

107

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LOS HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*
MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE DNA POLIMÓRFICO
(RAPD).**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

PRESENTA:

ADELA IVETT SALAZAR MACÍAS

TL

SB975

.S25

1998

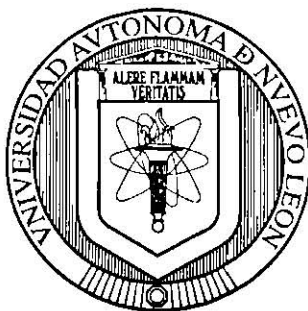
c.1



1080098229

979083

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LOS HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*
MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE DNA POLIMÓRFICO
(RAPD).**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

PRESENTA:

ADELA IVETT SALAZAR MACÍAS

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

SEPTIEMBRE, 1998

TL
SB975
.525
1998



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LOS HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*
MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE DNA POLIMÓRFICO (RAPD).**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**


PRESENTA:

ADELA IVETT SALAZAR MACÍAS

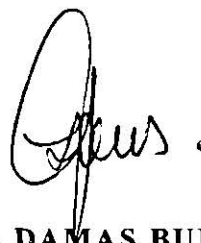
APROBADA :

COMISIÓN DE TESIS

CD. UNIVERSITARIA A 8 DE SEPTIEMBRE DE 1998



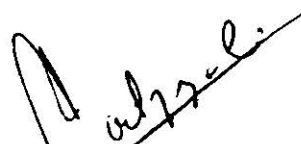
DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ
Presidente



Q.B.P. LUIS C. DAMAS BUENROSTRO
Secretario



DR. LUIS JESÚS GALÁN WONG
Vocal



M.C. JUAN F. CONTRERAS CORDERO
Suplente

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Genética y Biología Molecular Microorganismos. Lab. de Microbiología Industrial y del Suelo, Depto. de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Biológicas/ UANL bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez.

Así mismo en colaboración con el Dr. Mark A. Jackson y Dr. T. J. Poprawski del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) con sede en Peoria, Ill. y Weslaco, Tx., respectivamente.

Dedicatoria

A mis Padres:

Sr. José Angel Salazar Acosta y Sra. Adela Macías de Salazar.

A mis hermanos:

María Graciela y José Angel Salazar Macías

Gracias por el amor, apoyo y ejemplo que siempre he recibido de ustedes, por hacer de la Familia Salazar Macías lo mejor que Dios me pudo haber dado, los quiero mucho y he aquí un poco de lo mucho que les debo.

A toda la familia Salazar y familia Macías:

Gracias por todos los momentos compartidos, los quiero mucho y espero sigamos unidos por siempre.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., al Departamento de Microbiología Industrial, al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Microorganismos y a todos mis maestros por haber participado en mi formación profesional.

A mi director de tesis, Dr. Benito Pereyra Alférez, por el tiempo dedicado a la asesoría de mi trabajo, todos sus consejos y sobre todo sus enseñanzas para mi formación académica y personal.

Al Dr. Luis Jesús Galan Wong, M.C. Juan Francisco Contreras Cordero y Q.B.P. Luis Cástulo Damas Buenrostro por haber aceptado formar parte de mi comité de tesis y por todos sus comentarios para la mejor presentación de este trabajo.

Al Q.B.P. Luis Cástulo Damas Buenrostro, por su asesoría técnica, su paciencia y su amistad, sin la cual hubiera sido mas difícil llegar al final de este trabajo.

Al M.C. Roberto Mercado y M.C. Ricardo Cerda por el apoyo en al análisis estadístico de este trabajo.

Al Laboratorio de Patología Molecular por su amabilidad en permitir que utilizara parte de su equipo, especialmente el Termociclador.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Microorganismos, Magda, Zack, Luis, Roberto, Myriam A., Ismael, Ernesto Myriam E. y Alma, por su gran compañerismo y por hacer mucho más agradable el trabajo en el laboratorio, muchas gracias y mucha suerte.

A todos mis amigos y compañeros de la F.C.B. por su amistad y apoyo durante estos años y por tantos bonitos recuerdos que guardo de ustedes.

Al Q.B.P. Luis Alberto Hernández Quiroga por todos los momentos que hemos compartido, tu apoyo y consejos siempre sinceros pero principalmente por ser mucho mas que mi mejor amigo.

Al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), especialmente al Dr. Mark A. Jackson, Dr. T.J. Poprawski y Dr. Antonio Guerra por haber participado en este trabajo por medio del proyecto No. MX-ARS-5 con grant No. FG-MX-104.

A todos ustedes muchas gracias

INDICE

	Página
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de Abreviaturas	v
Indice de Tablas	vi
Indice de Figuras	vii
Resumen	1
Introducción	2
Hipótesis y Objetivos	5
Antecedentes	6
I. El uso generalizado del control químico	6
II. Control Biológico como alternativa al control químico	6
III. Hongos entomopatógenos dentro del control biológico	7
IV. Proceso de infección y producción de metabolitos	10
V. <i>B. bassiana</i> y <i>P. fumosoroseus</i> como insecticidas microbiales	14
VI. Identificación de Hongos mediante técnicas tradicionales	16
VII. Técnicas moleculares genéticas aplicadas a hongos	17
VIII. Principio de la técnica de Amplificación al Azar de DNA polimórfico	18
IX. Antecedentes de los RAPD's como marcadores genéticos	19
Materiales y Métodos	24
I. Cepas y condiciones de cultivo	24
II. Purificación de DNA	25

III. Iniciadores	25
IV. RAPD - PCR	25
V. Análisis de los resultados	27
Resultados	29
Discusión	44
Conclusiones	50
Apéndices	51
A. Talla Molecular (pares de bases) de los productos de RAPD's obtenidos con diferentes iniciadores * a partir de las cepas de <i>B. bassiana</i> .	51
B. Talla Molecular (pares de bases) de los productos de RAPD's obtenidos con diferentes iniciadores * a partir de las cepas de <i>P. fumosoroseus</i> .	54
C. Patrón de amplificación genética de <i>B. bassiana</i> cepas SARL 137 , SARL 139, SARL 141, 291/ 95, BB 2.	58
D. Patrón de amplificación genética de <i>P. fumosoroseus</i> cepas SARL 76 , SARL 114, SARL 115, 270/ 97, M-84, M-846, M-32.	60
E. Dendograma de <i>B. bassiana</i> usando los iniciadores OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-11, OPA-13, OPA-18, OPA-19	63
F. Dendograma de <i>P. fumosoroseus</i> usando los iniciadores OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-11, OPA-13, OPA-18(panel G), OPA-19(panel H).	66
G. Cuantificación de DNA	69
H. Electroforésis de geles de Agarosa y Poliacrilamida	70
I. Medios de Cultivo y Soluciones	72
Literatura Citada	75

Lista de Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
° C	Grado Celsius
dNTP's	Mezcla de Desoxirribonucleótidos Trifosfatados
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético
<i>et al.</i>	Colaboradores
G	Gramo (s)
h	Hora (s)
Kpb	Kilopares de bases
l	Litro
lb/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
mg	Miligramo (s)
µg	Microgramo (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
µl	Microlitro
ng	Nanogramo (s)
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso Molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio (siglas en inglés)
seg	Segundo (s)
U	Unidades de actividad enzimática
V	Voltios
X	Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Principales grupos de hongos entomopatógenos	8
2	Ejemplos exitosos de control biológico por hongos entomopatógenos	11
3	Compuestos tóxicos producidos por algunos hongos entomopatógenos	13
4	Cepas de los hongos a utilizar en este trabajo	24
5	Clave, Secuencia y Porcentaje de G+C de los iniciadores utilizados en los RAPD's	26
6	Condiciones de ensayo para una muestra	26
7	Talla Molecular (pares de bases) de los productos de RAPD's obtenidos con varios iniciadores * a partir de <i>B. bassiana</i> cepas BBGHA y SARL 142	34
8	Talla Molecular (pares de bases) de los productos de RAPD's obtenidos con varios iniciadores * a partir de <i>P. fumosoroseus</i> cepas Pfr. 612 y UAN- 7	36
9	Valores de disimilitud (Vd) genética entre <i>B. bassiana</i> y <i>P. fumosoroseus</i>	37

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Esquema general de una reacción de RAPD-PCR	19
2	Efecto de la concentración de acetato de sodio sobre la extracción de DNA a partir de <i>P. fumosoroseus</i> cepa SARL 115.	29
3	Patrón de amplificación usando DNA de <i>P. fumosoroseus</i> cepa SARL 115 y <i>B. bassiana</i> cepa BB GHA extraído con 0.0 y 270 mM de acetato de sodio, usando el iniciador OPA-13.	30
4	Efecto de la concentración de DNA sobre el patrón de amplificación genética a partir de <i>P. fumosoroseus</i> y <i>B. bassiana</i> , usando el iniciador OPA-13.	31
5	Patrón de amplificación genética de <i>B. bassiana</i> cepas BB GHA y SARL 142.	33
6	Patrón de amplificación genética de <i>P. fumosoroseus</i> cepas Pfr. 612 y UAN-7.	35
7	Análisis de Componentes Principales y Dendograma de <i>B. bassiana</i> , utilizando los iniciadores OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-11, OPA-13, OPA-18, OPA-19.	39
8	Análisis de Componentes Principales y Dendograma de <i>P. fumosoroseus</i> , utilizando los iniciadores OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-11, OPA-13, OPA-18, OPA-19.	41

Resumen

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), son microorganismos con gran potencial para utilizarse como insecticidas microbiales en el biocontrol de plagas económicamente importantes, como la "mosquita blanca" (*Bemisia tabaci*). Con el fin de evaluar la variabilidad genética en estos hongos, seleccionamos 7 cepas de *B. bassiana* y 9 cepas de *P. fumosoroseus* las cuales poseen diferente hospedero y origen geográfico. Se utilizaron iniciadores de 10 bases con secuencia aleatoria para generar marcadores mediante la técnica de Amplificación al Azar de DNA Polimórfico (RAPDs), los cuales nos permitieron identificar estos entomopatógenos. De las 16 cepas 4 fueron aisladas en México, 9 en E.U.A. y 3 son mutantes obtenidas de *P. fumosoroseus* cepa P.fr. 612. Diseñamos un método simple y rápido para la extracción de DNA en estos hongos, modificando la concentración de sal de 1.0 M a 0.0-240 mM. Los ensayos de amplificación fueron realizados probando 20 distintos iniciadores (10 bases), el patrón de amplificación fue consistente y reproducible con 8 iniciadores, los cuales generaron de 4 a 17 bandas por iniciador variando en tamaños de 0.1 a 4.0 kpb. Cada aislado generó un genotipo distinto, tanto en número como en tamaño de bandas. El análisis del Valor de Disimilitud (1-F) entre cepas, mostró que las cepas de *P. fumosoroseus* presentaron un valor promedio 1-F de 0.48, mientras que *B. bassiana* presentó un valor de disimilitud de 0.55, mostrándose que estas cepas poseen un grado de divergencia genética aun mas alto que las cepas de *P. fumosoroseus*, esto podría estar relacionado con el hecho de que cada cepa de *B. bassiana* fue aislada de distinto hospedero, mientras que la mayoría de las cepas de *P. fumosoroseus* se aislaron a partir de *Bemisia tabaci*. Finalmente se realizó un análisis de agrupamiento, para observar similitud y construir un dendograma. Mediante este análisis se logró agrupar las cepas, según su origen geográfico, u hospedero del cual fue aislado, así mismo se logró separar en un grupo definido a la cepa P.fr.612 y sus mutantes.

Introducción

El impacto adverso de las plagas y enfermedades en la producción agrícola y forestal es, comúnmente, disminuido por el uso de agentes químicos. Se ha estimado que el ataque de insectos, malezas y algunos microorganismos causan pérdidas de alrededor del 40% de los cultivos en precosecha, y un 40% adicional tendrá el mismo futuro en el almacén si no se aplican plaguicidas. Sin embargo, el uso intensivo de éstos ha traído consigo contaminación de los mantos freáticos, suelos y actividad contra organismos no blanco. Además, se han incrementado los problemas con la aparición de resistencia en cerca de 500 artrópodos plaga (Whitten. 1990). Entre las alternativas para disminuir el efecto nocivo de estos agentes, se encuentra el control biológico (Samsinakova. 1981).

El control biológico utiliza enemigos naturales de los insectos plaga, dividiéndose en entomofagos y entomopatógenos, de los cuales los entomopatógenos son los de mayor éxito comercial sobresaliendo bacterias, hongos y virus. Recientemente, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, el control biológico se ha definido como el uso de organismos naturales o modificados genéticamente, genes o sus productos para reducir el efecto nocivo de un organismo en favor de otro (Gabriel y Cook. 1990).

