causing substantial economic losses (Aguilera, 1995).

Such is the case of *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae), a species present in Chile from El Maule region to Los Lagos region (Arias, 2009; Zavala et al., 2011), closely related to Fagaceae forests (Elgueta, 1974), and currently affecting blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), raspberry (*Rubus idaeus* L.), blackcurrant (*Ribes nigrum* L.), blackberry (*Rubus constrictus* Muell et Lef.), gooseberry (*Ribes grossularia* L) and hazelnut (*Corylus avellana* L.) (Carrillo, 1993; Grau et al., 2001).

Damage by *A. superciliosus* is caused mainly by its larval stage, which feeds on roots and bores the crown of the host plant, usually causing its death. Although the adult damages fruits and sprouts, in most cases it is not a severe problem for the affected orchards (Cisternas et al., 2000).

Control of *A. superciliosus* is based on the use of chemical products on adults of this species. In this sense, Aguilera (1995) states that nonselective organophosphorus pesticides such as azinphos, azinphos-ethyl and azinphos-methyl are effective for the control of adults in semi-controlled conditions, while Carrillo (1993) recommends the utilization of pesticides of the carbamate family.

Despite this, it is possible to use biological control strategies relying on entomopathogenic fungi such as *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. which are widely used in integrated pest control programs around the world against different species of insects harmful to crops, with currently 13 species or subspecies of both fungi formulated and registered as mycopesticides or mycoacaricides (De Faria and Wraight, 2007).

M. anisopliae is found in nature, in the soil, as saprophyte and in parasitized hosts. It was the first entomopathogenic fungi mass produced for its use as a pest control agent because of its pathogenic effect towards seven different orders of insects (Roberts and St. Leger, 2004).

Even if the range of hosts susceptible to the action of *M. anisopliae* as a species is wide, different strains can direct their action only to specific hosts (Schrank and Vanstein, 2010). In Chile, screening of different strains of *M. anisopliae* on Curculionid species (nombrar especies) showed a great diversity on insect mortality (France et al., 2000).

Diversity between *Metarhizium* isolates can also be expressed in morphological characteristics as size and pigmentation of the conidia (Schrank and Vanstein, 2010) and in virulence factors such as

germination, vegetative growth and formation of conidia, which are influenced by the strain of the fungi and nutritional factors of the growth media (Shah et al., 2005).

Consequently, the aim of this work was to characterize six strains of *Metarhizium* spp. from a molecular point of view, its growth in different growth media, and to evaluate the pathogenic effect of these strains on adult *Aegorhinus superciliosus*.

1.3 Materials and methods

1.3.1 Experimental material of insects and entomopathogenic fungi

Adults of *A. superciliosus* were collected from organic blueberry (*V. corymbosum* L) and blackcurrant (*R. nigrum* L) orchards of the Biobío region (36°33'47"S; 71°47'48"W) and carried to the Biological Control Technological Center (CTCB). Insects were fed with blueberry leaves and branches previously disinfected with sodium hypochlorite, and were kept individually in plastic containers at a temperature of 25°C.

Larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyreliidae) were obtained from the rearing established by CTCB.

The fungal strains belonged to the ChCMGR. Six strains of *M. anisopliae* were selected based on France et al. (2000) work: QuM173c; Qu-M363; Qu-M171a; Qu-M156a; Qu-M421, and Qu-M430, which were grown in Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at 25±2°C for 15 days to obtain inoculum for the assays.

1.3.2 Molecular characterization

The genomic DNA of the fungi was extracted from the mycelium in active growth using the methodology described by Cooke and Duncan (1997). The mycelium was homogenized in 200 µL of extraction buffer (1M Tris HCl, pH 7.5; 5M NaCl EDTA pH 8.0; 10% SDS) and then 800 µL of extraction buffer were added until completing 1 mL, 500 µL of the mixture were then transferred to an Eppendorf tube and incubated at 65°C for 35 minutes, time after which the material was homogenized again through the inversion of the tube, at 65°C for another 35 minutes. Then, the macerated product was centrifuged at 13,000 rpm for 5 minutes at 25°C. After that, 350 µL of the supernatant were transferred to a new Eppendorf tube, to which 325 µL of cold isopropanol (-20°C) were added, it was homogenized and incubated at room temperature for 14 minutes. Samples were later centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes at 25°C. The supernatant was immediately discarded

and the pellet was suspended in 500 µL of 70% ethanol. It was centrifuged at 13,000 rpm for 2 minutes at 25°C to then eliminate the ethanol. The pellet was dried in an oven at 35°C for 30 minutes, then suspended in 100 µL of water free of nuclease and finally stored at -20°C.

One micro liter of DNA was suspended in a final volume of 50 µL Polymerase Chain Reaction (PCR) reaction mixture containing 0.5 µM ITS1 (5` TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3`) primer, 0.5 µM of ITS4 (5` TCCTCCGCTTATTGATATGC 3`) primer, 0.2 µM deoxynucleotides, 1.5 mM MgCl₂ and 1x buffer, and one unit of polymerase DNA (Invitrogen). PCR conditions were: 95 °C for 7 min; 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55.5 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, as well as a final step at 72 °C for 10 min. The PCR products were separated in a 1% agarose gel with 0.5× TBE buffer (45 mM Trisborate, 1 mM EDTA, and pH 8). After electrophoresis, the gel was dyed with ethidium bromide and visualized under UV light. The PCR products were sequenced by MacroGen Inc. (Seoul, Korea). Sequence analysis results were aligned with the published full length sequences in the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) databases (NCBI, 2014) using Gen Tool Program.

Phylogenetic trees were constructed from the aligned ITS-5.8S rDNA sequence data according to the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) using Mega 5.2 Software.

1.3.3 Morphological characterization of the conidia

In order to characterize conidia, 3 pieces of 1 cm² were cut from the edges of the colonies in active growth and were deposited in test tubes with 10 mL of 2.5% glutaraldehyde as fixative, and kept at 4°C for 24 hours. Then, each sample was taken out of the glutaraldehyde, removing the excess, and washed three times with 0.1M phosphate buffer pH 7.2, to then be fixed on 1% osmium tetroxide for 12 hours. Dehydration was carried out in increasing concentrations of alcohol at 30, 50, 70, 80, 90 and 100%. The samples were then washed three times in 100% acetone and underwent critical point drying to finally make the inclusion and cuts to the sample (Vásquez y Echeverría, 2000). Each sample was observed through scanning electron microscopy (Etec, Autoscan U-1, Hayward, California, USA).

1.3.4 Radial growth of *M. anisopliae* in different media

The media used to evaluate the morphology and the radial growth of the colonies of the strains were Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Agar enriched with larvae of *G. mellonella* (*Galleria* Agar, GA: 3,6% agar p/v, 3% glucose p/v and 7% *G. mellonella* larvae p/v) and Agar enriched with adult *A. superciliosus* (*Aegorhinus* Agar, AA: 3,6% agar p/v, 3% glucose p/v and 7% adult *A. superciliosus* p/v). Insects used in the growth media were previously

macerated, filtered with nylon net and later incorporated to the growth media previous to their sterilization.

Growth media were inoculated by using a 5 mm mycelium disc from 5 days old PDA grown cultures and incubated at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 14 days (Hoe et al., 2009). Radial growth of the colonies was measured in four different points and registered daily. A completely randomized design with four replicates per treatment was used. The experiment was carried out twice, and the results were submitted to analysis of variance to determine if there was any difference between the experiments. The radial growth was expressed as a proportion of the radial growth of the first day. Accumulated radial growth data till day 14 was submitted to analysis of variance ($p < 0.05$) and the groups were separated through the Tukey's test ($p < 0.05$).

1.3.5 Pathogenicity test

In order to evaluate the pathogenic effect of the different strains on adults of *A. superciliosus*, suspensions of 1×10^7 conidia mL^{-1} were prepared, and their concentration was corroborated using microscope and hemacytometer. The control treatment consisted of distilled water and Tween 80 (0.02 % v/v). Applications were made through microsprinkling with a Potter tower (Potter, Burkard Manufacturing Co. Ltd, Rickmansworth, UK) with a pressure of 1.054 kg cm^{-2} , applying 1 mL of suspension. Later, insects were kept at 25°C with a 12:12 photoperiod.

A completely randomized design with five replicates per treatment was used. Each replicate consisted of 10 adult *A. superciliosus*, locked in adapted plastic containers. Mortality was observed daily for a period of 14 days. Dead insects were retired from the container and transferred to a wet chamber to confirm the presence of the fungi. Mortality data were corrected using square root transformation ($\sqrt{y+1/2}$) (Sokal and Rohlf, 2013) and performed an analysis of variance followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

1.4 Results and discussion

1.4.1 Molecular characterization

Amplification of the ITS-5.8S rDNA region rendered a unique product for all the isolations, of an approximate size of 550 base pairs (Figure 1.1). Phylogenetic analysis positioned all the strains as part of the species *Metarhizium anisopliae* (Figure 1.2). Strains Qu-M363, Qu-M421 and Qu-M430

proved to be very close to each other, and they were all clustered in the *M. anisopliae* var *anisopliae* clade.

Strains Qu-M173c and Qu-M156a were in the same clade, nonetheless, the genetic distance of these strains in respect to *M. anisopliae* var *anisopliae* AF135212 could suggest a new variety or subtype. Strain Qu-M171a is far from the other strains and shares the clade with *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, described by Driver et al. (2000). According to Driver et al. (2000) and Bischoff et al. (2009), this variety has been isolated from coleoptera collected only in Australia, New Zealand and adjacent islands from the Pacific, which does not coincide with the geographical origin of the strain Qu-M171a, isolated from the south of Chile.

The results show that the ITS-5.8S rDNA region allows the identification of these strains of entomopathogens at a species level, but in order to discriminate between varieties, sequencing of other conserved genes or the construction of specific primers would be necessary.