El uso de entomofagos o entomopatógenos depende de muchas consideraciones, entre las que se encuentran: 1) ecología del patógeno y su blanco, espectro de acción 2) accesibilidad del agente de control a la plaga, 3) conocimiento básico del modo de acción y 4) disponibilidad de tecnologías de producción, formulación y aplicación del entomopatógeno (Khachaturians. 1986; Samson *et al.*, 1988a; Lisansky. 1989). En este sentido uno de los organismos de mayor potencial biotecnológico son los hongos, estos constituyen la población mas numerosa en cuanto a microorganismos patógenos de insectos y sus enfermedades están ampliamente distribuidas causando frecuentemente epizootias (Whitten. 1990). Se puede decir que virtualmente, todos los órdenes de insectos son susceptibles al ataque de una o varias especies. A pesar de ello, de las 700 especies conocidas de hongos entomopatógenos (distribuidas en seis grupos taxonómicos), solamente 10 especies han sido utilizadas en programas de biocontrol, sobresaliendo los

pertencientes a los Deuteromycetos (Samson *et al.*, 1988a). Dentro de los Deuteromycetos se encuentran varios géneros como *Beauveria* y *Paecilomyces* los cuales, debido a su capacidad para infectar insectos, están siendo desarrollados como insecticidas microbiales para el control de la “mosquita blanca” (*Bemisia tabaci*), entre otros (Storey. 1992). Estos hongos parecen ser la mejor opción para el control biológico de este insecto, y gracias al uso de estos enemigos naturales, se ha disminuido la aplicación de insecticidas químicos (Jackson. 1996).

El uso de hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga requiere de un conocimiento básico sobre estos agentes, y ahora que éstos se producen comercialmente, se necesitan sistemas de detección y selección altamente específicos y sensibles para distinguir entre biotipos y patotipos, sobre todo porque el evento de micosis en los insectos, depende de múltiples factores, requiriéndose de adhesión de las conidias al insecto, producción de exoenzimas, tubo germinativo, etc, y por otra parte la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos es grande. lo que hace que la selección de cepas virulentas se convierta en un sistema laborioso y costoso (Bidochka. 1994).

Tradicionalmente, la detección e identificación de los hongos se basaba en características bioquímicas y morfológicas, como la producción de conidias, morfología colonial, enzimas hidrolíticas, isoenzimas y reacciones inmunológicas. Sin embargo, estos métodos difícilmente pueden discriminar entre cepas con estrecha relación pero diferente especificidad o virulencia, una alternativa a estos métodos es el uso de marcadores genéticos (Hedegus. 1993).

El manejo de estos marcadores tienen grandes ventajas sobre las técnicas tradicionales, la principal radica en su poder discriminatorio y sensibilidad para distinguir entre cepas, biotipos y patotipos (Faber. 1996). Este tipo de tecnología se ha utilizado en mapeo genético, diagnóstico, taxonomía molecular, identificación, estudios evolutivos y variación genética.

Recientemente, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con iniciadores (primers) al azar, también conocida como Amplificación al Azar de DNA Polimórfico (RAPD), se ha utilizado para estudiar variabilidad genética entre poblaciones de hongos (Williams. 1993).

Esta técnica es la más adecuada para poder diseñar sistemas que nos permitan encontrar un marcador genético que nos indique virulencia y/o especificidad. ya que el establecimiento de RAPD con varios iniciadores, permite el análisis de cepas de diverso origen y especificidad. De esta manera, podríamos analizar un gran número de aislados, someterlos a la prueba y predecir el resultado de virulencia o especificidad.

Es indiscutible que el futuro de los entomopatógenos es promisorio, pero aún existen limitantes culturales y biotecnológicas que han impedido el avance a pasos mas acelerados. El progreso en la fisiología del patógeno y los estudios de genética y ecología de la relación patógeno-insecto, traerá grandes beneficios en el corto plazo. Este beneficio redundará en tener un tipo de control de plagas mas compatible con el medio ambiente y con nosotros mismos.

Hipótesis

El uso de la amplificación al azar de DNA polimórfico nos permitirá diferenciar entre cepas de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*.

Objetivo General

Desarrollar un sistema de identificación de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* utilizando marcadores genéticos.

Objetivos Particulares

1. Desarrollar un método rápido y eficiente de extracción de DNA a partir de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*.
2. Diseñar un sistema de Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD-PCR) para *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*.
3. Seleccionar marcadores genéticos que nos permitan evaluar variabilidad genética en *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*.

Antecedentes

I. El uso generalizado del control químico

El impacto adverso de las plagas y enfermedades en la producción agrícola y forestal es, comúnmente, aligerado por el control químico, el cual es utilizado desde 1940. Se ha estimado que alrededor del 40% de los cultivos en precosecha se pierde debido al ataque de insectos, malezas, y algunos microorganismos, y el 40% adicional tendrá el mismo futuro sin la aplicación de un plaguicida. Sin embargo, el uso intensivo de los plaguicidas ha traído consigo contaminación de los mantos freáticos, suelos y actividad contra organismos no blanco y la aparición de resistencia, la cual se ha incrementado sensiblemente. Se ha estimado que actualmente existen cerca de 500 artrópodos que han desarrollado resistencia a algún tipo de insecticida (Whitten. 1990). Entre las alternativas para disminuir el efecto nocivo de estos agentes, se encuentra el control biológico (Samsinakova. 1981).

II. Control Biológico como alternativa al control químico

Entre los métodos alternativos para controlar los insectos plaga se encuentran el cultural, etiológico, legal y biológico, este último emerge como un método científico al final de la centuria pasada (Tejada. 1993). El control biológico se define, según Smith, como el uso de enemigos naturales, introducidos en una nueva zona o bien manipulados, con el objeto de controlar las plagas. Actualmente, se ha convertido en una ciencia práctica muy aceptada, ya que es un método selectivo, compatible y no contamina. Además con las nuevas técnicas de producción y aplicación aunado a un mayor entendimiento de la fisiología del insecto y el patógeno han dado a los insecticidas biológicos la capacidad de competir de mejor manera con los tradicionales plaguicidas químicos (Samson. 1993).

Se ha observado que, los insectos son blanco al ataque de una gran variedad de microorganismos entre los que destacan virus, bacterias, hongos y protozoarios. Actualmente se conocen mas de 100,000 especies de microorganismos destacándose como entomopatógenos alrededor de 750 especies de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y cerca de 100 especies

de bacterias. Estos microorganismos se usan en el control microbiológico de poblaciones de insectos plaga de importancia agrícola, forestal, ornamental y salud pública (Feng *et al.*, 1992).

III. Hongos entomopatógenos dentro del control biológico

Los hongos constituyen la población mas numerosa en cuanto a microorganismos patógenos de insectos (Tabla 1) y muchos de estos son importantes en el control natural de plagas de insectos como abejas, “chapulines”, larvas de escarabajos, y otros (Whitten. 1990). También se han asociado a insectos de diversos habitats incluyendo ríos, suelo, superficies de suelo y aire. En Cuba, Montes y col. (1981) encontraron que hongos, bacterias y nemátodos fueron causa predominante de mortalidad en adultos, larvas y pupas de *Pachnaeus lilus* y que cerca del 50% de los insectos murieron debido al hongo *Metarhizium anisopliae*. La posibilidad de utilizar hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga fueron consideradas por primera vez en la ultima parte del siglo XIX. La idea se volvió muy popular durante ese periodo, y por varias décadas se hicieron intentos a través de todo el mundo para reducir la población de insectos mediante la distribución artificial de hongos patógenos. Algunos de estos intentos tuvieron éxito, indicando que las enfermedades fungosas podrían ser utilizadas ventajosamente. Sin embargo se tuvieron muchas fallas, debido a que no se comprendían las condiciones optimas necesarias para una actividad del hongo.

En 1958 Baaird indico cuales son los factores que regulan la efectividad de un hongo en el control biológico.

Estos incluyen:

- Condiciones climáticas para la época de aplicación
- Densidad de población del huésped
- Micro-habitat del patógeno y huésped
- Virulencia del hongo y Resistencia del huésped
- Punto de saturación del patógeno en el medio ambiente
- Facilidad de propagación artificial y distribución del hongo
- Capacidad del hongo para sobrevivir y diseminarse en una población de insectos
- Efecto del patógeno sobre otros agentes biológicos de control
- Valor económico de tales medidas de control

Tabla 1. Principales grupos de hongos entomopatógenos.

<p><u>Chytridiomycota-Chytridiales</u></p>	<p><u>Deuteromycota</u></p>
<p><i>Coelomycidium</i> <i>Myiophagus</i></p>	<p><i>Acremonium</i> <i>Akanthomyces</i> <i>Aschersonia</i> <i>Aspergillus</i></p>
<p><u>Blastocladales</u></p>	<p><i>Beauveria</i></p>
<p><i>Coelomomyces</i></p>	<p><i>Culicinomyces</i> <i>Engyodontium</i> <i>Funicularis</i> <i>Fusarium</i> <i>Gibellula</i> <i>Hirsutella</i> <i>Hymenostilbe</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Paraisaria</i> <i>Pleurodesmospora</i> <i>Polycephalomyces</i> <i>Pseudogibellula</i> <i>Sorospora</i> <i>Sporothrix</i> <i>'Stilbella'</i> <i>Tetracrium</i> <i>Tetranacrium</i> <i>Tilachlidium</i> <i>Tolypocladium</i> <i>Verticillium</i></p>
<p><u>Oomycota-Lagenidiales</u></p>	
<p><i>Lagenidium</i></p>	
<p><u>Oomycota-Saprolegniales</u></p>	
<p><i>Leptolegnia conchia</i></p>	
<p><u>Zygomycota-Mucorales</u></p>	
<p><i>Sporodiniella</i></p>	
<p><u>Zygomycota-Entomophthorales</u></p>	
<p><i>Conidiobolus</i> <i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Massospora</i> <i>Meristacrum</i> <i>Neozygites</i></p>	
<p><u>Ascomycota</u></p>	
<p><i>Ascospaera</i> <i>Atricordyceps</i> <i>'Calonectria'</i> <i>Cordycepioideus</i> <i>Cordyceps</i> <i>Hypocrella</i> <i>Myriangium</i> <i>Nectria</i> <i>Podonectria</i> <i>Torrubiella</i></p>	

*Adaptada de Samson Robert A. , Evans Harry C. 1988

Se ha reportado que existen alrededor de 500 tipos de hongos asociados con insectos y algunos de ellos causan verdaderas epizootias en una amplia gama de insectos de los órdenes Lepidóptera (palomillas y mariposas), Homóptera (áfidos e insectos trepadores), Hymenóptera (abejas y avispas), Coleóptera (escarabajos) y Díptera (moscas y mosquitos). En realidad algunos de estos hongos tienen un espectro de hospedero muy amplio. Entre estos hongos se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii*, todos ellos teniendo una distribución mundial. Algunos otros hongos son asociados con tipos particulares de huéspedes; por ejemplo *Hirsutella thompsonii* con ácaros (Arachnida) y el hongo acuático *Coelomomyces* y *Culicinimyces* sp. con mosquitos.

El modo de infección de estos hongos es complejo y multifactorial, iniciándose por la penetración de la cutícula del hospedero y el simple movimiento del insecto susceptible a través del suelo inoculado es suficiente para iniciar el proceso. Este modo de infección hace a los hongos mas convenientes para el ataque de insectos del suelo, que los virus, protozoarios, o bacterias, ya que estos microorganismos; necesariamente, tienen que ser ingeridos por el insecto y penetrar al hospedero a través del tracto digestivo (Storey. 1992).

Debido a esto, los hongos son los principales patógenos de insectos con aparato bucal picador-chupador, ya que no pueden ingerir otros patógenos que infectan a través del tracto digestivo. Además, son los mas importantes en el control de coleópteros, donde no son comunes las enfermedades virales y bacterianas (Hajek. 1994). Lo anterior entre otras cosas, ha logrado que el interés por los hongos entomopatógenos como sustituto potencial para los insecticidas químicos se haya incrementado en años recientes (Samsinakova. 1981). Y aunque individualmente muchos hongos son altamente específicos para un solo hospedero, el gran número de hongos patógenos de insectos permiten que un alto número de plagas sean atacadas con micoinsecticidas (Whitten. 1990). De hecho cualquier orden de insectos puede ser susceptible a una enfermedad causada por un hongo (Hajek. 1994).

A pesar de esto, solo unos cuantos hongos se han producido comercialmente. La razón principal por la que todavía se piensa en los micoinsecticidas con cierto escepticismo es debido a

su pobre acción en campo, frecuentemente se piensa que se requiere de altos niveles de humedad relativa (HR) en campo, para poder lograr persistencia e infectividad. esta idea se basa probablemente en la observación casual de una mayor incidencia aparente de hongos después de las lluvias. Esto restringiría su uso solo a insectos acuáticos o de ambientes muy húmedos; sin embargo, los trabajos que han examinado metódicamente este requerimiento indican que los niveles permisivos de HR son en varios casos menores que 100% (Sanchez. 1993).

De esta manera Ferrón (1977), reportó infección por *B.bassiana* en el escarabajo *Acanthoscelides obtectus* a cualquier nivel de HR. Por otro lado Ramoska (1984), observó niveles similares de mortalidad en la chinche *Blissus leucopterus* a una humedad entre el 30 y 100%. En cuanto al tiempo tan largo (72 h) para matar al insecto, se podría lograr alguna mejoría por selección de variantes naturales y su posterior incorporación a cepas comerciales por medio de fusión de protoplastos. Ha sido difícil incrementar la toxicidad mediante ingeniería genética, ya que no se tiene muy claro qué genes deben de ser transferidos, esto debido a lo poco que se conoce de las bases moleculares y genéticas de la interacción hospedero-patógeno. Sin embargo, a pesar de estas dificultades, los hongos han sido utilizados exitosamente en algunos casos y han sido usados mas frecuentemente en el bloque Soviético que en el Oeste (Tabla 2).