1.4.2 Morphological characterization of the conidia

The strains presented hyaline cylindrical conidia, with round edges and olive green coloring characteristic of *M. anisopliae* (Figure 1.3). The values of length conidia are different ($p < 0.05$) and vary between 4.52 and 5.54 μm to the strains Qu-M171a and Qu-M430, respectively. The strain that had the minimum width was Qu-M156a and the maximum values was observed in the strain M421 ($p < 0.05$) (Table 1.1). The values of length and width are in the range described for *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Bischoff et al., 2009; Fernandes et al., 2010). But, these results are not consistent with the molecular identification of isolate Qu-M171a, since according to Driver et al. (2000) conidia of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* have a length of between 7.3 and 10.6 μm and a width of between 3 and 4.1 μm , which is different from what was observed in this study regarding the measures of this strain (Table 1.1).

1.4.3 Radial growth of *M. anisopliae* in different media

The six strains showed different morphologic characteristics in the different growth media, but most of them formed circular colonies and a milky mycelium (Figure 1.3). Strains Qu-M173c and Qu-M171a grown in SDA and GA showed an orange-yellow background (Figure 1.3).

The mycelium texture was thin and stuck to the surface of the growth, except the strains Qu-M171a and Qu-M363 grown in AA and Qu-M156a GA. These showed a thicker, cottony mycelium (Figure 1.3). Strain Qu-M430 grown in AA presented a mycelium with thin hyphae and stuck to the surface of the growth medium (Figure 1.3). Some of the strains showed green conidia rings that covered the colony completely, as Qu-M421 grown in the four media and Qu-M171a, Qu-M363 and Qu-M430

grown in GA (Figure 1.3). It was also observed that the growth medium affects the sporulation of the different strains, though the evaluation of this characteristic was not part of the study.

Our results agree with those obtained by Hoe et al. (2009), who observed morphological differences with the addition of yeast extract to PDA and SDA.

M. anisopliae strains radial growth was evaluated as accumulated growth after 14 days from the inoculation. GA medium promoted significant radial growth in all strains ($p < 0.05$) (Figure 1.4), while AA medium showed the minimum radial growth for all evaluated strains ($p < 0.05$).

Incorporation of insects into the growth media caused dissimilar results. GA cultures were faster, forming larger colonies, compared to the growth in AA. The strain that achieved the highest growth in AA was Qu-M430 (Figure 1.4), described as pathogenic for *A. superciliosus* (France et al., 2000). González et al. (2001) point out that the integument of the insect susceptible to the action of a determined strain of the entomopathogenic fungi would provide the necessary conditions for the germination of conidia and the growth of hyphae, so its addition to the solid growth media could increase the pathogenicity of the microorganisms towards the pest. Similarly, Pedrini et al. (2007) suggest that strains of the entomopathogenic fungi adapted to cultures in media similar to the composition of the cuticle of the susceptible insect could effectively increase their virulence. Nonetheless, the need to produce enzymes to be able to use the culture media as a substrate for growth could cause that the growth rate and the size of the colonies to be inferior to those of other culture media.

The highest growth, achieved on the GA media, could be explained by the composition of the integument of the larvae of *G. mellonella*, which should contain less chitin than the media enriched with adults of *A. superciliosus*, and therefore require less enzymatic activity to hydrolyze the necessary nutrients for the growth of the fungi, since these would be more available. Freimoser et al. (2005) showed that enzymatic activity is coded by genes that would have a differential regulation depending on the cuticle of the host in which they are found; these increase the flexibility of *M. anisopliae* to respond to nutritional changes.

PDA and SDA are widely used to grow fungi, however our results showed that the radial growth of the different strains was erratic (Figure 1.2). Moreover, successive cultures of entomopathogenic fungi in these media have the disadvantage of negatively affecting virulence, increasing the lethal time and dose (Nahar et al., 2008), and decreasing the adhesion of the conidia to the cuticle of the insect (Shah et al., 2007), decreasing conidia production and their ability to tolerate UV radiation (Santoro et al., 2014).

1.4.4 Pathogenicity test

The strains showed significant differences in their pathogenicity towards *A. superciliosus* ($p < 0.05$). The most pathogenic strain was Qu-M430 (Table 1.2), reaching 90% mortality through the inoculation of adult *A. superciliosus* with conidia. This result agrees with the informed by France et al. (2000).

Some studies suggest that control of Curculionidae insect pests should be focused on egg and larval stages, since the action of the entomopathogen would be faster than when applied on adults (Gindin et al., 2006); on the other hand, applications on female adults, as in *Xylosandrus germanus* (Coleoptera: Curculionidae), would have the advantage of an effect on the next generation, resulting on smaller individuals that acquire the entomopathogenic infection (Castrillo et al., 2011).

1.5 Conclusions

Sequencing of the ITS-5.8S rDNA region allowed the identification of the strains at a species level, all of which belonged to *Metarhizium anisopliae*, but in order to identify the variety within the species it would be necessary to use specific primers. The morphological characteristics of the conidia of the studied strains coincide with those described for *M. anisopliae*. There is variability regarding their growth in different growth media and in their pathogenic effect towards *Aegorhinus superciliosus*. The PDA, SDA, GA and AA growth media are appropriate for the growth of the six strains of this study. Radial growth of the colony is faster in culture media enriched with *Galleria mellonella* larvae. It is possible to reach 90% mortality through the inoculation of adult *A. superciliosus* with conidia of *M. anisopliae* of the strain Qu-M430.

Acknowledgements

This work was supported by the Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) and the Fondo de Innovación of the Biobío region (Innova Biobío) 12.273.EM-TES.

1.6 Literature cited

1. Aguilera, A 1995. Control selectivo de plagas frutales de la zona sur. Pp 141-180. En Aguilera, A., O. Andrade, J. Díaz, N. Espinoza, R. Galdamez, y H. Norambuena (eds). Seminario de Protección Vegetal. INIA Carillanca (Temuco, Chile).
2. Ali, S., J. Wu, Z. Huang, S. Ren, and S. Cai. 2010. Media composition influences growth, enzyme activity and virulence of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitae). Pakistan Journal of Zoology. 42(4):451-459.
3. Arias, E. 2009. Coleópteros en Chile. Ocho Libros Editores Limitada. Santiago, Chile.
4. Bischoff, J., S. Rehner, and R. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101(4):512-530.
5. Carrillo, R. 1993. Plagas insectiles en arbustos frutales menores. Pp 63-86. En Barriga, P. y Neira, M. (Eds) Cultivos no tradicionales. Uniprint (Valdivia, Chile).
6. Castrillo, L., M. H. Griggs, C. M. Ranger, M. E. Reding, and J. D. Vandenberg. 2011. Virulence of commercial strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) against adult *Xylosandrus germanus* (Coleoptera: Curculionidae) and impact on brood. Biological Control. 59(2):121-126.
7. Cisternas, E., A. France, L. Devotto y M. Gerding 2000. Insectos, ácaros y enfermedades asociadas a la frambuesa. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile.
8. Cooke, D. E. L., and J. M. Duncan. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal RNA gene repeat. Mycological Research. 101(6):667-677.
9. De Faria, M. R., and S. P Wraight. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control. 43:237-256.

10. Driver, F., R. J. Milner, and J.W.H. Trueman. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 104(2):134-150.
11. Elgueta, M. 1974. Una nueva especie de *Aterpinae* (Coleoptera:Curculionidae). *Revista Chilena de Entomología*. 8:133-134.
12. Fernandes, É. K. K., C.A. Keyser, J. P. Chong, D.E.N. Rangel, M. P. Miller, and D. E. Roberts. 2010. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*. 108:115-128.
13. France, A., M. Gerding G., M. Gerding P., y A. Sandoval. 2000. Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium* spp y *Beauveria* spp en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* *Otiorhynchus sulcatus*. *Agricultura Técnica*. 60(3):205-2015.
14. Freimoser, F. M., G. Hu, and R. J. St. Leger. 2005. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology*. 151:361-371.
15. Gindin, G., S. Levski, I. Glazer, and V. Soroker. 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red pal weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*. 34(4):370-379.
16. González, M. T., A. Valencia y A. E. Bustillo. 2001. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 60:31-35.
17. Grau, P., A. France, M. Gerding, A. Lavín, and A. Torres. 2001. Preliminary evaluation of hazelnut performance in Chile. *Acta Horticulturae*. 556:49-58.
18. Hoe, P., C. Bong, K. Jugah, and A. Rajan. 2009. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina:Hyphomycete) isolates and their effects in subterranean termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera:Rhinotermitidae). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*., 4(4):289-297.

19. Nahar, P.B., S.A. Kulkarni, M. S. Kulye, S. B- Chavan, G. Kulkarni, A. Rajendran, P.D. Yadav, Y. Shouche, and M. V. Deshpande. 2008. Effect of repeated *in vitro* sub-culturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*. 18(4):337-355.
20. NCBI, 2014. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) databases. National Center for Biotechnology Information (NCBI), US National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, USA. Available at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed August 2014).
21. ODEPA 2014. Superficie de frutales por región. Oficina de estudios y políticas agrarias. Available at <http://www.odepa.cl/superficie-de-frutales-por-region-2/> (accessed August 2014).
22. Parra, L., Mutis, A., Aguilera, A., Rebolledo, R. y Quiroz, A. 2009. Del conocimiento sobre cabrito del frambueso (CF) *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera:Curculionidae). *Idesia* 27(1):57-65.
23. Pedrini, N., R. Crespo, and P. Juárez. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146:124-137.
24. Rangel, D.E. N., G. U. L. Braga, S. D. Flint, A. J. Anderson, and D. Roberts. 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology*. 87:77-83.
25. Roberts, D. and St. Leger, R. 2004. *Metarhizium spp.*, Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. p. 1-70. In Laskin, A., J. Bennett, and G. M. Gadd. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.
26. Safavi, S.A., F. Shah, A. Pakdel, G.R. Rasoulilian, A. R. Bandani, and T.M. Butt. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Federation of Europeans Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*. 270:116-123.
27. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4)406-425.

28. Santoro, P. H., J. Zorzetti, K. Constanski, and P. M. Neves. 2014. Conidial production, virulence, and stress tolerance of *Beauveria bassiana* conidia after successive *in vitro* subculturing. *Revista colombiana de Entomología*. 40(1):85-90.
29. Schrank, A. and M. Vainstein. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 56:1267-1274.
30. Shah, F. A., N. C. S. Wang, and T. M. Butt. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*. 251:259-266.
31. Shah, F. A., N. Allen, C. J. Wright, and T. M. Butt. 2007. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*. 276:60-66.
32. Sokal, R.R., and F. J. Rohlf. 2013. *Introducción a la Bioestadística*. Gabarrón, J. Reverté, Barcelona, España.
33. Vásquez, G. y O. Echeverría. 2000. *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, México.
34. Zavala, A., Elgueta, M., Abarzúa, J., Aguilera, A., Quiroz, A. and Rebolledo, R. 2011. Diversity and distribution of the *Aegorhinus* genus in the La Araucanía Region of Chile, with special reference to *A. superciliosus* and *A. nodipennis*. *Ciencia e Investigación Agraria*. 38(3):367-377.

Table 1.1: Size of the conidia of the six strains of *M. anisopliae* grown in Potato Dextrose Agar after 14 days of incubation

<i>Strain</i>	<i>Length</i>		<i>Width</i>		<i>Length/widht h ratio</i>
	<i>Average</i>	<i>SD</i>	<i>Average</i>	<i>SD</i>	
Qu-M173c	5.33a	0.35	1.89b	0.35	2.87
Qu-M363	4.87c	0.59	1.83b	0.15	2.68
Qu-M171a	4.52d	0.57	1.79b	0.17	2.54
Qu-M156a	5.00bc	0.56	1.63c	0.18	3.09
Qu-M421	5.31ab	0.49	2.21a	0.20	2.42
Qu-M430	5.54a	0.63	2.17a	0.16	2.57

*Different letters in the column indicate significant differences (Tukey's test, $p < 0.05$).

Table 1.2: Mortality of adults of *Aegorhinus superciliosus* inoculated with different strains of *Metarhizium anisopliae*.

<i>Strain</i>	<i>Mortality (%)</i> *	<i>Standard deviation</i>	<i>Minimal</i>	<i>Maximum</i>
Qu-M173c	52 ab	30.33	20	40
Qu-M363	24 bc	21.91	0	40
Qu-M171a	16 bc	16.73	0	40
Qu-M156a	20 bc	20	0	40
Qu-M421	36 abc	16.73	20	60
Qu-M430	90 a	14.14	70	100
Control	10 c	12.25	0	30

*Different letters in the column indicate significant differences (Tukey's test, $p < 0.05$).

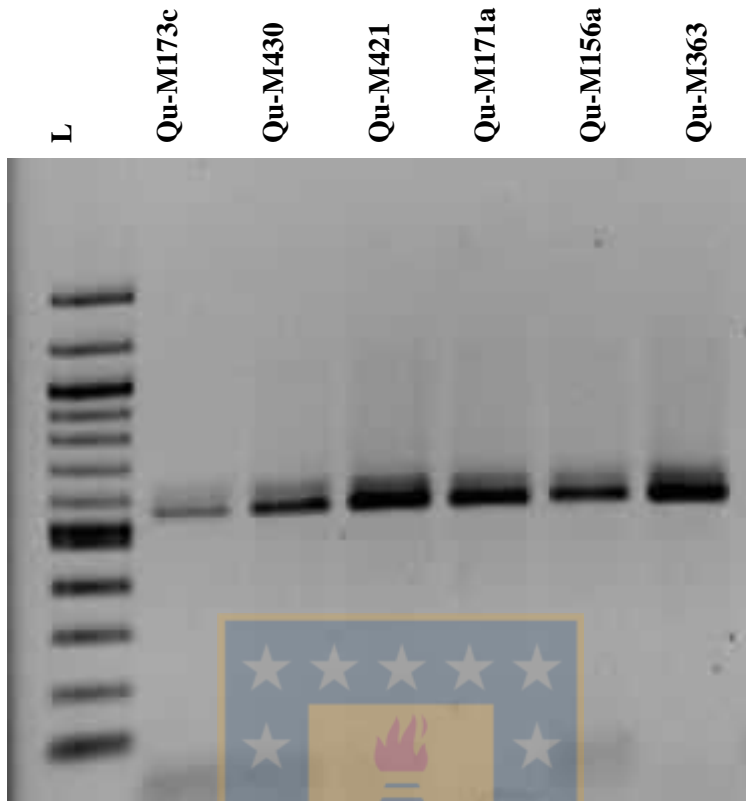


Figure 1.1: PCR products amplified with ITS1-ITS4 primers from six strains of *Metarhizium spp.*

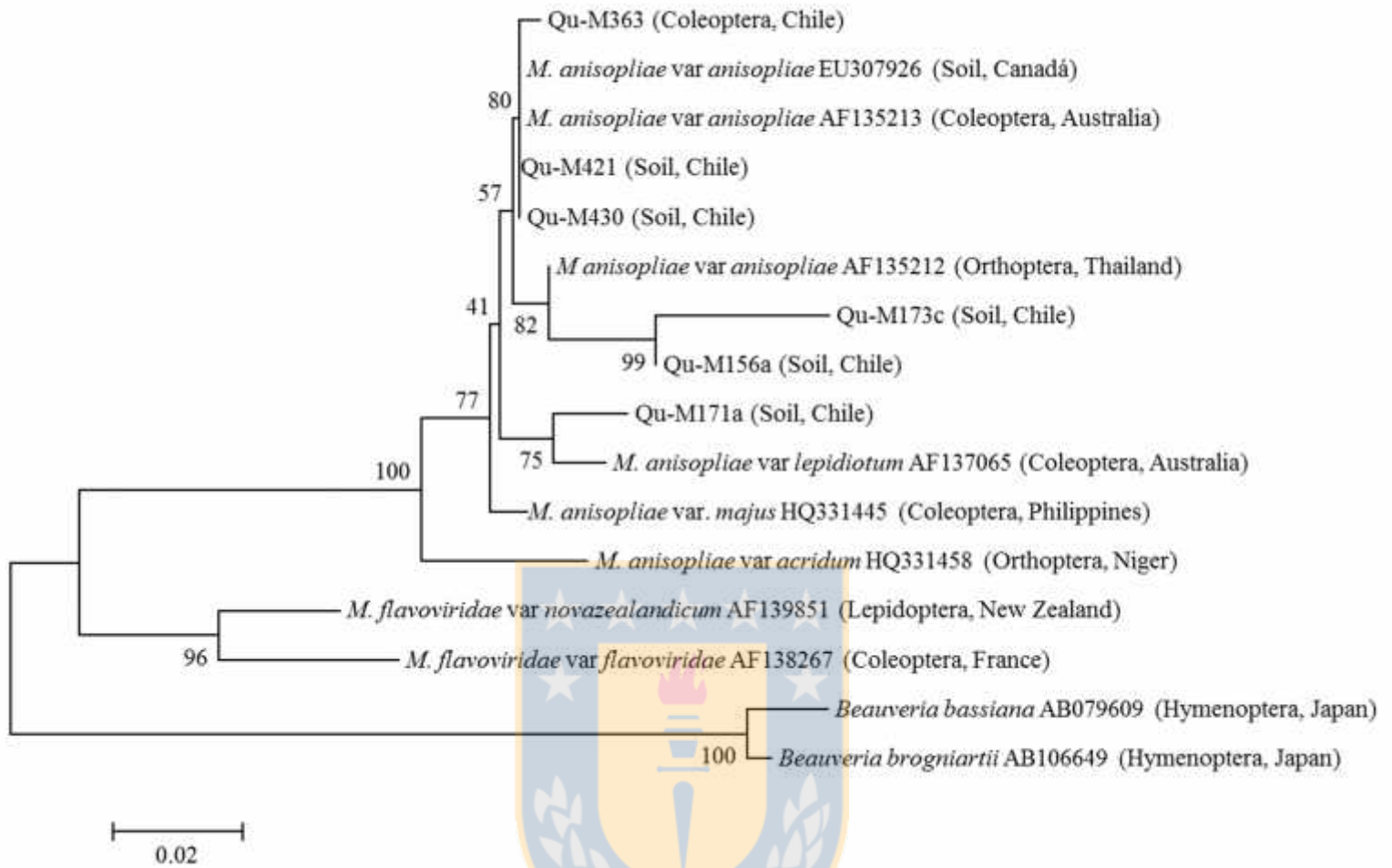


Figure 1.2: Neighbor joining phylogenetic tree based on ITS-5.8S rDNA gene sequencing of six strains of *Metarhizium* spp. The strains sequences in the phylogram were obtained from GenBank (Accession numbers in capital letters). Information in parenthesis indicates original host and geographic origin.