Atención especial ha sido dada a su papel de controlar áfidos e insectos trepadores, debido a que estas plagas casi nunca son infectados por otros microorganismos y algunos áfidos desarrollan múltiple resistencia a los insecticidas utilizados (Whitten.1990).

IV. Proceso de infección y producción de metabolitos

El modo de acción de los entomopatógenos es determinado por la invasión del hospedero por el hongo y, en muchos casos, de la síntesis de metabolitos secundarios que pueden actuar como toxinas. Durante el proceso patogénico, se llevan a cabo diversos cambios bioquímicos, diferenciación celular y formación de estructuras especializadas. La patogénesis de los hongos entomopatógenos se inicia con la adhesión de la conidia (espora) a la cutícula del insecto.

Tabla 2.- Ejemplos exitosos de control biológico por hongos entomopatógenos.

Hongo Patógeno	Insectos Huésped
<i>Entomophthora aulicae</i>	Larvas de la palomilla de la cola café (<i>Nygmia phaeorrhoea</i>)
<i>Entomophthora</i> sp.	Chinche verde del manzano (<i>Lygus comunis</i> var. <i>novascotiensis</i> knight)
	Chupador de la manzana (<i>Psylla mali</i>)
<i>Beauveria bassiana</i>	Escarabajo de la papa de Colorado
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Acaro de los cítricos
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Saltador de la rana (caña de azúcar)
<i>Verticillium lecanii</i>	Afidos (cultivos de invernaderos)
	Mosca blanca (cultivos de invernadero)

En la mayoría de las micosis, este proceso es totalmente al azar y el éxito de este contacto dependerá de la secreción de una sustancia mucosa, iniciándose interacciones hidrofóbicas entre la conidia y la epicutícula (Boucias y Pendlann, 1991). Esta infección puede ser abortada en la epicutícula si llegase a faltar algún factor esencial en la fase de adhesión, en el desarrollo microbiano, o falta de patogenicidad (Hajek, 1994). Este evento de unión puede depender de aspectos bioquímicos y/o topográficos donde se ha demostrado que los micropliegues de la epicutícula juegan un papel importante en la germinación (St.Leger *et al.*, 1991).

Durante el paso de la epicutícula hacia el hemocele, el hongo se encuentra con la presencia de componentes cuticulares como: proteínas, quitina, lípidos, ceras, quinonas, melanina, difenoles, carbohidratos y otros. Algunos pueden ser utilizados como fuente de energía para los hongos; mientras que otros por el contrario pueden inhibir su crecimiento, tal es el caso de los difenoles, lípidos y quinonas (Wen-Feng, 1992). Sin embargo, solo algunas evidencias indican que estos compuestos puedan estar involucrados en la resistencia de algunos insectos a la

enfermedad (Hajek.1994). Una vez que la conidia se ha colocado sobre la epicutícula del hospedero, ésta sufre cambios morfológicos importantes para iniciar la germinación y penetración.

Durante la penetración de la cutícula del insecto, los hongos producen algunos metabolitos propios, como enzimas que degradan la cutícula, que inhiben procesos selectivos o algunas enzimas del hospedero, además de que interfieran con sistemas regulatorios del insecto. Tales daños, pueden estar asociados a los síntomas de la enfermedad, y pueden ser producidos por enzimas del patógeno o por sus metabolitos de bajo peso molecular (toxinas). Uno de los ejemplos mas claros es la destruxina sintetizada por *M. anisopliae*. Este tipo de metabolitos pueden afectar varios organelos (mitocondria, retículo endoplasmático y membrana nuclear), paraliza las células y causa disfunción del intestino medio, túbulos de Malpighium, hemocitos y tejido muscular (Samuels *et al.*, 1988; Vey y Quiot. 1989).

Otras toxinas tipo depsipéptidos cíclicos como la beauvericina, producida por *Verticillium lecanii*, la basionalida, producida por *B. bassiana* funcionan como iónoforos endocelulares y las citocalasinas las cuales pueden paralizar al hospedero (Tabla 3). Sin duda alguna, muchas enzimas producidas por los patógenos son determinantes de virulencia importantes ya que permiten que el patógeno coexista con el metabolismo tan cambiante del hospedero enfermo. Sin embargo, se tiene muy poca información acerca de el papel particular que juegan las enzimas o toxinas dentro de la virulencia de los hongos (Hajek.1994). A la fecha, se han identificado varias toxinas, pero se requiere comprobar que estas moléculas se producen durante la infección, por ejemplo se ha observado que la muerte de larvas de *H. zea* debida a *B. bassiana*, no implica la acción de ninguna toxina (Cheung. 1982). Muchos hongos tienen la capacidad de producirlas, sin embargo aun y cuando algunas de estas han sido descritas químicamente, los estudios toxicológicos no dejan claro su papel en la patogénesis. Finalmente, después de la penetración del hongo, el éxito de la infección dependerá del potencial genético que tenga el hongo para crecer rápidamente, evadir las barreras inducidas por él, y la resistencia a las sustancias tóxicas que produce el insecto, ya que el hospedero también es capaz de sintetizar compuestos que inhiban el crecimiento del hongo, previniendo la infección letal.

Tabla 3.- Compuestos tóxicos producidos por algunos hongos entomopatógenos.

Hongo	Producto	Tipo de molécula	Modo de Acción
<i>Beauveria bassiana</i>	Beauvericina	Depsipéptido cíclico	Ionóforo
	Bassionalida	Depsipéptido cíclico	Ionóforo
	Exoenzimas	Lipasas, proteasas, quitinasas, quitinobiasa, esterasas, N-acetil-glucosaminidasa	
<i>Entomophthora coronata</i>	Exoenzimas	Lipasas, proteasas, quitinasas,	
<i>Fusarium solani</i>	Eniantinas	Depsipéptido cíclico	Ionóforo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Exoenzimas	P1 (Serino-proteasa) P2 (Cisteinil-proteasa) Quitinasa y quitinobiasa Pr 1 (Quitinoelastatasas) Lipasas,esterasas N-acetil-glucosaminidasa	
	Destruccina	Depsipéptido cíclico	Paralizan las células del hospedero
	Citocalasinas	Depsipéptido cíclico	
<i>Paecilomyces sp.</i>	Leucinostatinas	Péptido lineal	Ionóforo
			Ionóforo
<i>Tolypocladium sp.</i>	Efraeptinas	Péptido lineal	
<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ciclosporinas	Undecapéptidos cíclicos	Inmunosupresores
			Ionóforo
<i>Verticillium lecanii</i>	Beauvericina	Depsipéptido cíclico	

Uno de esos compuestos es una pequeña proteína de 67 aminoácidos producida por *Sarcophaga peregrina*, la cual facilita la acción de muchas otras proteínas en el reconocimiento y eliminación del hongo (Hajek.1994).

Como hemos visto, el éxito de una micosis es multifactorial, donde se involucran desde aspectos topográficos de la cutícula del insecto hasta la síntesis de toxinas. Por esta razón, la mayoría de los esfuerzos biotecnológicos de producción de hongos entomopatógenos esta dirigido hacia la producción masiva de conidias. Aún existen algunos problemas por resolver acerca de cómo producir cepas con patogenicidad incrementada, así como de formulación, aplicación y comercialización de los micoinsecticidas, ya que ninguno de los productos que ha alcanzado el nivel de uso, ha logrado competir con los insecticidas químicos. Sin embargo la lista de ventajas que apoyan el uso de hongos entomopatógenos como control biológico es impresionante:

- Seguro, al compararse con el método químico
- Afectan generalmente todos los estadios de desarrollo de sus huéspedes
- Tienen un amplio espectro de huéspedes
- No altera el medio ambiente, ya que no desequilibra el balance ecológico
- Generalmente persistente
- Compatible con otros agentes de control
- Menos posibilidad de crear resistencia, al compararse con insecticidas químicos
- Manipulable genéticamente (Samson. 1988).

V. *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* como insecticidas microbiales

Existen varios grupos principales de hongos entomopatógenos. Dentro de los Deuteromycetes, se encuentran un gran numero de géneros como *Aschersonia*, *Verticillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Beauveria* y *Paecilomyces* de gran importancia en control natural y biológico (Sánchez. 1993). Los dos últimos debido a su compatibilidad para infectar insectos, están siendo desarrollados como insecticidas microbiales para el control de *Bemisia tabaci* (mosquita blanca de la papa y el algodón) (Storey. 1992).

Se ha reportado que *B. tabaci* ataca alrededor de 600 tipos distintos de plantas en climas húmedos e invernaderos de todo el mundo. Esta plaga ha sido controlada con *B. bassiana* y *P.*

fumosoroseus evitando así, la reiterada aplicación de insecticidas químicos en cultivos atacados por la mosquita blanca (Jackson. 1996).

B. bassiana se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y puede infectar a más de 70 especies de insectos (Alyeshina. 1978). Es, además, el patógeno más frecuentemente aislado de cadáveres de insectos o insectos moribundos en la naturaleza (Khachatourians.1987). *B. bassiana* produce varias enzimas extracelulares, incluyendo proteinasas, lipasas y quitinasas. Las proteinasas y quitinasas actúan en secuencia y son necesarias para que el tubo germinativo penetre en el tegumento (Smith. 1981). Este paso es de primordial importancia en la patogenicidad del hongo, debido a las funciones que realiza como barrera física a la penetración de las hifas (Smith. 1983).

Por otro lado *P. fumosoroseus* es una especie ampliamente distribuida en el mundo, la cual puede infectar diversos órdenes de insectos en todos los estadios de desarrollo. Considerando su gran virulencia a muchas plagas agrícolas, incluyendo la mosquita blanca, se está desarrollando comercialmente en los Estados Unidos de América para utilizarlo como bioplaguicida (Tigano-Milani. 1992). Esta cepa presenta varias características, que no están asociadas normalmente con los hongos entomopatógenos como son: rápida mortalidad del insecto blanco así como tolerancia a la mayoría de los fungicidas utilizados en invernaderos, haciéndolo compatible con prácticas culturales.

Un requerimiento primario para el empleo de un hongo entomopatógeno como insecticida biológico es por una parte la susceptibilidad del insecto hospedero y por otro la virulencia del hongo (Samsinakova. 1983). Roberts y Yendol (1971) señalaron que una sola especie fúngica, puede contener cepas que son muy divergentes en su virulencia y fisiología. *B. bassiana* ha sido reportado en cientos de especies de insectos y aunque la mayoría de los aislados de son morfológicamente indistinguibles, las cepas difieren considerablemente en su actividad contra un determinado insecto (Tan. 1991).

Por otro lado se ha observado que las cepas de *Paecilomyces sp.* pueden diferir en su virulencia hacia el insecto (Joseph. 1993). Estas diferencias son de crucial importancia; ya que es indispensable seleccionar, dentro de una especie morfológica, las cepas o patotipos mas agresivos hacia determinados hospederos para su utilización en control biológico (Sánchez. 1993).

VI. Identificación de Hongos mediante técnicas tradicionales

Muchas especies de entomopatógenos fúngicos están compuestas por un grupo diverso de cepas, pero esas cepas generalmente no pueden ser diferenciadas mediante criterios morfológicos. (Hajek.1994). Debido a lo anterior y para considerar su potencial económico, se requiere implementar un método estándar para su identificación. Antes del advenimiento de las técnicas moleculares, la detección y clasificación de los hongos entomopatógenos se basaban en características bioquímicas y morfológicas.

Refiriéndose esto a la producción de conidias, morfología colonial, enzimas hidrolíticas, isoenzimas y reacciones inmunológicas. Se han empleado anticuerpos dirigidos contra ciertas proteínas fúngicas para diferenciar especies (Hajek *et al.*, 1991); sin embargo, estos anticuerpos frecuentemente son incapaces de discriminar a nivel de subespecie o para asociar con especificidad o virulencia. Por otra parte, la detección de aloenzimas generó los primeros marcadores no ambiguos en cantidad suficiente para efectuar estudios genéticos confiables (Boucias *et al.*, 1982; Soper *et al.*, 1983). Uno de los inconvenientes de esta técnica, es la propagación del hongo bajo condiciones ambientales y nutricionales estrictas o el uso de métodos analíticos estandarizados, además de estar limitadas para discriminar a nivel de subespecie (Hedegus. 1993; Hajek. 1994). Esta clasificación taxonómica es cuestionable, y ahora que varios de estos hongos están siendo producidos comercialmente, se requieren de sistemas de detección altamente específicos y sensibles (Bidochka. 1994).

VII. Técnicas moleculares genéticas aplicadas a hongos

Las técnicas moleculares para el uso de marcadores genéticos tienen grandes ventajas sobre las técnicas tradicionales, la principal es su poder discriminatorio, y su capacidad para distinguir entre cepas muy cercanas (Faber. 1996).