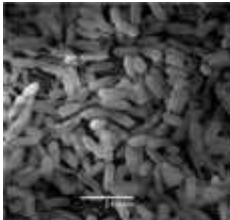




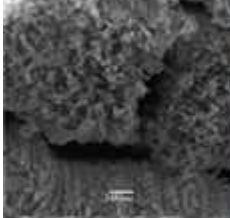




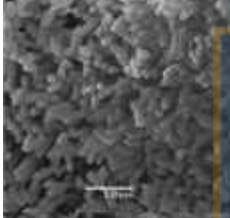




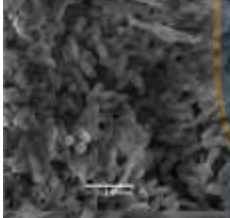




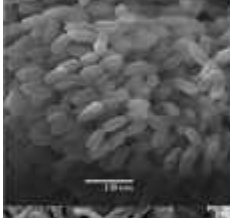




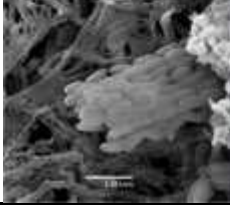




Strain	SEM (Scanning electron microscopy)	Growth Media			
		PDA (Potato Dextrose Agar)	SDA (Sabouraud Dextrose Agar)	GA (Agar enriched with <i>Galleria mellonella</i>)	AA (Agar enriched with <i>Aegorhinus superciliosus</i>)
Qu-M173c					
Qu-M171a					
Qu-M156a					
Qu-M363					
Qu-M421					
Qu-M430					

Figure 1.3: Morphology of the conidia and of the colonies of six strains of *Metarhizium anisopliae* in different growth media after 14 days from the inoculation.

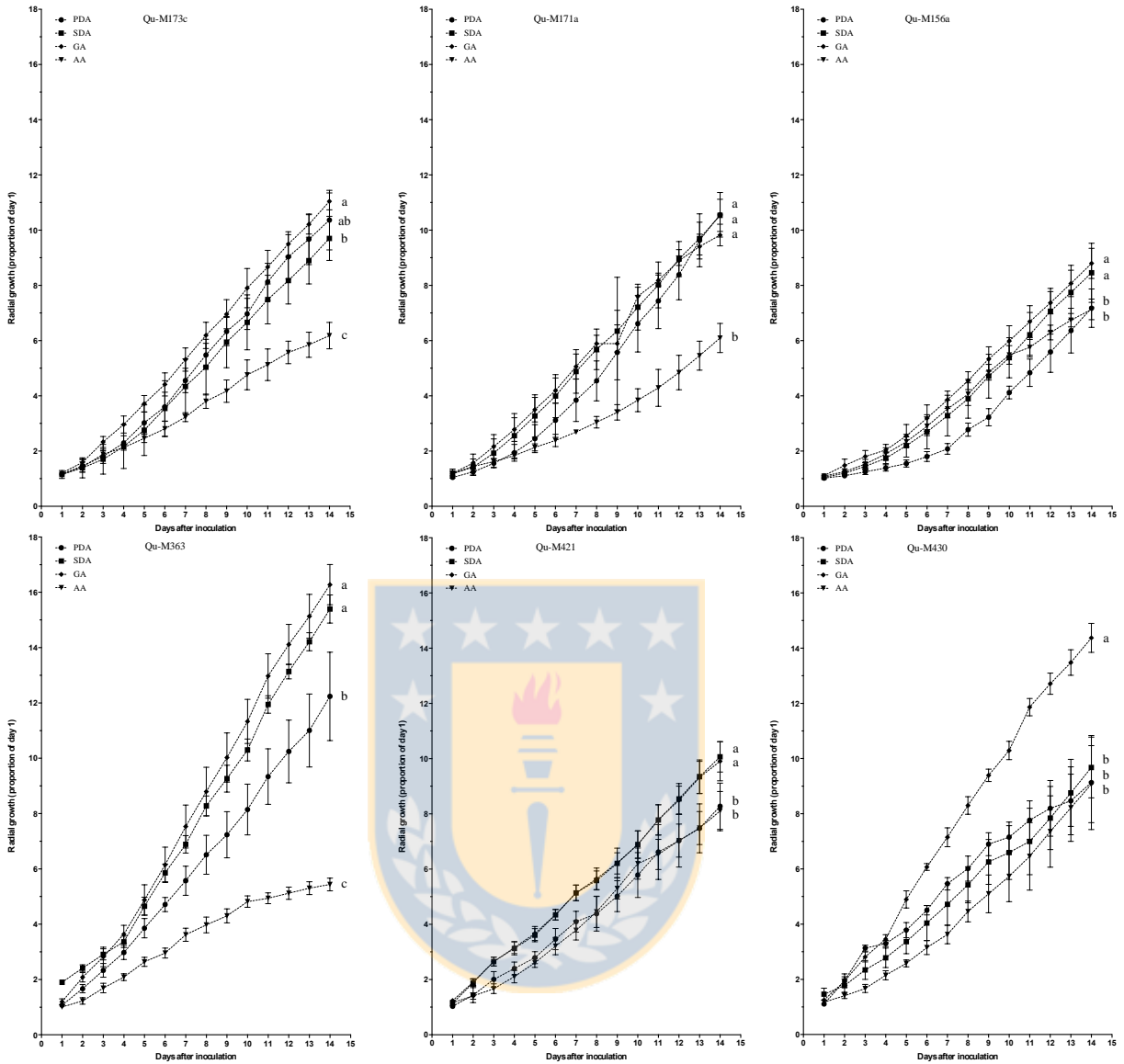


Figure 1.4: Radial growth of six strains of *Metarhizium anisopliae* grown in different solid media.

Different letters for each strain indicate differences between the growth media according to the Tukey's test ($p < 0.05$).

Vertical bars indicate standard error.

CAPITULO 2

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INSECTICIDA DE DEIS CEPAS DE *Metarhizium anisopliae* PARA EL CONTROL DE *Aegorhinus superciliosus* (COLEOPTERA:CURCULIONIDAE)

María Sepúlveda, Marisol Vargas, Ricardo Ceballos, Natalí Fernández, Macarena Gerding-



Actividad enzimática e insecticida de seis cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae)

2.1 Resumen

Aegorhinus superciliosus (Coleoptera: Curculionidae) es un insecto nativo de Chile, y una de las plagas más importantes en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) y avellano europeo (*Corylus avellana* L.), entre otros. El creciente interés por el uso racional de insecticidas y la incorporación de productos biológicos para el control de plagas ha llevado a la evaluación de diversas alternativas, como la utilización de *Metarhizium anisopliae*, hongo entomopatógeno distribuido mundialmente. Sin embargo, existe variabilidad en los niveles de patogenicidad entre las cepas de esta especie. Esta variabilidad se ve reflejada en la producción de enzimas que hidrolizan la cutícula de los insectos y tienen directa relación con el proceso de adhesión e infección. Por otra parte, los niveles de producción de destruxina A, una de las principales toxinas con efecto insecticida, también son expresión de esta variabilidad entre cepas. Tanto la producción de enzimas como de toxinas están descritas como factores de patogenicidad de *Metarhizium*. En consecuencia, los objetivos de este trabajo fueron evaluar la producción de enzimas degradadoras de la cutícula (lipasas, proteasas y quitinasas) y de destruxina A de distintas cepas de *Metarhizium anisopliae*, así como también evaluar el efecto de la aplicación de destruxina A vía tópica sobre adultos de *A. superciliosus*. Las cepas evaluadas fueron QuM173c; Qu-M363; Qu-M171a; Qu-M156a; Qu-M421; y Qu-M430, provenientes de la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). La cuantificación de lipasas, proteasas y quitinasas se realizó a partir de cultivos líquidos, mediante métodos colorimétricos utilizando como sustratos -nitrofenil butirato, azocaseína y -nitrofenil N-acetil glucosamidina, respectivamente. La extracción de destruxina A fue realizada a partir de cultivos líquidos y su cuantificación mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Finalmente, se evaluó la mortalidad de adultos de *A. superciliosus* asperjados con 0; 0,1; 1, 10 y 100 mgL⁻¹ de destruxina A. La producción de enzimas dependió de la cepa y del tiempo de incubación, la máxima producción de lipasas la alcanzó la cepa Qu-M363 con 67.789 Umg⁻¹ el día 3, mientras que el nivel más alto de proteasas lo presentó la cepa Qu-M421 con 0.173 Umg⁻¹ el día 1. Las quitinasas alcanzaron su mayor actividad el día 20 con la cepa Qu-M363 (27.268 Umg⁻¹). Todas las cepas evaluadas producen destruxina A en concentraciones que varían entre 0.2 y 818.02 mgL⁻¹. La mortalidad de *A. superciliosus* alcanzó el 100% a los 4 días desde la aplicación para la concentración de 100 mgL⁻¹ de destruxina A. Los

resultados obtenidos indican que la actividad enzimática y la producción de toxinas son dependientes de la cepa.

Palabras clave: *Metarhizium*, *Aegorhinus*, HPLC, destruxina, enzimas.

2.2 Introducción

El cabrito de la frambuesa, *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae), insecto nativo de la zona centro sur de Chile (Zavala et al., 2011) es una importante plaga cuarentenaria asociada al cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), frambueso (*Rubus idaeus* L.), zarzaparrilla (*Ribes nigrum* L), mora (*Rubus constrictus* Muell et Lef.), grosellero (*Ribes grossularia*) y avellano europeo (*Corylus avellana* L.) (Aguilera, 1995; Grau et al., 2001).

La larva de *A. superciliosus* es el estado que causa el daño más importante en las plantas atacadas, ya que se alimenta de la raíz y perfora en ella una galería hasta el cuello de la planta hospedera, pudiendo causar la muerte de ésta (Cisternas et al., 2000).

El control químico de *A. superciliosus* se basa en la utilización de compuestos organofosforados no selectivos y carbamatos sobre adultos (Aguilera 1995; Carrillo, 1993). También es posible utilizar estrategias de control microbiológico, como hongos entomopatógenos, destacando *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., perteneciente al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetess y Orden Hypocreales (Driver et al., 2000). Este hongo se caracteriza por sus conidias cilíndricas y verdes, producidas en cadenas que forman una densa y compacta capa de esporas (Alves, 1998). Fue el primer hongo entomopatógeno producido en forma masiva para su uso en control de plagas, debido a su efecto patogénico contra insectos de siete órdenes (Roberts y St. Leger, 2004). Si bien el rango de hospederos susceptibles a la acción de *M. anisopliae* como especie es amplio, las distintas cepas pueden ser específicas para algunos hospederos (Schrack y Vanstein, 2010).