Hasta 1980, existía muy poca información referente a la genética de los hongos entomopatógenos, excepto en lo concerniente a la variación en la patogenicidad de distintas cepas. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, el conocimiento sobre la variabilidad intraespecífica ha aumentado rápidamente.

Se han desarrollado marcadores para los análisis poblacionales utilizando polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP: “Restriction Fragment Length Polimorphism”) a partir del DNA total (Hajek *et al.*, 1990, 1991b; Walsh *et al.*, 1990). Otras técnicas aplicadas recientemente incluyen el análisis de secuencias del ARNr (Rakotonirainy *et al.*, 1991), y el análisis electroforético de cromosomas mediante la técnica de fraccionamiento en campo eléctrico homogéneo de contorno asegurado (CHEF, Contour-clamped Homogeneous Electric Field) (Shimizu *et al.*, 1992).

Mediante análisis de RFLP se ha evaluado la identificación de cepas comercialmente importantes (Wieland. 1992). Empleando esta técnica, se logró diferenciar entre una cepa virulenta y una mutante menos virulenta de *B. bassiana* (Kosir. 1991). El análisis del DNA mitocondrial de cinco géneros de hongos reveló, cierto polimorfismo el cual puede ser utilizado en identificación (Hedegus. 1993). Con esta técnica fue posible observar un alto grado de polimorfismo al analizar la variación en el gen del DNA ribosomal del género *Beauveria*, pudiendo agrupar el total de 28 cepas analizadas en 7 grupos distintos (Neueglise. 1994).

El análisis de los RFLPs han sido usados para evaluar cepas del complejo de especies *E. aulicae* causales de epizootias en el noreste de EUA en poblaciones de la “palomilla gitana” (*L. dispar*). Este hongo jamás había sido reportado antes en la palomilla gitana en EUA, aunque hubo un intento para introducirlo como agente de control biológico en 1910-1911 (Speare y Colley.

1912). Como hemos visto, el evento de micosis en los insectos, depende de múltiples factores, y la variabilidad genética de los entomopatógenos es grande, además el proceso de selección de un entomopatógeno es largo y costoso, ya que es necesario realizar bioensayos contra varios tipos de plagas.

Por esta razón, es imperioso diseñar sistemas que nos permitan encontrar un marcador genético que nos indique virulencia y/o especificidad.

VIII. Principio de la técnica de Amplificación al Azar de DNA polimórfico

Welsh y McClelland (1990) y Williams *et al.*, (1990) describieron un método para evaluar variabilidad genética basada en la amplificación aleatoria de DNA polimórfico utilizando iniciadores (“primers”) de secuencia al azar (RAPD: “Random Amplified Polymorphic DNA”). Los polimorfismos genéticos obtenidos han sido llamados marcadores RAPD, los cuales se han empleado en la identificación y evaluación de variabilidad genética en plantas, animales, parásitos, y microorganismos, entre ellos hongos entomopatógenos.

Existen varias ventajas en el uso de RAPD-PCR para detectar polimorfismos de DNA sobre otros ensayos moleculares, por ejemplo:

a) No se requiere información del DNA templado para obtener una amplificación exitosa; b) se requiere de un solo iniciador al azar en la reacción; c) el patrón de bandas que se producen son altamente específicos de especie; d) el proceso requiere de pequeñas cantidades de DNA; e) el análisis completo se lleva a cabo en menos de 24 h y f) no requiere materiales radioactivos o hibridaciones (Knudson, 1994). Además los RAPD son relativamente fáciles de realizar y reproducibles (Tigano-Milani, 1995).

El protocolo de amplificación de los RAPD`s difiere de la PCR normal, en dos puntos: 1) se utiliza un solo iniciador (primer), y 2) no se requiere conocer el DNA en estudio. Los iniciadores que se utilizan son cortos (decámeros), así que existe una alta probabilidad de que el genoma contenga varios sitios complementarios al iniciador, cercanos entre ellos y en orientación invertida. La técnica esencialmente rastrea el genoma en busca de estas secuencias y amplifica

segmentos de DNA de diferentes largos. El patrón de amplificación de los productos de PCR, dependen de la combinación templado-primero (Figura 1) y este es reproducible para cualquier combinación (Hadrys. 1992).

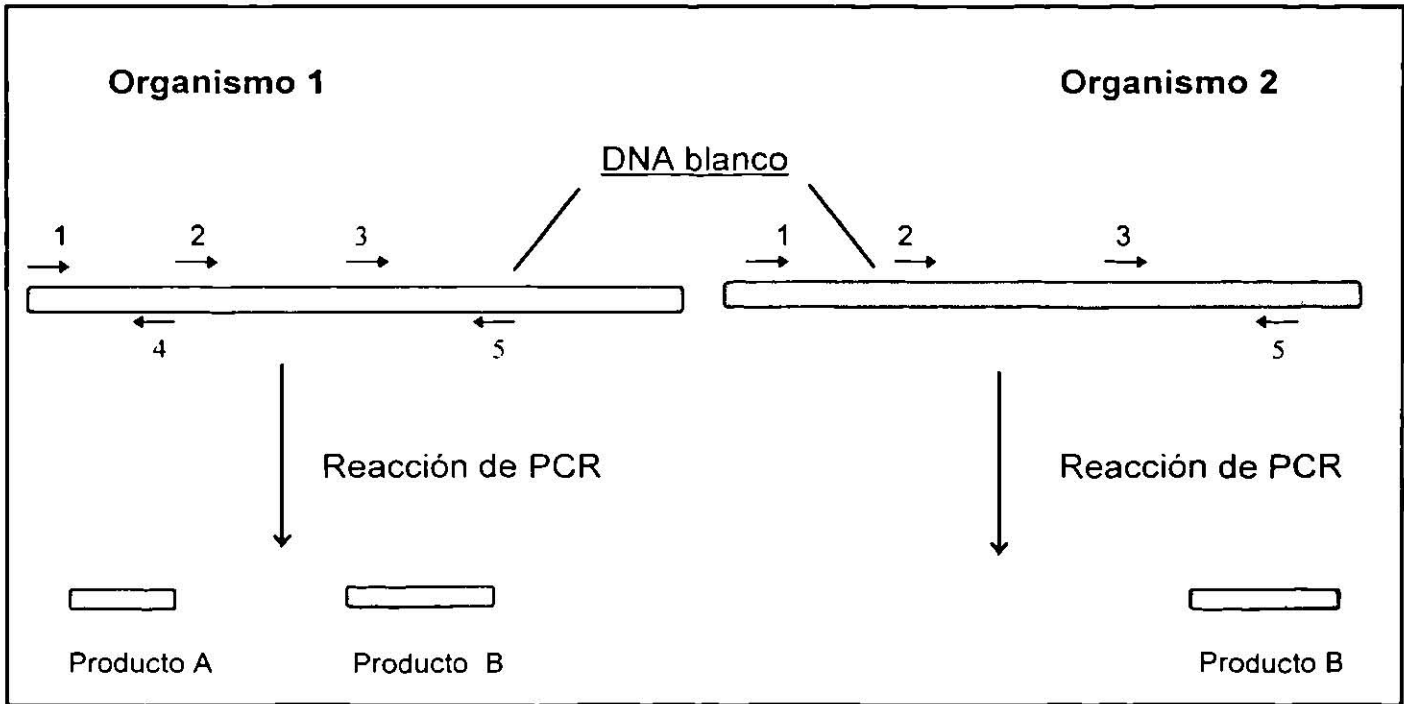


Figura 1. Esquema general de una reacción de RAPD-PCR.

Las flechas y números representan copias del iniciador (todos los iniciadores tienen la misma secuencia). La dirección de la flecha indica en qué dirección se llevará a cabo la síntesis del DNA. El producto A se forma por la amplificación del DNA que se encuentra entre los iniciadores 1 y 4. Note que el organismo 2 perdió el sitio de unión 4, por lo tanto no se da la amplificación en ese punto. El producto B se forma por la amplificación del DNA que se encuentra entre los iniciadores 3 y 5. No existe amplificación con los iniciadores unidos en la posición 2 y 4 debido a que no se encuentran en la orientación correcta. No existe amplificación con los iniciadores unidos en la posición 2 y 5 debido a que se encuentran a una distancia en la cual no se lleva a cabo la reacción de PCR.

IX. Antecedentes de los RAPDs como marcadores genéticos

Los marcadores obtenidos mediante los RAPD desde su primer reporte se han aplicado en estudios de mapeo genético, diagnóstico, taxonomía molecular, identificación, estudios evolutivos y variación genética.

Se pueden emplear en la identificación de mosquitos de importancia médica como *Aedes aegypti*, en estudios epidemiológicos relacionados con dinámicas de población y movimiento de

los vectores. Se han utilizado para diferenciar poblaciones de mosquitos basándose en los polimorfismos de DNA obtenidos, observándose que estos resultados pueden ser empleados en estudios de taxonomía molecular relacionados con poblaciones geográficas y movimiento de vectores (Ballinger. 1992).

De igual manera los marcadores RAPDs se pueden emplear en la industria alimentaria y de la salud, específicamente en epidemiología molecular, ya que permite investigar brotes de enfermedades, así como rastrear la diseminación de estos patógenos en los procesos y delimitar de forma estricta los focos infecciosos de contaminación. Se realizó un estudio en donde se compararon ensayos de antibiograma, perfil de plásmidos, análisis de enzimas de restricción (REA) y RAPDs, con el fin de caracterizar dos cepas de *Staphylococcus epidermidis* y ocho cepas de *S. aureus*. Se encontró que los análisis de RAPDs y REA proporcionaron los mejores resultados, permitiendo una buena discriminación entre las dos especies y aun entre cada cepa (Damiani. 1996).

Este método también probó ser muy confiable con otros microorganismos como *Salmonella* sp. Se examinaron 29 aislados de *Salmonella enteritidis*, los cuales fueron caracterizados utilizando otras técnicas de tipificación, al conjuntar los resultados de estas tres se obtuvieron 20 subtipos diferentes de *S. enteritidis*; sin embargo al utilizar solamente el método de RAPD se obtuvieron 14 subtipos, mostrando con esto que esta técnica posee un grado mayor de discriminación entre cepas y que puede detectar una mayor diversidad genética que otros métodos de clasificación de bacterias (Lin. 1996).

En el área de la salud, Ruma *et al*, en 1996 reportaron que mediante la amplificación al azar de DNA, se logró separar entre dos variedades de *Cryptococcus neoformans*, los serotipos A, D, AD (*C. neoformans* var. *neoformans*) y los serotipos B ó C (*C. neoformans* var. *gattii*), además se definieron subtipos dentro de cada serotipo, estos se pudieron asociar con su localización geográfica y el cuadro clínico que presentaron.

De la misma manera se utilizaron los marcadores RAPD's para realizar un análisis de variabilidad genética entre cepas de *Candida albicans* aisladas de diferentes regiones geográficas y se comparó con el análisis REA. en este caso los resultados de los análisis de RAPDs mostraron un grado mayor de variabilidad genética que los análisis REA (Clemons. 1997).

Esta técnica puede también ser aplicada a los ceparios de la industria cervecera, vitivinícola, lácteas o panaderas, con el fin de obtener marcadores genéticos que les puedan distinguir entre cepas contaminantes o bien para tener un genotipo bien identificado en el caso de requerir una patente. Se empleó la técnica de amplificación al azar, entre otras para evaluar diversidad genética entre 15 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de vino y cerveza. En este caso con los marcadores RAPD se obtuvo un grado mayor de diversidad genética, que con los análisis de enzimas de restricción (Couto. 1996).

Mediante RAPD-PCR se logró diferenciar entre *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus*, los cuales se habían ubicado en un mismo grupo, debido a su perfil de proteínas y a que presentan reacciones semejantes de fermentación a azúcares, sin embargo cada una de estas especies originó un patrón de marcadores RAPDs distinto concluyéndose con esto que se tratan de dos especies genéticamente distintas (Van Reenen. 1996).

El área de la fitopatología se ha visto grandemente beneficiada con el uso de esta técnica, se ha utilizado para estimar la diversidad intraespecífica de diversos aislados de *T. harzianum* , pudiéndose separar en tres grupos distintos, los cuales difieren en su patogenicidad, esto fue apoyado por análisis RFLP. (Muthumeenakshi.1994). En 1994, Schafer, pudo dividir *Leptosphaeria maculans* en dos patotipos, designados como agresivos y no agresivos. Se ha empleado también para analizar cepas de *Fusarium moniliforme*, con el fin de detectar su capacidad para producir giberelinas (GA), y poder asociar esta capacidad con algún marcador RAPD, se encontró que las cepas productoras de GA mostraron un patrón casi idéntico de amplificación, de esta forma se pueden utilizar los RAPDs en la identificación de cepas de productoras y no productoras de GA (Voigt. 1995). Por otra parte, esta técnica arrojó buenos resultados en la búsqueda de variabilidad genética tan fina como lo es la relación planta-

hospedero entre especies de *Xantomonas*, donde se logró identificar y diferenciar cinco cepas de *Xanthomonas albilineans*, aisladas de diferentes regiones geográficas. Se observó que existe un grado alto de variabilidad entre cepas, esto fue apoyado por los resultados obtenidos con el perfil de proteínas, propiedades serológicas y sensibilidad a bacteriofagos (Permaul.1996). Esta técnica ha sido aplicada también en cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* aisladas en diferentes cultivos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en México, Ecuador y Argentina, encontrándose que los aislados de México mostraron más polimorfismo que las de Ecuador y Argentina y que los marcadores moleculares encontrados en estas cepas estaban presentes también en las cepas de México sugiriendo que las cepas de Ecuador y Argentina provienen de las Mesoamericanas (Sicard. 1997).

Se ha empleado además para estudiar la relación y estructura genética que existe entre una población de 55 aislados de *Eutypa lata*, obteniendo un genotipo para cada cepa, confirmando con esto que cada aislado es genéticamente distinto (Péros. 1997). Ahora que algunos hongos entomopatógenos están siendo producidos comercialmente, se requieren de sistemas de detección altamente específicos y sensibles (Bidochka. 1994), y con la amplificación al azar de DNA polimórfico se han obtenido buenos resultados, estos se han empleado para separar variedades de los hongos *Hirsutella longicolla* y *M. anisopliae* (Hegedus. 1993). Fegan en 1993 encontró que los marcadores RAPD, revelan un alto grado de diversidad genética en 31 aislados de *M. anisopliae*, pudiendo agrupar los aislados según el área geográfica del cual se aisló, la especificidad del hospedero, así como la patogenicidad de los grupos.

Los RAPD se utilizaron para evaluar la variabilidad genética entre 24 aislados de hongos Deuteromycetos, pudiendo distinguir entre géneros y aun observar variedad interespecífica (Bidochka.1994). En 1995, Tigano-Milani separó 28 aislados de *Pacilomyces liliacinus*, obteniendo un genotipo distinto para cada aislado, y encontró que estos hongos presentan un alto grado de variabilidad entre genotipos, y que solo presentan un 63.5 % de similitud.

Por otro lado se observó diversidad genética entre 15 aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* los cuales fueron obtenidos del mismo hospedero (*Bemisia tabaci*), pudiéndose

ubicar en dos grupos distintos, se observaron diferentes genotipos aun y cuando estas cepas fueron aisladas en una epizootia. Además se logró clasificar a siete cepas que presentaban problemas para ubicarse en un grupo según sus características morfológicas, estos datos sugieren que una taxonomía basada en criterios morfológicos produce datos muy ambiguos acerca de las especies, y quizás en algunos casos hasta el nivel de género dentro de estos hongos imperfectos (Tigano-Milani, 1995).

Este sistema parece el más adecuado para realizar patrones de DNA para cepas de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*, y poder relacionar genotipos particulares definidos por estos patrones, con grupos patogénicos particulares, y de esta manera realizar una determinación precisa de cuales cepas serán capaces de matar al hospedero bajo condiciones de campo.

Materiales y Métodos

I. Cepas y condiciones de cultivo

En la tabla 4 se presentan las especies y cepas de los hongos que fueron utilizados en este trabajo, así como su hospedero y lugar de procedencia. Las cepas de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* se mantuvieron en agar YPD (Apéndice I.1) con aceite mineral a 4°C hasta su uso.

Tabla 4. Cepas de los hongos a utilizar en este trabajo.

Especie de Hongo y Cepa	Hospedero	Procedencia
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>		
SARL 76 (ARSEF 3663)	<i>Bemisia tabaci</i>	Calexico, Cal.
SARL 114	<i>Bemisia tabaci</i>	Weslaco, Tx.
SARL 11	<i>Bemisia tabaci</i>	Weslaco, Tx.
270/97 (260297) TS II	<i>Bemisia tabaci</i>	Culiacán, Sin.
UAN-7 P.f.	<i>Musca domestica</i>	Saltillo, Coah.
P.fr. 612	<i>Bemisia argentifolli</i>	Weslaco, Tx.
M-84	Mutantes obtenidas de la cepa P.fr.612	
M-84-6		
M-32		
<i>Beauveria bassiana</i>		
SARL 137 (ARSEF 2879)	<i>Diuraphis noxia</i>	Parma, Idaho
SARL 139 (ARSEF 2882)	<i>Diuraphis noxia</i>	Parma, Idaho
SARL 141 (ARSEF 3216)	<i>Thrips calcaratus</i>	Rusk Country
SARL 142 (ARSEF 3385)	<i>Myzus persicae</i>	Yakima, Washington
BB GHA (Mycotech)	Propietario	
291/95 (260297) Ino II	<i>Bemisia tabaci</i>	Culiacán, Sin.
BB 2 (310895)	<i>Atta sp.</i>	El Fuerte, Sin.

Todas las cepas en estudio fueron proporcionadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) de Weslaco, Tx., excepto las cepas mexicanas y las mutantes.

Para obtener el micelio necesario para la extracción de DNA, las cepas se hicieron crecer primeramente en agar YPD, posteriormente se transfirió una azada a 3 ml de caldo YPD, incubándose en agitación constante a 150 rpm a 25 °C durante 3 días. Es importante hacer notar el tiempo de incubación, ya que a medida que el cultivo avanza la pared celular se vuelve más rígida y dificulta su ruptura durante la extracción de DNA (Pfeifer. 1993).

II. Purificación de DNA

El DNA se purificó esencialmente de acuerdo a lo reportado por Cenis (1994), con algunas modificaciones. El paquete celular obtenido de los 3 ml del cultivo, fue lavado con 500µl de buffer TE (Apéndice I.2), una vez lavado, añadimos 300µl de buffer de extracción (Apéndice I.2) y se maceró con la ayuda de un tubo cónico (eléctrico) en hielo durante varios minutos, posteriormente adicionamos 30µl de Acetato de Sodio 3.0 M pH 5.2. La mezcla se incubó 10 min a -20°C, se centrifugó 5 min a 14,000 rpm, transfiriendo el sobrenadante a un tubo limpio, al cual se le agregó un volumen de isopropanol y se incubó 30 min a -20°C. El precipitado fue lavado con Etanol al 70% y secado durante 20 min a T° máxima en un concentrador tipo “Savant”. El DNA fue resuspendido en 50 µl de Agua mili Q estéril. Al DNA se le agregó 1 µl de RNasa (10 mg ml⁻¹) y se incubó 1 h/ 37°C. El DNA se cuantificó realizando lecturas en el espectrofotómetro UV a 260 nm, y se prepararon soluciones de trabajo a una concentración de 100 ng/µl en agua mili Q estéril las cuales fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

III. Iniciadores

Todos los iniciadores utilizados fueron decámeros de secuencia aleatoria, con 60-70 % de G+C (Operon Technologies. Alameda, CA). Se probaron los 20 iniciadores de la serie OPA con el fin de evaluar el patrón de amplificación. Cada iniciador se probó con las cepas P fr. 612 de *P. fumosoroseus* y la BB GHA de *B. bassiana*. Seleccionaron 8 iniciadores para este estudio, con los cuales se obtuvieron patrones consistentes y fácilmente distinguibles (Tabla 5).

IV. RAPD-PCR

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo reportado por Williams y otros (1994). Las modificaciones son mostradas en la Tabla 6.

Tabla 5.- Clave, secuencia y porcentaje de G+C de los iniciadores utilizados en los RAPDs.

Clave	Secuencia de 5' a 3'	Contenido de G+C (%)
OPA-02	TGCCGAGCTG	70
OPA-03	AGTCAGCCAC	60
OPA-04	AATCGGGCTG	60
OPA-09	GGGTAACGCC	70
OPA-11	CAATCGCCGT	60
OPA-13	CAGCACCCAC	70
OPA-18	AGGTGACCGT	60
OPA-19	CAAACGTCCG	60

Tabla 6.- Condiciones de ensayo para una muestra

Reactivos	Concentración	Volumen (μ l)
DNA templado	500 ng	5.0
Buffer (10X)	1X	5.0
dNTP's (Boehringer)	400 μ M	2.0
Iniciador (OPA)	2 μ M	3.0
MgCl ₂	2.5 mM	5.0
Taq DNA polimerasa	1.5 U	0.3
Agua mili Q estéril	c.s.p. 50 μ l	29.7

Los tubos fueron centrifugados 2 seg/10,000 rpm. La mezcla de reacción se cubrió con aceite mineral estéril (50µl) con el fin de evitar evaporación durante los ciclos de la PCR. Antes de agregar la enzima AmpliTaq DNA polimerasa, la mezcla de reacción se calentó 5 min/94°C para desnaturalizar el DNA y evitar la amplificación de productos inespecíficos. Se adicionaron 1.5 U de la enzima depositándola por debajo de la capa de aceite mineral, y los tubos se colocaron en un Termociclador (MJ Research).

La amplificación se llevó a cabo utilizando el siguiente programa: 35 ciclos de desnaturalización a 94°C/1 min; alineamiento a 36°C/1.5 min, y extensión a 72°C/2 min. Al finalizar estos ciclos se dio un tiempo de extensión adicional de 8 min a 72°C, para que se completara la extensión de los productos amplificados. Los productos de amplificación se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

V.- Análisis de los Resultados

Los productos amplificados de DNA fueron separados y analizados mediante electroforésis en geles de agarosa al 1.5% en buffer de TAE 1X, durante 1 h a 10 V/cm. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de UV. Posteriormente los productos de la amplificación se corrieron en geles de poliacrilamida al 3.5% durante 2 h a 5 V/cm, con el fin de obtener una mayor resolución. Estos geles se fotografiaron para su posterior análisis. Solo las bandas evidentes se tomaron en consideración. Las tallas moleculares de dichas bandas, expresadas en pares de bases, se calcularon usando una regresión lineal tomando como referencia marcadores de talla molecular (λ -DNA digerido con *HindIII* y *EcoRI*). El patrón y la talla molecular de los productos, se determinó al comparar la tallas calculadas de una misma banda en diferentes geles. Los fragmentos que migraron en la misma posición en los geles de poliacrilamida al 3.5% , se consideraron como homólogos y la presencia o ausencia de cada fragmento se consideró como un carácter independiente.

El grado de similitud entre las cepas fue calculado de acuerdo a la ecuación propuesta por Nei & Li (1979):

$$F = 2m_{xy} / (m_x + m_y)$$

donde m_x y m_y representan el número de bandas amplificadas por cada cepa y m_{xy} es el número de bandas compartidas entre las cepas. Posteriormente se obtuvieron los valores de disimilitud $Vd = (1-F)$, comparando cada cepa contra el resto, este valor indica el grado de variabilidad del grupo. Finalmente se realizó un Análisis de agrupamiento (Cluster Analysis), para construir un dendograma y un Análisis de Componentes Principales también para observar similitud entre cepas, todo esto utilizando el programa estadístico SPSS (por sus siglas en ingles: Statical Package for the Social Science).

Resultados

El análisis de variabilidad genética es una herramienta que ha tomado mucha importancia en los organismos de interés biotecnológico. En este estudio evaluamos la variabilidad genética en 2 hongos patógenos a la “mosquita blanca” (*B. tabaci*), 7 cepas de *B. bassiana* y 9 de *P. fumosoroseus* procedentes de diferentes zonas geográficas, además 3 de estas cepas son mutantes obtenidas a partir de la cepa P.fr. 612 de *P. fumosoroseus* (Tabla 4). Una de las etapas críticas en este tipo de ensayos es la extracción del DNA, ya que se requiere obtener no solo una buena cantidad de DNA sino también de buena calidad. En este trabajo realizamos algunas modificaciones al método reportado por Cenis (1994), el cual es simple y rápido: La principal adecuación consistió en eliminar el acetato de sodio, ya que al utilizar las cantidades reportadas (1.0 M) se tuvo problemas con la amplificación genética. Por tal motivo, se extrajo el DNA variando las cantidades de acetato y se observó que la concentración de material genético no variaba de manera significativa (Fig. 2). Lo mas importante fue el hecho que la amplificación génica no se modificó al disminuir la concentración de sal, no encontrando diferencias entre 0.0-240 mM (Fig. 3).

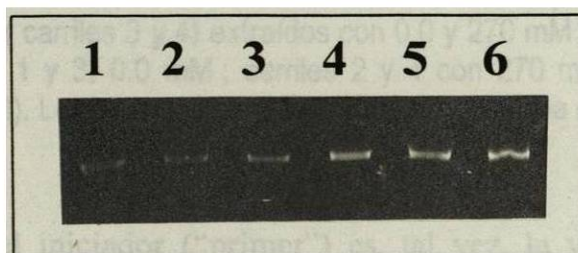


Figura 2.- Efecto de la concentración de acetato de sodio sobre la concentración de DNA a partir de *P. fumosoroseus* cepa SARL 115. Carril 1, 0.0; carril 2, 270 mM; carril 3, 500 mM; carril 4, 690 mM; carril 5, 850 mM ; carril 6, 1000 mM.