El modo de infección de un hongo entomopatógeno comienza cuando una conidia entra en contacto con la cutícula de un insecto susceptible, formando un tubo germinativo que permitirá el ingreso del hongo al hemocele gracias a una serie de enzimas que degradan la cutícula del hospedero. Una vez en el interior del cuerpo del insecto, el hongo comienza a colonizar distintos órganos, liberando toxinas que inhiben el desarrollo fisiológico y finalmente provocan la muerte al insecto (Tanada y Kaya, 1993). Del desarrollo de este ciclo dependerá el éxito de la primera etapa de infección, proceso en el cual es fundamental la degradación de la cutícula del insecto, y en el que se

encuentran implicadas varias enzimas del tipo hidrolasas (Wang et al., 2002, Boldo et al., 2009). De este modo, las principales enzimas que hidrolizan la cutícula del insecto corresponden a lipasas, proteasas y quitinasas, las que están condicionadas por los mecanismos de invasión del hongo y por la composición de la cutícula, existiendo una relación entre la actividad enzimática de estos microorganismos, y su patogenicidad hacia el insecto a controlar (Boldo et al., 2009; Ali et al., 2011).

La virulencia y especificidad de los aislamientos de hongos entomopatógenos depende en gran medida de la habilidad de producir este complejo enzimático, como una respuesta a la conformación específica de la cutícula de una determinada especie de insecto, siendo esta selectividad una ventaja de los hongos entomopatógenos (Schrack y Vainstein, 2010). Una vez que el hongo ha degradado la cutícula del insecto y se encuentra en el hemocele, comienza la colonización y la producción de toxinas, las cuales son productos de bajo peso molecular obtenidos del metabolismo secundario, o complejos ciclopeptidos, entre los que destacan las destruxinas (Charnley, 2003).

Las destruxinas son ciclodepsipéptidos con propiedades insecticidas, antivirales, fitotóxicas e incluso anti cancerígenas (Dornetshuber-Fleiss et al., 2013). Son el metabolito secundario más frecuentemente producido por *M. anisopliae* en fermentación, y las toxinas más estudiadas de los hongos entomopatógenos, consideradas un importante factor de virulencia, que acelera la muerte de insectos infectados (Schrack y Vainstein, 2010). Existen más de 38 destruxinas, divididas químicamente en cinco grupos, denominados destruxinas A, B, C, D y E (Pedras et al., 2002), siendo las destruxinas de los grupos A, B y E las que han mostrado actividad insecticida (Thomsen y Eilenberg, 2000). Estas toxinas ejercen un importante rol en el debilitamiento del sistema inmunológico, daño al sistema muscular y tubos de Malpighi, afectando la excreción y dificultando la movilidad, alterando los mecanismos de defensa comportamental (Kershaw et al., 1999; Pal et al., 2007). En efecto, aislamientos de *Metarhizium* que producen mayores cantidades de destruxinas serían más virulentos (Sree et al., 2008a).

En *M. anisopliae* se ha observado que existe una gran variabilidad intraespecífica, incluso entre cepas provenientes de una misma área geográfica, en cuanto a características morfológicas, adaptación a condiciones ambientales, actividad catalítica de este complejo enzimático y producción de toxinas, dando lugar a cepas con distintos niveles de virulencia (Tigano-Milani et al., 1994; Wang et al., 2002) y con la capacidad de patogenizar de manera específica algunos hospederos (Wang et al., 2011).

En Chile, se han llevado a cabo estudios para evaluar la patogenicidad de cepas nativas *M. anisopliae* sobre diferentes especies de curculionidos plaga, entre ellos *A. superciliosus* (France et

al., 2000). Sin embargo, la relación entre actividad enzimática o cantidad de destruxina producida y nivel de patogenicidad *M. anisopliae* sobre *A. superciliosus* no ha sido estudiada. En consecuencia, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad de lipasas, proteasas, quitinasas, y producción de destruxina A de cepas de *M. anisopliae* con distintos niveles de patogenicidad sobre *A. superciliosus*.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Material experimental de insectos y hongos entomopatógenos

Adultos de *A. superciliosus* fueron colectados desde huertos bajo manejo orgánico de arándano (*V. corymbosum* L) y zarzaparrilla (*R. nigrum* L) de la región del Biobío (36°33'47"S; 71°47'48"). Los insectos colectados fueron trasladados al laboratorio del Centro Tecnológico de Control Biológico (CTCB) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Quilamapu, donde se alimentaron con ramillas y hojas de arándano previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio, y se mantuvieron en forma individual en contenedores plásticos a una temperatura de 25°C.

Larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyreliidae) fueron obtenidas desde la crianza establecida en el CTCB

Desde la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos se seleccionaron 6 cepas de *M. anisopliae* con diferentes niveles de patogenicidad sobre *A. superciliosus*, QuM173c; Qu-M363; Qu-M171a; Qu-M156a; Qu-M421, y Qu-M430 (France et al. 2000). El inóculo fue producido a partir del cultivo de las cepas a 25±2°C por 15 días en agar papa dextrosa (PDA).

2.3.2 Cuantificación de la actividad enzimática

Las enzimas extracelulares fueron producidas en un medio líquido basal consistente en solución buffer fosfato 0.1M, pH 6.6; MgSO₄·7H₂O 2.028 mM, ZnSO₄ 0.006199 mM, NaCl 3,4x10⁻²μM esterilizado por filtración. Utilizando matraces de 500 mL se adicionaron 100 mL de medio líquido estéril más 0.4 g de cutícula de *A. superciliosus*. La cutícula usada se preparó a partir de insectos adultos siguiendo la metodología descrita por Delgado et al. (2001). Posteriormente cada matraz se inoculó con 1x10⁷ conidias de cada cepa, y se incubó en agitación rotacional a 2.0 Hz a 25±2°C por 20 días. Se tomaron muestras a 1; 3; 5; 7; 9; 12; 15 y 20 días desde la inoculación. Las muestras fueron filtradas al vacío usando papel filtro n°595 (Whatman), y posteriormente centrifugadas a 8000 g por 20 min. El sobrenadante fue utilizado para determinar la actividad enzimática. Se

empleó un diseño completamente al azar, con cada cepa como tratamiento y 5 repeticiones. El experimento se realizó por duplicado y los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y los grupos fueron separados de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Proteína Total

Las proteínas totales fueron cuantificadas utilizando el método descrito por Bradford (1976) usando suero albumina bovina como estándar.

Actividad Lipolítica

La actividad de la lipasa fue evaluada usando *p*-nitrofenil butirato como sustrato, siguiendo la metodología descrita por Yang et al. (2002). El *p*-nitrofenil butirato fue solubilizado en dimetil sulfóxido en la décima parte del volumen final, para luego diluir en 0.5 mM con buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0) conteniendo 0.5% de Tritón x-100. Se tomaron 10 μ L de sobrenadante y se adicionaron a 90 μ L del sustrato en una microplaca de 96 pocillos. Después de la hidrólisis a 37°C por 1 h, la reacción fue detenida con 100 μ L de NaOH y la absorbancia fue medida inmediatamente a 405 nm en un lector de microplacas (Tecan, Infinite 200Pro, Austria). Una unidad de actividad lipasa está definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol en 1 hr. El coeficiente de extinción molar de *p*-nitrofenol a 405 nm es de $11,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Actividad Proteolítica

La actividad proteolítica se evaluó usando azocaseína como sustrato (Delgado et al., 2001). Una alícuota de 0.340 mL de sustrato (azocaseína 1% p/v en buffer fosfato de sodio 0.2 M, pH 7.5) más 0.340 mL de buffer fosfato de sodio (0.2 M, pH 7.5) se incubó a 37°C por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.340 mL de sobrenadante de la muestra, y se incubó por 30 min a la temperatura antes descrita. La reacción se detuvo con 0.340 mL de ácido tricloroacético al 10% (p/V), incubando a 37°C por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min. Finalmente se midió la absorbancia a 337 nm en un espectrofotómetro (Mecasys Co. Optizen POP. Korea). Una unidad de actividad proteasa (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de azocaseína en 1 hr utilizando un coeficiente de extinción molar de $98 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Actividad Quitinolítica

La actividad de la quitinasa se evaluó cuantificando la liberación de *p*-nitrofenol a partir de *p*-nitrofenil N-acetil glucosamidina (PNP(GlcNAc) (Delgado et al., 2001). El PNP(GlcNAc) fue disuelto en buffer acetato de potasio 0.05 M (pH 5.6). Se tomaron 10 μ L de sobrenadante de la

muestra, los que fueron añadidos a 90 μL de 0.18 mmol L^{-1} de sustrato e incubados a 40°C por 2 h. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 μL de 1 mol L^{-1} de NaOH. La medición colorimétrica se determinó a 405 nm usando un lector de microplacas (Tecan, Infinite 200Pro, Austria). Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mmol de -nitrofenol por mg de proteína por h. El coeficiente de extinción molar de -nitrofenol a 405 nm es de 11,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.3.3 Cuantificación de la producción de destruxina A