Con este método de extracción se obtuvo suficiente DNA para realizar aproximadamente 100 reacciones de amplificación, con una pureza de 2.01 esto se observó

tanto en *B. bassiana* como con *P. fumosoroseus*. Los productos de amplificación obtenidos fueron reproducibles, aun después de almacenar el DNA durante mas de 4 meses a -20°C .

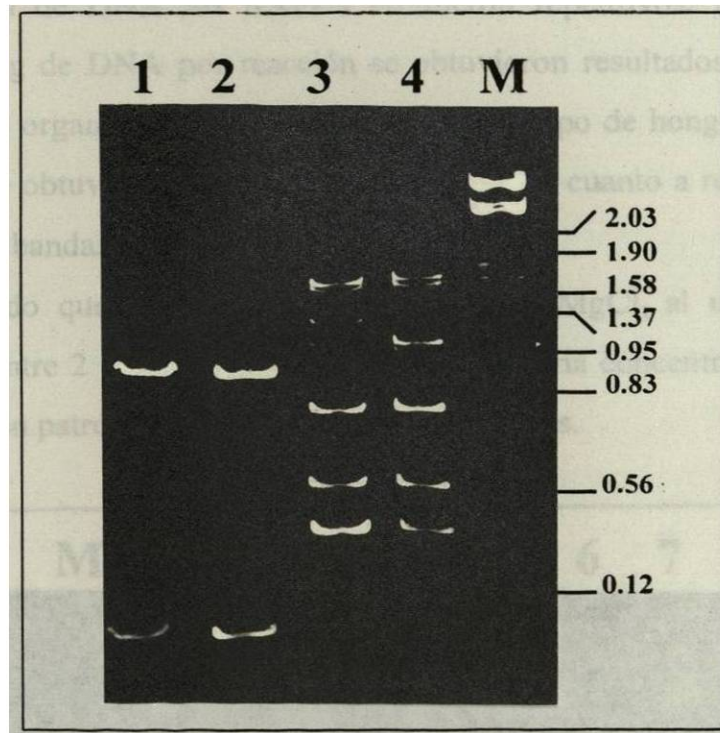


Figura 3.- Productos del RAPD usando DNA de *P. fumosoroseus* cepa SARL 115 (carriles 1 y 2) y *B. bassiana* cepa BB GHA (carriles 3 y 4) extraídos con 0.0 y 270 mM de acetato de sodio, usando el iniciador OPA-13. Carril 1 y 3, 0.0 mM ; carriles 2 y 4 con 270 mm. M, marcadores de talla molecular (λ -*Hind*III-*Eco*RI). Los números a la derecha indican la talla expresada en kpb.

La selección del iniciador (“primer”) es, tal vez, la variable mas importante a considerar en los RAPD’s ya que este determinará que regiones del genoma serán amplificadas y cuanta variabilidad genética se podrá detectar (Haymer. 1994). Inicialmente se probaron 20 primers, en una cepa representativa de cada género en estudio, la Pfr. 612 de *P. fumosoroseus* y la BBGHA de *B. bassiana*. En base al número e intensidad de las bandas amplificadas, seleccionamos ocho iniciadores; OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-11, OPA-13, OPA-18 y OPA-19, estos se emplearon en el análisis del resto de las cepas, a una concentración constante de $2.0\ \mu\text{M}$.

Como en cualquier reacción de amplificación, la concentración de DNA templado en los RAPD's puede afectar el número e intensidad de los productos amplificados, con un exceso de DNA obtuvimos un barrido o ausencia de bandas bien definidas en el gel, y con una baja concentración de DNA los RAPDs no fueron repetitivos. En general a una concentración de 1.0 μg de DNA por reacción se obtuvieron resultados reproducibles en una amplia variedad de organismos, sin embargo para este tipo de hongos se observó que con 500 ng de DNA se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a reproducibilidad en número e intensidad de bandas (Fig. 4).

Se ha reportado que la concentración óptima de MgCl_2 al utilizar $400\mu\text{M}$ de dNTP's se encuentra entre 2 y 3 mM, nosotros utilizamos una concentración de 2.5 mM, con la cual se obtuvieron patrones constantes y bandas intensas.

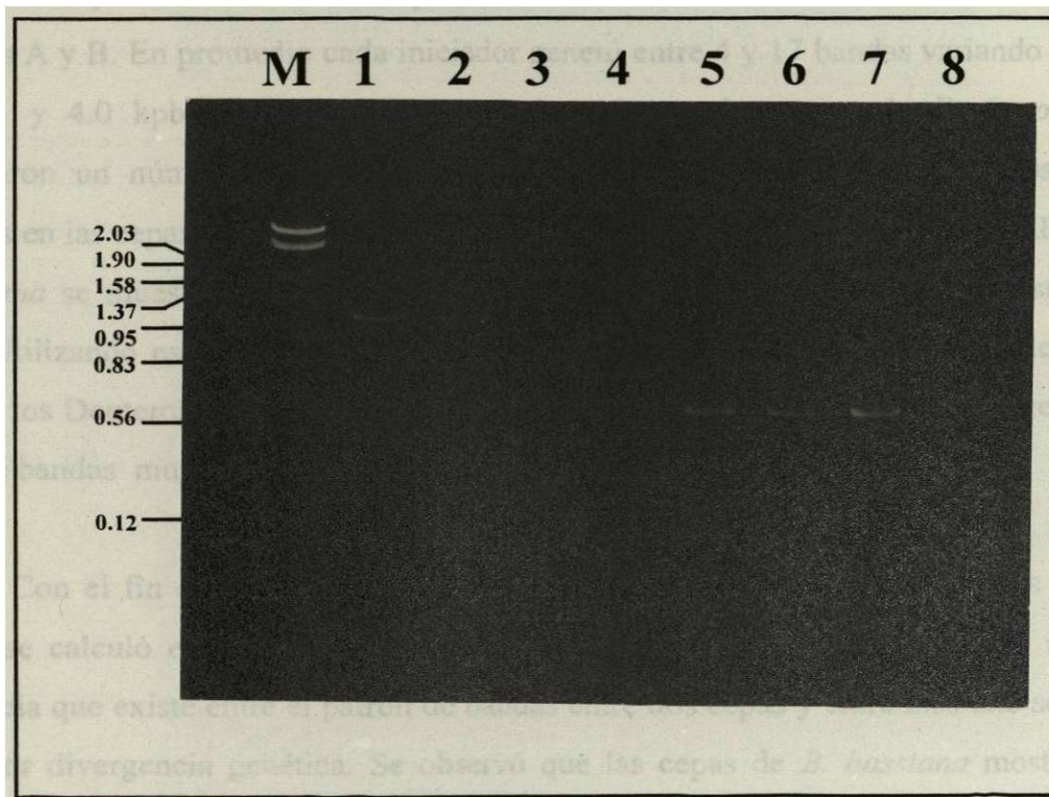


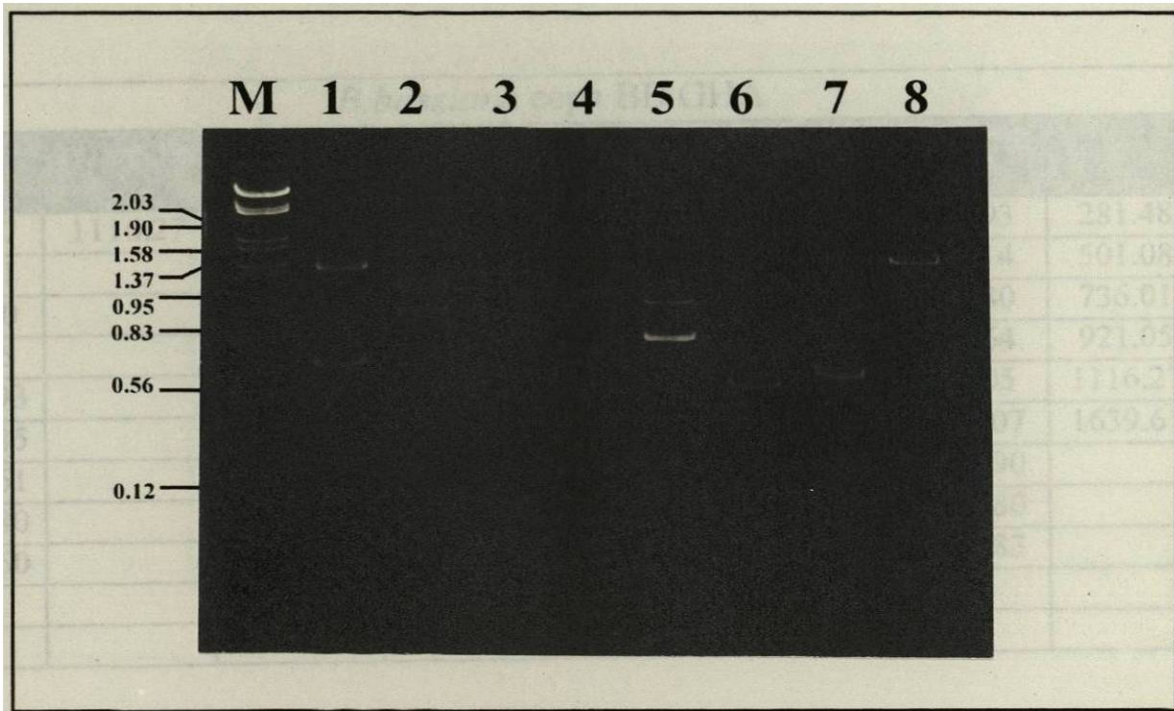
Figura 4.- Efecto de la concentración de DNA sobre el patrón de amplificación a partir de *P. fumosoroseus* (carriles 2-5) y *B. bassiana* (carriles 6-9), usando el iniciador OPA-13. Carril 1, Marcadores de talla molecular (λ - *Hind*III- *Eco*RI); carriles 2 y 6, 100 ng; carriles 3 y 7, 500 ng; carriles 4 y 8, 1000 ng; carriles 5 y 9, 2500 ng.

Aunque los patrones de amplificación fueron siempre reproducibles, se realizaron dos análisis RAPD, utilizando DNA extraído en diferentes ocasiones. Esto se aplicó para todas las cepas de este estudio empleando el iniciador OPA-13. Se observó que los productos de amplificación fueron altamente reproducibles ya que no se vieron modificados drásticamente al utilizar diferentes fuentes de DNA, tal vez alguna banda tenue apareció o desapareció, sin embargo las bandas intensas que son las que se toman en consideración permanecieron constantes, esto se pudo observar también con el resto de los iniciadores al probarse con las cepas; P.fr. 612, M84, M84-6 y M32 de *P. fumosoroseus* y las cepas de *B. bassiana* BBGHA y SARL 142.

Las figuras 5 y 6 muestran un ejemplo de los productos obtenidos para dos cepas de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*, respectivamente. El resultado del resto, se muestra en los apéndices A y B. En promedio cada iniciador generó entre 4 y 17 bandas variando las tallas entre 0.1 y 4.0 kpb, pero claramente se observó que las cepas de *P. fumosoroseus* amplificaron un número mayor de bandas que las cepas de *B. bassiana*. Los valores obtenidos en las cepas Pfr. 612, UAN-7 P.f. de *P. fumosoroseus* y BBGHA, SARL 142 de *B. bassiana* se muestran en las Tablas 7 y 8 (Ver Apéndice C y D para el resto de las cepas). Utilizando esta técnica fuimos capaces de distinguir entre dos hongos del mismo grupo de los Deuteromycetos, *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*, ya que cada uno presentó un patrón de bandas muy distinto.

Con el fin de evaluar el grado de variabilidad genética entre las cepas de estos hongos, se calculó el Valor de disimilitud 1-F (Tabla 9). Este parámetro nos indica la divergencia que existe entre el patrón de bandas entre dos cepas y entre mas alto sea indica una mayor divergencia genética. Se observó que las cepas de *B. bassiana* mostraron en promedio un valor 1-F de 0.55, lo que nos indica que estas cepas poseen un alto grado de variabilidad genética. Con OPA-13 se obtuvo el valor mas alto de disimilitud entre estas cepas (0.62), esto nos indica que este iniciador es capaz de darnos una mayor separación entre las cepas de *B. bassiana*.