Se tomaron 1.5 mL de una suspensión de esporas (2×10^7 conidias mL^{-1}) de cada aislamiento, con los que se inocularon matraces Erlenmeyer de 500 mL, que contenían 150 mL de medio líquido Czapeck Dox (sucrosa, 30 g L^{-1} ; nitrato de sodio, 2 g L^{-1} ; K_2HPO_4 , 1 g L^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g L^{-1} ; KCl , 0,5 g L^{-1} y $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g L^{-1}) más 5 g L^{-1} de peptona (Sigma). Posteriormente fueron incubados a 25°C y 100 rpm por 7 días en un agitador rotatorio. Finalizada la incubación los cultivos fueron filtrados bajo presión reducida a través de dos capas de papel Kimwipes, y luego a través de papel filtro Whatman n°1. Los cultivos filtrados fueron extraídos dos veces por 12 h con igual volumen de diclorometano: etil acetato (1:1, v/v). El solvente fue evaporado en vacío y el extracto crudo fue disuelto en 1 mL de metanol absoluto, para su análisis mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Wang et al., 2003). La cuantificación se realizó en un equipo HPLC con una columna de fase reversa C18 (Chromolith® HighResolution, diámetro de poro: 150 Å, longitud: 4.6 x 50 mm) y un detector de diodos UV-DAD. Como fase móvil se utilizó agua MilliQ y acetonitrilo en un gradiente lineal de 95:5 hasta 50:50 por 6 min, desde 50:50 hasta 2:98 por 2 min, donde se mantiene por 5 min. El flujo de la fase móvil fue de 0.6 mL min^{-1} . Se inyectaron 20 μL de cada muestra y se monitoreó a una longitud de onda de 215 nm. La cuantificación de toxinas producidas fue determinada mediante una curva de calibración realizada con estándares de destruxina A (Sigma®; CAS 6686-70-0) (Wang et al., 2003). El experimento fue realizado por duplicado, empleando un diseño completamente al azar, con 5 repeticiones. La producción de destruxina A fue analizada usando procedimientos estadísticos no paramétricos mediante el test de Kruskal-Wallis y los grupos fueron separados usando el test de Conover-Inman ($p < 0.05$)

2.3.4 Aplicación de destruxina A sobre adultos de *A. superciliosus*

La destruxina A (Sigma®; CAS 6686-70-0) fue aplicada sobre larvas último estadio de *Galleria mellonella* para comprobar su viabilidad (Vilcinskas et al., 1997). Se tomaron 20 larvas de *G. mellonella*, a 10 larvas se les aplicó 50 μL de agua destilada estéril en la superficie del cuerpo y a

las otras 10 larvas de *G. mellonella* se les aplicó 50 μL de destruxina A a una concentración de 10 ppm.

El efecto de la aplicación tópica de destruxina A sobre adultos de *A. superciliosus* fue evaluado en cuatro concentraciones de 0,1; 1; 10 y 100 mgL^{-1} . Una solución de cloruro de sodio fue incorporada como testigo (Sree et al., 2008a). Las aplicaciones se realizaron mediante microaspersión con torre de Potter (Potter, Burkard Manufacturing Co. Ltd, Rickmansworth, UK) a una presión de 1,054 kg cm^{-2} aplicando 1 mL de suspensión sobre la cutícula de los insectos. Posteriormente los insectos fueron mantenidos a 25°C y con un fotoperiodo de 12:12.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Cuantificación de la actividad enzimática

Se detectó actividad lipolítica, proteolítica y quitinolítica en todas las cepas evaluadas en cada uno de los días en que se tomaron muestras del cultivo líquido.

El valor mínimo de producción de lipasas lo presentó la cepa Qu-M171a (6.542 U mg^{-1}), mientras que el máximo valor lo alcanzó la cepa Qu-M363 (67.789 U mg^{-1}) (Tabla 2.1), coincidiendo con los valores reportados por Silva et al. (2005) y por Ali et al. (2009) en cepas de *M. anisopliae* cultivados en medios que contenían integumento de artrópodos y distintos sustratos.

La producción de lipasas alcanza su máximo el día 3 ($p = 0.05$) para las cepas Qu-M363 (67.789 U mg^{-1}), Qu-M171a (51.643 U mg^{-1}) y Qu-M421 (63.698 U mg^{-1}) (Tabla 2.1), al igual que lo observado por Delgado et al. (2001) y Silva et al. (2005). La cepa Qu-M430, descrita como patogénica para *A. superciliosus* (France et al., 2000, Sepúlveda et al., datos no publicados) alcanzó la máxima actividad lipolítica entre los días 1 y 3, con 42.420 y 42.597 U mg^{-1} , respectivamente (Tabla 2.1).

Las lipasas han sido descritas como un factor de virulencia en hongos entomopatógenos, teniendo un rol crucial en el proceso de infección, adquisición de nutrientes, crecimiento, adhesión y defensa, entre otros. Uno de los procesos afectados por la acción de estas enzimas es la adhesión, ya que incrementan las interacciones hidrofóbicas mediante la liberación de ácidos grasos libres. Los lípidos de la epicutícula de los insectos son la primera defensa contra microorganismos patógenos, por lo que estas enzimas son muy importantes en la etapa de penetración y estados iniciales de infección, tales como el contacto de las conidias con la cutícula del hospedero (Santi et al., 2010ab). Lo anterior se relaciona con la cepa Qu-M430, patogénica para *A. superciliosus* y que alcanza el

valor más alto de actividad de lipasas el día 1, pudiendo relacionar preliminarmente la mayor actividad de esta enzima en el período inmediato al contacto con el insecto hospedero, y que podría ser una ventaja para esta cepa.

En la producción de proteasas destaca la cepa Qu-M421, la cual alcanza el mayor nivel de producción de estas enzimas el día 1, con 0.173 U mg^{-1} . Valores similares fueron obtenidos por Delgado et al. (2001) y Sapna et al. (2012). En cuanto a la producción de proteasas a través del tiempo, la cepa Qu-M156a presentó una actividad proteolítica constante durante los 20 días de evaluación (Tabla 2.1).

En nuestro estudio no se diferenció la producción de proteasas Pr1 y Pr2 del grupo de las subtilisinas, principales enzimas proteolíticas secretadas por *M. anisopliae* para degradar la cutícula de los hospederos, sin embargo ambas son relevantes en las etapas iniciales del proceso de infección y serían capaces de permitir la adaptación de los hongos entomopatógenos a un amplio rango de hábitats tanto como saprófitos como patógenos (Bagga et al., 2004). Al respecto, Santi et al. (2010a y b) sugieren que las proteasas podrían digerir varias proteínas presentes en la cutícula de insectos, permitiendo que el hongo atravesara la primera barrera de defensa, colonice y digiera tejidos, lo que podría tener influencia sobre la virulencia y la patogenicidad, ofreciendo una ventaja competitiva y siendo parte de los complejos mecanismos de interacción entre hospedero y patógeno.

La producción de quitinasas presentó diferencias entre las cepas y los períodos de máxima producción, observándose que la cepa Qu-M63 alcanzó los máximos valores, concentrando su actividad los días 15 y 20 ($p < 0.05$), con $26,956$ y $27,268 \text{ U mg}^{-1}$, respectivamente (Tabla 2.1). La cepa Qu-M430 alcanzó su mayor actividad quitinolítica el día 15 ($p < 0.05$) (Tabla 2.1). Valores similares fueron obtenidos por Delgado et al. (2001), quienes además determinaron la correlación positiva entre actividad catalítica de las quitinasas y la patogenicidad de distintas cepas de hongos entomopatógenos. Shrank y Vainstein (2010) plantean que estas enzimas actuarían de manera sinérgica con otras hidrolasas durante el proceso de infección, con el objetivo de solubilizar la cutícula del hospedero, proporcionando nutrientes y permitiendo la penetración del hongo y la posterior colonización del insecto.

La relación entre la patogenicidad y la actividad de estos tres grupos de enzimas ha sido ampliamente estudiada para otros insectos y cepas patogénicas, y se ha observado que se manifiesta solamente con algunas enzimas. Delgado et al. (2001) evaluaron la actividad enzimática de lipasas, proteasas y quitinasas, y la relación con distintas cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* para el control de *Hypothenemus hampei*, determinando que existe una variación en la actividad enzimática que se explicaría por las tasas de crecimiento y las fases en la producción de enzimas, y que se observa en cepas patógenicas que presenta bajos niveles de actividad para

determinadas enzimas. Del mismo modo, las cepas evaluadas en nuestro trabajo muestran valores variables en la producción de enzimas. Sin embargo la cepa Qu-M430, la cual posee niveles de patogenicidad superiores al 80% sobre *A. superciliosus* (France et al., 2000; Sepúlveda et al., datos no publicados), no presentó actividad enzimática superior a las otras cepas menos patogénicas, por lo tanto en el presente estudio no es posible relacionar un mayor nivel de patogenicidad de una cepa con una mayor actividad enzimática.

Se debe considerar que la relevancia de estas enzimas no está limitada sólo a niveles cuantitativos, sino que también a patrones de expresión de tales enzimas y además estarían relacionadas con los distintos niveles de selectividad de estos microorganismos (Mustafa and Kaur, 2009).

2.4.2 Cuantificación de la producción de destruxinas

Se detectó la producción de destruxina A en las seis cepas evaluadas, pudiendo observar un grupo de cepas con mayor producción de esta toxina, Qu-M156 a, Qu-M171a, Qu-M430 y Qu-M173c con un rango de producción de 0.14 y 818.02 mg L⁻¹ (Tabla 2.2). La producción de destruxina A depende de la cepa (Wang et al., 2003; Hu et al., 2006). Otros autores indican que un factor relevante en la producción de destruxinas es el tiempo de incubación, encontrando valores máximos entre los días 14 y 21 después de la inoculación (Sree et al., 2008a).

Las destruxinas, al igual que las enzimas que hidrolizan la cutícula del hospedero, serían un importante factor de virulencia, sin embargo, las cepas utilizadas en este trabajo y que previamente fueron evaluadas sobre *A. superciliosus* (France et al., 2000; Sepúlveda et al. datos no publicados) presentan niveles variables de producción de destruxina, las que no estarían relacionadas con los niveles de patogenicidad. Al respecto, Valadares-Inglis y Peberdy (1998) y Wang et al. (2002) plantean que los hongos entomopatógenos tendrían dos estrategias de virulencia, la primera de ellas estaría basada en las toxinas, mientras que la otra enfocaría su acción en el crecimiento del microorganismo. En este sentido, se ha observado que cepas patogénicas que presentan escaso crecimiento en la hemolinfa, producen destruxina en cantidades suficientes para provocar la muerte del hospedero, y del mismo modo, se ha reportado cepas patogénicas para un determinado insecto, que manifiestan crecimiento abundante en la hemolinfa y escasa producción de destruxinas (Wang et al. 2003). Por lo tanto, el proceso de patogénesis no podría ser explicado por la acción de un solo mecanismo (Wang et al. 2003).

2.4.3 Aplicación de destruxina A sobre adultos de *A. superciliosus*

En las pruebas de viabilidad de la destruxina A se observe que las larvas de *G. mellonella* tratadas con las distintas concentraciones de destruxina presentaron de inmediato una parálisis tetánica, efecto que no se observó en las larvas inoculadas con agua.

En cuanto a la aplicación tópica de destruxina a *A. superciliosus*, se observó un efecto de las distintas concentraciones de destruxina A, expresado en mortalidad acumulada, en comparación con el tratamiento testigo ($p < 0.05$). Al cuarto día posterior a la inoculación el tratamiento de destruxina a una concentración de 100 mg L^{-1} alcanzó el 100% de mortalidad de adultos de *A. superciliosus*. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Sree et al. (2008a) quienes evaluaron el efecto de la aplicación de destruxina cruda sobre *Spodoptera litura* (Lepidoptera:Noctuidae), y determinaron que existe una gran cantidad de efectos provocados por esta toxina, como por ejemplo sobre el metabolismo de lípidos, lo que provocaría larvas de menor peso corporal

La mortalidad acumulada que se obtiene con la aplicación de 100 mg L^{-1} no se muestra diferencias significativas con las concentraciones de 10 y 1 mg L^{-1} alcanzaron valores similares de mortalidad ($p < 0.05$), fluctuando entre 60 y 70% (Figura 1) Estos resultados no concuerdan con los de Gôlo et al. (2011) quienes determinaron que la aplicación de destruxina A en concentraciones entre 5 y 20 ppm no tendrían efecto sobre la mortalidad ni tampoco en el período de ovoposición, la cantidad de huevos y porcentaje de eclosión de *Rhipicephalus microplus* (Acari:Ixodidae). También Sree and Padmaja (2008b) observaron que la aplicación de dosis menores de destruxina A induciría el estrés oxidativo de larvas de *Spodoptera litura*.

2.5. Conclusiones

La producción de lipasas, proteasas y quitinasas es dependiente de la cepa y del período de incubación. La producción de destruxina también es dependiente de la cepa. La aplicación de destruxinas de manera directa sobre adultos de *A. superciliosus* permite alcanzar altos niveles de mortalidad en corto tiempo, pudiendo convertirse en un método de aplicación eficiente.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por CONICYT (Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología) e INNOVA Bio Bio (Fondo de Innovación Tecnológica de la región del Bio Bio) a través del proyecto código 12.273.EM-TES.

2.6 Literatura Citada

1. Aguilera, A 1995. Control selectivo de plagas frutales de la zona sur. Pp 141-180. En Aguilera, A., O. Andrade, J. Díaz, N. Espinoza, R. Galdamez, y H. Norambuena (eds). Seminario de Protección Vegetal. INIA Carillanca (Temuco, Chile).
2. Ali, S., Z. Huang, S. X. Ren, M. H. Bashir, M. Afzal, and L. Tong. 2009. Production and extraction of extracellular lipase from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae: Hypocreales). *Pakistan Journal of Zoology*. 41(5):341-347.
3. Ali, S., Z. Huang, W. QeZang, and X. Ren. 2011. Production and regulation of extracellular proteases from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the presence of diamondback moth cuticle. *Pakistan Journal of Zoology* 43(6):1203-1213.
4. Alves, S. B., J. E. Almeida, A. Minor Jr., y L. F. Alves 1998. Técnicas de laboratorio. p 637-710. In S. B. Alves (ed). *Controle microbiano de insetos*. 2nd ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.
5. Bagga, S. G. Hu, S. Screen, and R. J. St. Leger. 2004. Reconstructing the diversity of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 324:159-169.
6. Boldo, J.T., A. Junges, K. B. Amaral, C. C. Staats, M.H. Vainstein, and A. Schrank. 2009. Endochitinase CH12 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics*. 55:551-560.
7. Bradford, M. A. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

8. Carrillo, R. 1993. Plagas insectiles en arbustos frutales menores. Pp 63-86. En Barriga, P. y Neira, M. (Eds) Cultivos no tradicionales. Uniprint (Valdivia, Chile).
9. Charnley, A. K. 2003. Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. *Advanced in Botanical Research*. 40:241-321.
10. Cisternas, E., A. France, L. Devotto y M. Gerding 2000. Insectos, ácaros y enfermedades asociadas a la frambuesa. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile.
11. Delgado, F., Y. López y E. M. Giraldo. 2001. Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 60: 43-49.
12. Dornetshuber-Fleiss, R., P. Heffeter, T. Mohr, P. Hazemi, K. Kryeziu, C. Seger, W. Berger, and R. Lemmens-Gruber. 2013. Destruxins: Fungal-derived cyclohexadepsipeptides with multifaceted anticancer and antiangiogenic activities. *Biochemical Pharmacology*. 86:361-377.
13. Driver, F., R. J. Milner, and W. H. A Trueman. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on sequence analysis of ribosomal DNA. *Mycological Research* 104(2):135-151.
14. France, A., Gerding; M., Gerding, M. y Sandoval, A. 2000. Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium spp* y *Beauveria spp* en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* y *Otiorynchus sulcatus*. *Agricultura Técnica (Chile)*. 60(3):205-215.
15. Frazzon, A. P., Vaz Junior, I., Masuda, A. Schrank, and M. Vainstein. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 94:117-125.
16. Gôlo, P., C. Angelo Ida, M. G. Camargo, W. M. Perinotto, and V. R. Bittencourt. 2011. Effects of destruxin A on *Rhipicephalus (Boophilus) icropus* ticks (Acari:Ixodidae). *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 20(4):338-341.
17. Grau, P., A. France, M. Gerding, A. Lavín, and A. Torres. 2001. Preliminary evaluation of hazelnut performance in Chile. *Acta Horticulturae* 556:49-58.

18. Hu, Q.B, S.X. Ren, J. H, Wu, J-M. Chang, and P. Musa. 2006. Investigation of destruxin A and B from 89 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strains MaQ10. *Toxicon*. 48:491-498.
19. Kershaw, M. J., E. R. Moorhouse, R. Bateman, S. E. Reynolds, and A. K. Charnley. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 74:213-223.
20. Mustafa, U. and G. Kaur. 2009. Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia Microbiologica*. 54(6):499-504.
21. Pal, S., St Leger, R. J. and Wu, L. P. 2007. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*. 282:8969-8977.
22. Pedras, M. S. C., L. I. Zaharia, and D. E. Ward. 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*. 59:579-596.
23. Pedrini, N., R. Crespo, M. P. Juarez. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 146:124-137.
24. Roberts, D., and R. St. Leger. 2004. *Metarhizium spp.*, Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. p. 1-70. In Laskin, A., J. Bennett, and G. M. Gadd. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.
25. Santi, L., W. O. B. Silva, M. Berger, J. Guimaraes, A. Schrank, and M. Vainstein. 2010a. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*. 55:874-880.
26. Santi, L., W. O. B. Silva, F. M. Pinto, A. Schrank, and M. Vainstein. 2010b. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology*. 114:312-319.

27. Sapna, N., O. Remadevi, T. Sasidharan, M. Balachander, P. Dharmarajan. 2012. Cuticle degrading enzyme production by some isolates of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Journal of Bio-science. 20:25-32.
28. Schrank, A. and M. Vainstein. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. Toxicon. 56: 1267-1274.
29. Silva, W.O.B., L. Santi, M. Berger, A. Pinto, J. Guimaraes, A. Schrank, and M. Vainstein. 2009. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. Proces Biochemistry. 44:829-834.
30. Silva, W.O.B, L. Santi, A, Correa, L. Silva, F. Bresciani, A. Shrank, and M. Vainstein. 2010. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. Fungal Biology. 114:911-916.
31. Sree, K. S., V. Padmaja, and L.N.Y. Yellayohula. 2008a. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. Pest Management Science 64:119-125.
32. Sree, K. and V. Padmaja. 2008b. Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch.) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. Toxicon 51:1140-1150.
33. Tanada, Y., and H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic Press. New York, USA.
34. Thomsen, L., and J. Eilenberg. 2000. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera:Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera:Noctuidae) larvae from different destruxins. Environmental Entomology. 5:1041-1047.

35. Tigano-Milani, M., Gomes, A. M.; Sobral, B. 1994. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 65:206-210.
36. Valadares.Inglis, M. C., and J. F. Peberdy. 1998. Variation in the electrophoretic karyotype of Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae*. *Genetics and Molecular Biology*. 21:11-14.
37. Vilcinskas, A., V. Matha, and P. Götz. 1997. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolates from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology* 43(5):475:483.
38. Wang, C. S., M. A. Typas, and T. M. Butt. 2002. Detection and characterization of *pr1* gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Federation of Europeans Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*. 213:251-255.
39. Wang, C., A. Skrobek and T. Butt. 2003. Concurrence of losing a chromosome and the ability to produce destruxins in a mutant of *Metarhizium anisopliae*. *Federation of Europeans Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*. 226:373-378.
40. Wang, S., W. Fang, C.Wang, and R. St. Leger. 2011. Insertion of an esterase gene into a specific locust pathogen (*metarhizium acridum*) enables it to infect caterpillars. *PLoS Pathogens*. 7(6):_e1002097. doi: 10.1371/journal.ppat.1002097
41. Yang, J., Y. Koga, H. Nakano, and T. Yamane. 2002. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. *Protein Engineering* 15(2):147-152.
42. Zavala, A., M. Elgueta, J. Abarzúa, A. Aguilera, A. Quiroz, and R. Rebolledo. 2011. Diversity and distribution of the *Aegorhinus* genus in the La Araucanía Region of Chile, with special reference to *A. superciliosus* and *A. nodipennis*. *Ciencia e Investigación Agraria*. 38(3):367-377.