A



B

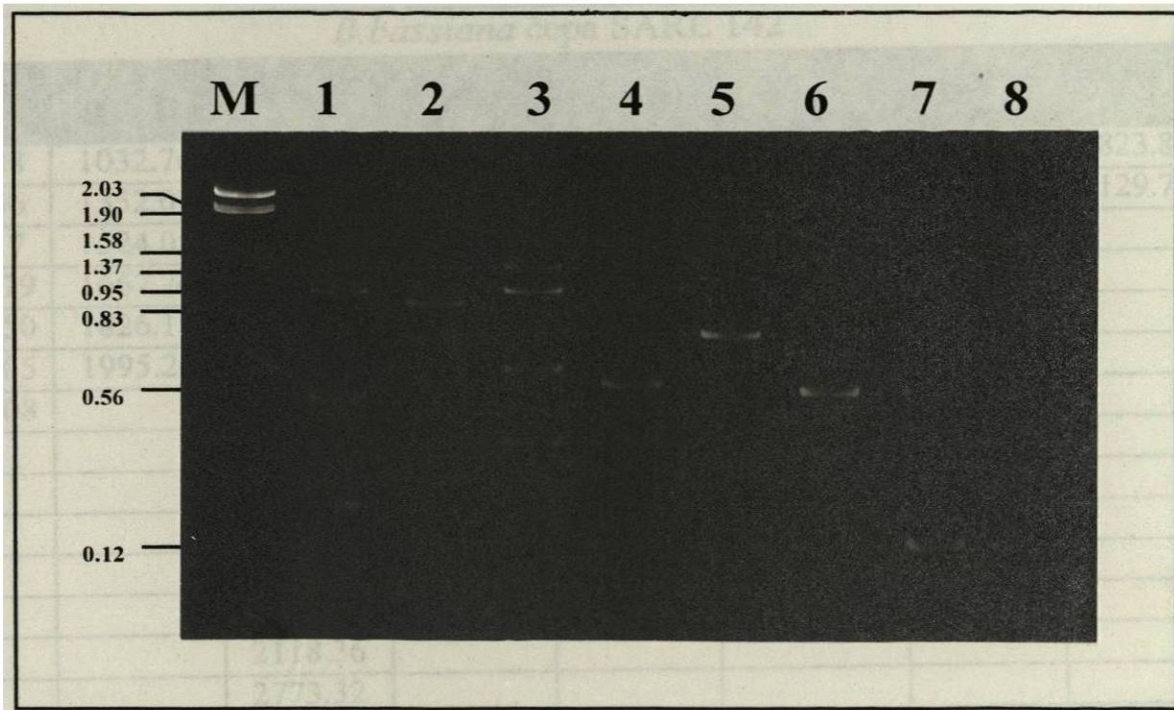


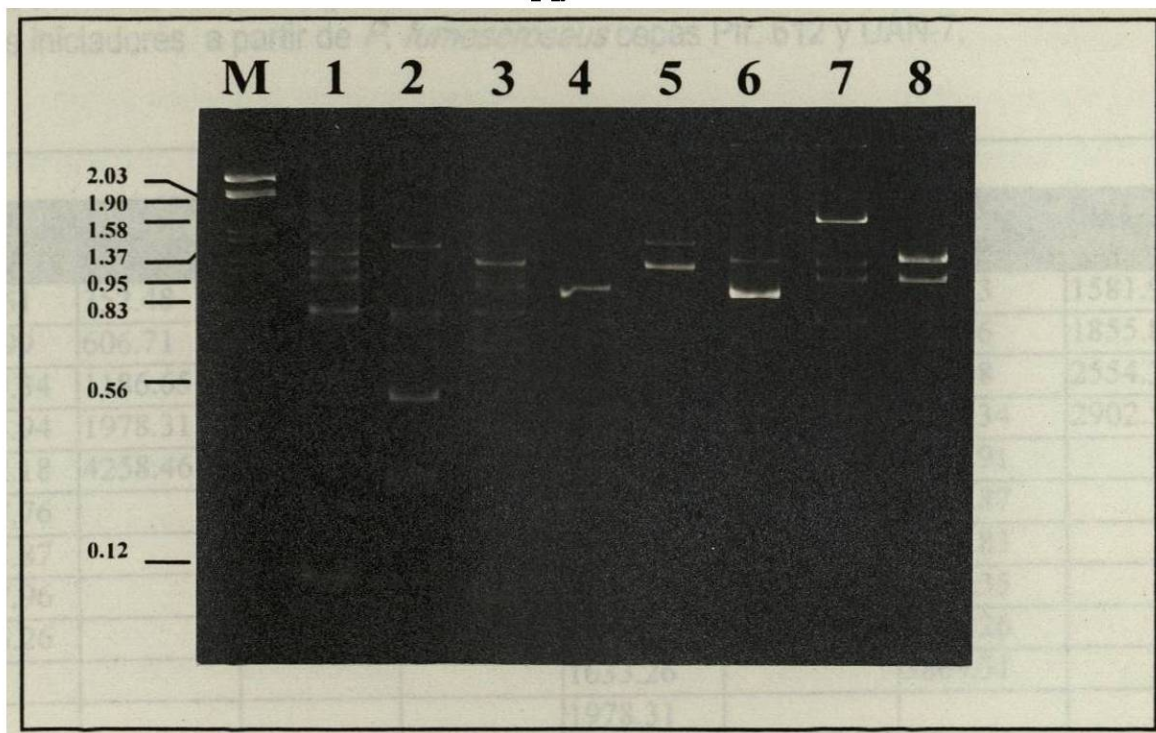
Figura 5.- Patrón de amplificación genética de *B. bassiana* cepas BB GHA (panel A) y SARL 142 (panel B). M, Marcadores de talla molecular; carril 1, OPA-02 ; carril 2, OPA-03 ; carril 3, OPA-04, carril 4, OPA-09 ; carril 5, OPA-11, carril 6, OPA-13 ; carril 7, OPA-18 ; carril 8, OPA-19.

Tabla 7 .- Talla Molecular (pares de bases) de los productos de RAPD's obtenidos con varios iniciadores a partir de *B. bassiana* cepas BB GHA y SARL 142.

<i>B. bassiana</i> cepa BB GHA							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
319.97	1116.27	255.69	413.71	863.88	309.88	224.93	281.48
426.91		485.28	784.71	1190.14	455.16	588.14	501.08
569.60		569.60		1442.40	534.24	712.80	736.01
68056		712.80		1748.12	712.80	836.64	921.05
1485.93		892.01		2118.63	1081.07	921.05	1116.27
1537.85		1013.97		2258.84	1485.93	1081.07	1639.61
1639.61		1190.14			1537.85	1268.90	
1863.80		1310.21			2051.83	1863.80	
2737.60		1639.61			2187.61	2051.83	
		2332.38					
		2537.41					

<i>B. bassiana</i> cepa SARL 142							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
311.88	1032.76	224.38	341.19	1064.14	679.20	205.11	1823.89
534.56	1352.07	260.61	373.25	1667.24	1199.49	534.56	1129.79
659.17	1524.05	302.69	721.10		1936.42	1002.30	
1129.79	1667.24	460.25	1164.12				
1273.50	1826.15	534.56	1312.19				
1524.05	1995.26	639.73	1667.24				
1618.08		721.10	2118.36				
		812.83					
		1199.49					
		1479.10					
		1667.24					
		1826.15					
		2118.36					
		2773.32					

A



B

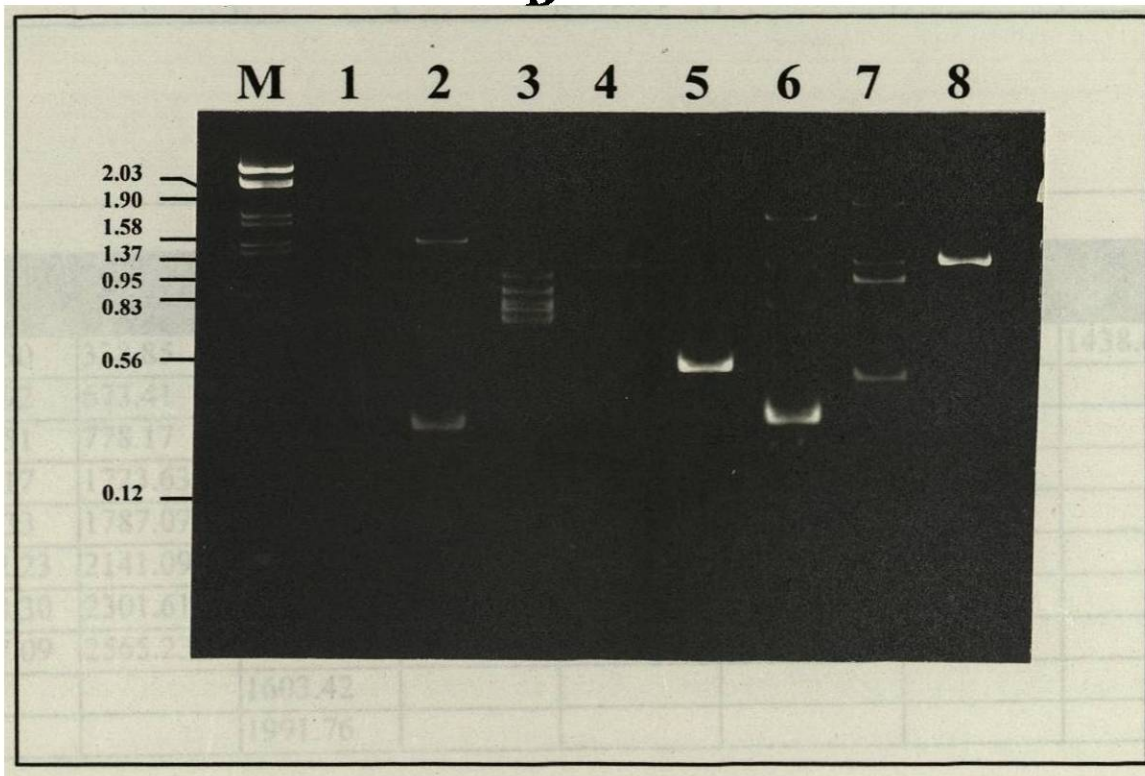


Figura 6.- Patrón de amplificación genética de *P. fumosoroseus* cepas Pfr. 612 (panel A) y UAN-7 (panel B). M, Marcadores de talla molecular; carril 1, OPA-02 ; carril 2, OPA-03 ; carril 3, OPA-04, carril 4, OPA-09 ; carril 5, OPA-11, carril 6, OPA-13 ; carril 7, OPA-18 ; carril 8, OPA-19.

Tabla 8 .- Talla Molecular (pares de bases) de los productos de RAPD's obtenidos con varios iniciadores a partir de *P. fumosoroseus* cepas Pfr. 612 y UAN-7.

<i>P. fumosoroseus</i> cepa Pfr. 612							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
153.61	352.48	135.18	281.85	485.14	352.48	375.73	1581.91
272.99	606.71	375.73	734.89	646.74	979.68	569.16	1855.87
1149.34	1186.65	758.74	835.06	783.37	1437.35	979.68	2554.35
1264.94	1978.31	979.68	919.04	835.06	1916.11	1149.34	2902.51
1532.18	4258.46	1186.65	1484.00	979.68	2108.83	1581.91	
1567.76		1484.00	1686.27	1186.65	2722.87	1855.87	
1855.87		1567.76	1855.87	1264.94		2108.83	
2247.96			2320.92	1437.35		2554.35	
2396.26			2722.87	1532.18		2811.26	
				1633.26		3869.31	
				1978.31			
				2722.87			
				3515.71			

<i>P. fumosoroseus</i> cepa UAN-7							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
170.50	338.85	452.48	308.46	562.07	308.46	469.13	1438.64
420.92	673.41	542.11	673.41		966.65	522.87	
649.51	778.17	806.82	1158.14		1387.56	836.54	
778.17	1723.63	867.31	1244.96		2065.07	1244.96	
932.33	1787.07	966.65	1438.64		2141.09	1491.59	
1002.23	2141.09	1039.12	2141.09			1921.05	
1338.30	2301.61	1117.02	2757.55			2141.09	
1787.09	2565.23	1290.79				2474.16	
		1603.42					
		1991.76					

Por otro lado con las cepas de *P. fumosoroseus* se obtuvo en promedio un VD=0.48, mostrándonos que estas cepas poseen cierto grado de divergencia genética, sin embargo no tan alto como el que presentan las cepas de *B. bassiana*, en este caso con OPA-11 fue el que nos presentó un valor mas alto (0.68) de variabilidad entre cepas. Se logró establecer diferencias entre las cepas de ambos géneros, debido a que cada una mostró un genotipo distinto, tanto en número como en tamaño de bandas, sin embargo las cepas amplificaron algunas bandas en común.

Las cepas de *B. bassiana* compartieron una banda de 1032-1186 pb con OPA-03, una de 721-784 pb con OPA-09 y una de 1667-1785 pb con OPA-11.

Tabla 9.- Valores de disimilitud (Vd) genética entre *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*.