Tabla 2.1: Promedio de la actividad enzimática (U mg⁻¹) (\pm desviación estandar) de seis cepas de *Metarhizium anisopliae* durante 20 días de incubación.

Cepa	Tiempo incubación (días)							
	1	3	5	7	9	12	15	20
Lipasas								
Qu-M173c	10.75 b C ± 4.88	10.68 b C ± 6.72	4.72 c B ± 2.39	11.23 b B ± 4.62	22.45 a C ± 2.47	21.24 a A ± 2.95	21.07 a C ± 1.55	22.75 a A ± 2.38
Qu-M363	45.36 b A ± 12.93	67.79 a A ± 4.84	37.78 bc A ± 13.82	24.49 c A ± 7.86	32.13 bc A ± 14.36	29.85 c A ± 5.87	23.03 c BC ± 4.26	20.67 c AB ± 4.48
Qu-M171a	34.69 ab AB ± 11.38	51.64 a AB ± 24.12	36.74 ab A ± 15.58	23.10 b AB ± 12.31	14.66 b B ± 3.02	21.08 b A ± 11.66	6.54 b D ± 0.92	11.81 b B ± 4.74
Qu-M156a	14.16 b C ± 4.55	15.57 b C ± 6.02	30.67 a A ± 12.63	24.0 ab AB ± 8.48	19.13 ab B ± 10.50	19.03 a A ± 5.43	18.73 b C ± 3.91	26.55 ab A ± 11.09
Qu-M421	26.65 c B ± 5.77	63.69 a A ± 3.14	41.78 b A ± 14.21	24.36 c A ± 8.37	26.96 c A ± 10.96	28.84 bc A ± 14.46	28.65 bc AB ± 5.09	29.97 bc A ± 7.91
Qu-M430	42.42 a A ± 7.30	42.59 a B ± 8.80	32.72 ab A ± 7.76	30.15 ab A ± 13.84	36.16 ab A ± 28.79	23.71 b A ± 8.19	32.19 ab A ± 5.55	27.75 ab A ± 11.78
Proteasas								
Qu-M173c	0.08 a B ± 0.01	0.041 b B ± 0.004	0.025 c CD ± 0.002	0.024 c C ± 0.003	0.017 cd C ± 0.002	0.015 d B ± 0.008	0.014 d C ± 0.002	0.012 d C ± 0.001
Qu-M363	0.036 b B ± 0.004	0.089 a A ± 0.01	0.077 ab AB ± 0.02	0.068 ab AB ± 0.06	0.086 ab A ± 0.02	0.048 ab B ± 0.04	0.051 ab AB ± 0.04	0.044 ab B ± 0.03
Qu-M171a	0.030 b B ± 0.04	0.042 b B ± 0.04	0.081 a A ± 0.01	0.076 a A ± 0.01	0.069 ab A ± 0.01	0.086 a A ± 0.01	0.073 ab A ± 0.004	0.079 a A ± 0.01
Qu-M156a	0.019 a B ± 0.01	0.021 a B ± 0.003	0.017 a D ± 0.01	0.019 a C ± 0.01	0.015 a C ± 0.01	0.015 a B ± 0.01	0.013 a C ± 0.003	0.017 a C ± 0.01
Qu-M421	0.173 a A ± 0.22	0.047 b B ± 0.04	0.051 b BC ± 0.04	0.041 b ABC ± 0.03	0.041 b B ± 0.03	0.041 b B ± 0.04	0.042 b ABC ± 0.03	0.014 b BC ± 0.02
Qu-M430	0.039 a B ± 0.01	0.032 ab B ± 0.01	0.038 ab CD ± 0.004	0.030 b BC ± 0.01	0.020 c BC ± 0.01	0.017 c B ± 0.003	0.018 c BC ± 0.01	0.015 c C ± 0.003
Quitinasas								
Qu-M173c	6.43 b C ± 1.47	5.37 bc B ± 0.65	4.75 c C ± 1.14	5.68 bc C ± 0.89	6.45 b B ± 1.28	7.69 ab C ± 0.68	8.13 a D ± 1.30	7.73 ab C ± 0.83
Qu-M363	7.174 c C ± 1.47	6.44 c B ± 0.70	7.54 c B ± 2.69	9.22 c AB ± 2.17	16.50 b A ± 1.70	19.05 b A ± 3.16	26.96 a A ± 5.21	27.27 a A ± 3.37
Qu-M171a	9.99 a B ± 0.25	9.65 a A ± 2.42	6.28 b BC ± 1.06	4.107 c C ± 0.81	5.20 bc B ± 0.82	9.31 a BC ± 1.03	11.05 a CD ± 1.74	6.49 b C ± 1.20
Qu-M156a	12.19 a A ± 1.02	6.50 c B ± 0.94	6.14 c BC ± 1.58	6.36 c BC ± 1.07	6.01 c B ± 1.80	9.23 b BC ± 0.58	7.07 c D ± 0.89	6.96 c C ± 1.11
Qu-M421	12.22 a B ± 2.50	10.44 b A ± 0.56	11.79 b A ± 2.09	11.29 b A ± 5.52	12.88 ab A ± 6.91	13.39 ab B ± 8.62	19.85 a B ± 6.01	8.56 b C ± 1.96
Qu-M430	6.85 c C ± 0.38	6.58 c B ± 1.61	8.47 c B ± 1.60	8.49 bc A ± 1.67	12.82 ab A ± 2.22	11.22 b BC ± 1.68	13.95 a C ± 2.34	11.74 ab B ± 1.55

Medias en la misma fila compartiendo una letra en minúscula no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Medias en la misma columna compartiendo una letra en mayúscula no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Tabla 2.2: Producción de destruxina A por seis cepas de *Metarhizium anisopliae* después de 7 días de incubación.

<i>Cepa</i>	<i>Destruxina A (mg L⁻¹)^{ab}</i>
M156 a	818.02 a
M171a	378.26 a
M430	64.92 a
M363	0.2 b
M421	0.14 b
M173c	134.0 a

^a Mediana de la producción de destruxina A

^b Medianas compartiendo una letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Conover- Inman (p = 0.05).

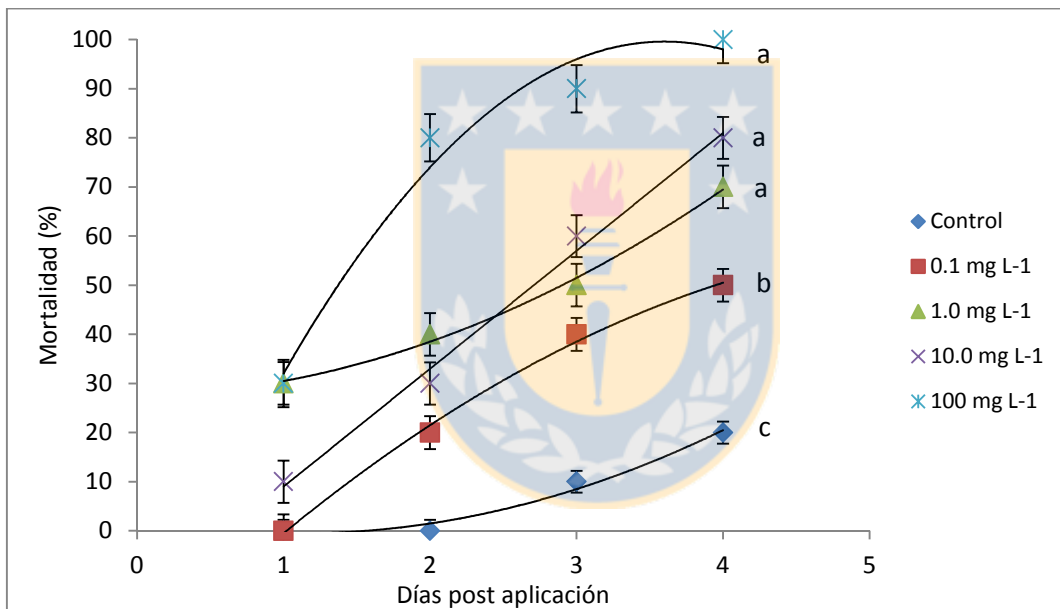


Figura 2.1: Mortalidad acumulada de adultos de *Aegorhinus superciliosus* inoculados con distintas concentraciones de destruxina A.

Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias en el porcentaje de mortalidad, de acuerdo a la prueba de Tukey (p < 0.05).

Barras verticales indican error estándar.

CONCLUSIONES GENERALES

La secuenciación de la región ITS-5.8S rDNA y el análisis filogenético permitieron la identificación de las cepas a nivel de especie, correspondiendo a *Metarhizium anisopliae*. Sin embargo, no permitieron discriminar entre variedades. Las características morfológicas de las conidias de las cepas evaluadas corresponden a las descritas para *M. anisopliae*, y no se observó variabilidad entre las distintas cepas en este carácter. Sí se observó variabilidad en las tasas de crecimiento y desarrollo de las cepas en distintos medios de cultivo. Con respecto a la patogenicidad de estas cepas hacia *A. superciliosus* se observó que es dependiente de la cepa y que es posible alcanzar niveles de mortalidad del 90% mediante la inoculación de adultos de *A. superciliosus* con conidias de *M. anisopliae* cepa Qu-M430.

La actividad de lipasas, proteasas y quitinasas es dependiente de la cepa y del período de incubación. La producción de destruxina A también es dependiente de la cepa y su aplicación de manera directa sobre adultos de *A. superciliosus* permite alcanzar altos niveles de mortalidad.