<i>B.bassiana</i>	
Cepa	Vd
SARL 141	0.63
SARL 137	0.59
SARL 142	0.53
SARL 139	0.51
BB GHA	0.57
291/ 95 IN	0.53
BB 2	0.52
Media	0.55

<i>P.fumosoroseus</i>	
Cepa	Vd
SARL 115	0.45
SARL 76	0.46
SARL 114	0.48
UAN-7	0.67
PF 612	0.46
270/97 TS	0.49
M 84	0.49
M84-6	0.48
M 32	0.49
Media	0.48

Por el contrario, con las cepas de *P. fumosoroseus* se obtuvieron patrones de amplificación mas constantes y el número de bandas compartidas fue mayor. Entre las mas evidentes se encuentra una banda de 524-591pb amplificada con OPA-03, una de 1077-1186 pb con OPA-04 y las de 1406-1484 pb con OPA-09, de 1656-1743 pb con el OPA-11, una de 1404-1555pb con OPA-13, una de 1497-1581 pb y una de 1808-1877 pb con OPA-

19. Estas bandas pudieran ser utilizadas para identificar específicamente cepas que pertenezcan a estos géneros.

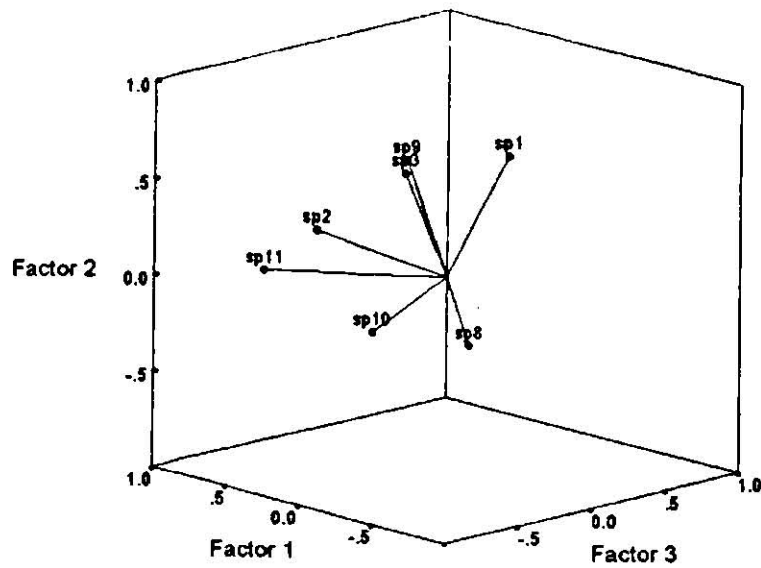
Esta técnica fue capaz de diferenciar las cepas mutantes producidas en el laboratorio a partir de la P.fr. 612, ya que al analizar su patrón de amplificación se observó que algunas bandas desaparecieron (684.23pb con OPA-02, en las cepas 84,84- 6 y 32) o por el contrario se amplificaron nuevas bandas (2504.50pb, en la cepa 84 con OPA-11).

El análisis de agrupamiento (Cluster Analysis) realizado con los marcadores RAPDs mostró que las cepas de *B. bassiana* se pueden separar en tres grupos. Esto se observó de manera similar en el Análisis de Componentes Principales (Fig. 7). El grupo 1 formado por las cepas BB2 y SARL 137, presentaron un $V_d=0.43$, entre estas dos cepas no existe ninguna relación en cuanto a hospedero o su origen geográfico, y sin embargo se comportaron de manera muy similar tanto en su crecimiento como en la extracción de DNA. En el grupo 2 con un valor de disimilitud de 0.37 se encontraron las cepas SARL 139 y SARL 142, estas cepas difieren también en su hospedero y procedencia, sin embargo con todos los iniciadores utilizados mostraron patrones muy similares. El tercer grupo esta formado las cepas BB GHA y 291/95 con un $V_d=0.43$, y al igual que en los grupos anteriores estas cepas no tienen relación en cuanto a hospedero y procedencia, sin embargo presentan dos características importantes, ambas son utilizadas a nivel comercial, BB GHA en EUA y 291/95 en México y en su crecimiento presentan casi en su totalidad puras esporas. Por otro lado, la cepa SARL 141 se observó muy alejada del resto de las cepas, y no se logró incluir en ninguno de los grupos mencionados.

De manera semejante, el análisis logró separar las cepas de *P. fumosoroseus* en tres grupos según su dendograma (Fig. 8). El grupo 1 integrado por la cepas, 270/97, Pf 612 y sus mutantes M84 , M84-6 y M32, el grupo 2 se formó con las cepas SARL 114 y SARL 115 las cuales presentaron un $V_d=0.33$, ambas cepas fueron aisladas de *B. tabaci* en Weslaco. Tx., y el grupo 3 se formó con las cepas SARL 76 y UAN-7, las cuales mostraron una mayor divergencia con respecto a resto de las cepas. En especial la cepa UAN-7 posee

dos características importantes ya que fue aislada de *M. domestica*, y es de procedencia mexicana.

A



B

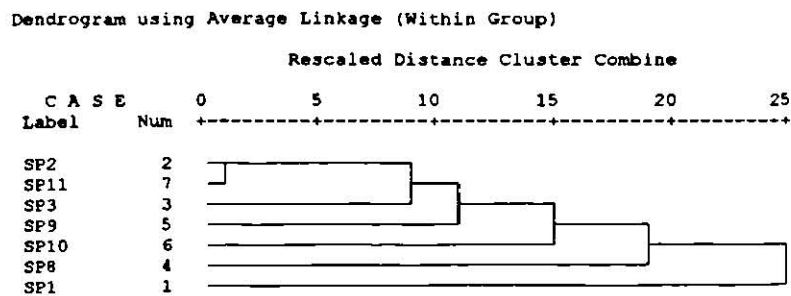


Figura 7.- Análisis de Componentes Principales (panel A) y Dendrograma (panel B) de *B. bassiana*, utilizando los iniciadores OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-11, OPA-13, OPA-18, OPA-19. Simbología : SP 2 = SARL 137; SP 9 = SARL 139; SP 1 = SARL 141; SP 3 = 142; SP 8 =BB GHA; SP 10 =291/95; SP 11 = BB 2

El análisis tridimensional (Fig. 8) en este caso reveló mayor información para las cepas de *P. fumosoroseus* que el dendograma. Se observó que las mutantes M84 y M32 se encuentran mas cercanas a la cepa paterna P.f. 612 de la que provienen, que la M84-6, y que esta se relaciona de manera mas cercana con la cepa SARL 114. Al igual que el dendograma, este análisis mostró que las cepas SARL 76 y UAN-7 forman un grupo muy separado del resto de las cepas de *P. fumosoroseus*. En este caso las cepas SARL 115 y la 270/97 formaron un grupo cercano.

Se realizaron así mismo dendogramas, utilizando los marcadores obtenidos con un solo iniciador (Apéndice E). para esto se eligieron los iniciadores que revelaron una mayor variabilidad genética. Al utilizar OPA-02 en *B. bassiana* se logró relacionar las cepas 291/95 y BB 2, ambas cepas son mexicanas del estado de Sinaloa, pero no comparten el mismo hospedero. Con este iniciador se amplificó una banda única para estas cepas de 794-813 pb, sin embargo esta se presentó muy débil en la cepa BB 2, de igual manera se observó similitud con OPA-18. En este caso las cepas presentaron un patrón casi idéntico, y se diferenciaron en una banda de 2033 pb que solo amplificó la cepa 291/95. Por otra parte, se logró identificar estas cepas con OPA-13 ya que no amplificaron la banda de 700 pb, la cual estuvo presente el resto de las cepas en estudio. Al emplear OPA-09 se formó un grupo con las cepas BB GHA y 291/95, las cuales presentaron exactamente el mismo patrón de amplificación, una banda de 389-413pb

El análisis tridimensional (Fig. 8) en este caso reveló mayor información para las cepas de *P. fumosoroseus* que el dendograma. Se observó que las mutantes M84 y M32 se encuentran mas cercanas a la cepa paterna P.f. 612 de la que provienen, que la M84-6, y que esta se relaciona de manera mas cercana con la cepa SARL 114.

Por otro lado, se observó que tal vez estas cepas pudieran identificarse con los iniciadores OPA-02 y OPA-04 , ya que con estos se obtuvo un patrón de amplificación muy semejante, sin embargo con ambos iniciadores las bandas fueron siempre tenues en la cepa SARL 137. Se observó que las cepas SARL 142 y la BB 2 formaron un grupo muy

Por otro lado, se observó que tal vez estas cepas pudieran identificarse con OPA-02 y OPA-04 , ya que con estos se obtuvo un patrón de amplificación muy semejante, sin embargo con ambos iniciadores las bandas fueron siempre tenues en la cepa SARL 137. Se observó que las cepas SARL 142 y la BB 2 formaron un grupo muy homogéneo con las cepas SARL 137 y SARL 139. Aun y cuando estas cepas provienen de diferente origen geográfico y hospedero, se presentó mucha similitud en especial con OPA-02 y OPA-11. Con los iniciadores OPA-02, OPA- 03, OPA- 11, OPA- 18 y OPA- 19, la cepa SARL 141 se observó muy distante del resto, no obstante a que en sus patrones de amplificación compartía algunas de las bandas importantes presentes en el resto de las cepas (1098-1135 pb con OPA-03; 521-599 pb en OPA-04; 721-784 pb en OPA-09).

Todas las cepas de *B.bassiana* empleadas en este estudio amplifican varias bandas (255-294 pb, 492-569 pb, 812-892 pb y 1176-1224 pb) con OPA-04 las cuales comparten entre si, de manera semejante, con OPA-18 las cepas SARL 142, BB GHA, SARL 139, 291/95 y BB 2 presentan un patrón muy característico en donde comparten una banda de 538-588 pb y una de 959-10079 pb. presentándose en todos los casos mas intensa la de 538-588 pb, estas bandas pudieran ser útiles en la identificación de esta especie en particular.

En el caso de *P. fumosoroseus* (Apéndice F) se observó que el patrón de bandas obtenido con OPA-11 en las cepas 290/97 y UAN-7, fue muy similar, aun y cuando fueron aisladas de diferente organismo, pero comparten zona geográfica (Sinaloa). Con este iniciador se amplifico una banda de 562-577 pb exclusiva de las cepas mexicanas, la cual se presentó mucho mas intensa en la cepa UAN-7. Además con este iniciador, estas cepas se distinguen porque no presentan la banda de 2016-2145pb amplificada por el resto de las cepas, de manera similar se observo esto con el iniciador OPA-09, ya que las cepas 290/97 y UAN-7 no amplificaron la banda intensa de 1195-1256 pb que presentaron el resto de las cepas de *P. fumosoroseus* utilizadas en este estudio.

En general las cepas SARL 114 y SARL 115 fueron muy similares con casi todos los iniciadores en especial con el OPA-03,OPA-09,OPA-11,OPA-18 y OPA-19 con los

cuales se obtuvo el mismo patrón de amplificación, estas cepas poseen el mismo hospedero y origen geográfico.

Al emplear el iniciador OPA-03 las cepas SARL 115 y SARL 76 se encontraron muy cercanas con un valor de disimilitud de 0.28 (Tabla 9), con este iniciador se obtuvo un patrón de amplificación muy similar al igual que con la cepa SARI. 114, estas tres cepas fueron aisladas de *Bemisia tabaci*, la cepa 270/97 también fue aislada de este hospedero sin embargo esta cepa siempre mostró patrones de amplificación muy distintos.

En general las cepas mutantes originadas a partir de la cepa Pf 612 mostraron patrones semejantes a la cepa de la cual provienen, sin embargo esta técnica fue capaz de diferenciar estas cepas, ya que al analizar su patrón de amplificación se observó que algunas bandas desaparecieron (405 pb con el iniciador OPA-04, en las cepas 84, 84-6 y 32, la banda de 355 pb solo se conservó en la cepa 32, de igual manera con el iniciador OPA-13 se perdieron las bandas de 224 y 301 pb en 84, 84-6 y 32). Con el iniciador OPA-19 se obtuvo un patrón de bandas muy conservado entre las cepas de *P. fumosoroseus* las cuales amplificaron dos bandas intensas y constantes una de 1497-1581 pb y una de 1808-1877 pb, esto se presentó en todas las cepas excepto la 290/97 la cual amplificó solo la banda de 1497-1581 pb y la UAN-7 la cual solo presentó la de 1808-1877 pb.

Finalmente con el iniciador OPA-04 cada cepa se mostró muy distinta ya que este análisis las separó considerablemente una de la otra, lo cual nos indica que este iniciador podría ser muy útil en caso de requerir la separación de cepas con relación muy estrecha.

Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue el aplicar la técnica de Amplificación al Azar de DNA Polimórfico a los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* con el fin de analizar diferentes cepas y poder correlacionar genotipos con características de especificidad o virulencia, a pesar de que no existen muchos reportes con hongos, algunos estudios recientes han demostrado la utilidad de los RAPDs para separar biotipos o cepas en hongos. Uno de los principales obstáculos en este tipo de análisis es la obtención de un DNA lo suficientemente puro. Debido a la rigidez de la pared celular, la lisis de las células fúngicas es el principal contratiempo en los procedimientos de extracción de DNA. La mayoría de los métodos empleados requieren procedimientos complejos y/o con tiempos de extracción largos. Además algunos utilizan enzimas como Novozym 234 o células liofilizadas, lo cual convierte a estos métodos en opciones muy caros y laboriosos. En este caso para la extracción del DNA de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus*, se utilizó un método de macerado mecánico (Cenis, 1992), el cual elimina el uso material liofilizado y las extracciones con fenol-cloroformo. El DNA total extraído con este método tuvo la calidad para ser utilizado en ensayos de RAPD, y se ha observado que el DNA que se obtiene mediante este tipo de protocolo puede ser empleado en ensayos mas finos como digestiones con enzimas de restricción o RFLP (Pfeifer *et al.*, 1989).

Con este método de extracción se obtuvo un DNA con una pureza de 2.01 comparable a la obtenida con otros métodos de purificación los cuales utilizan enzimas para degradar la pared celular y extracciones con fenol-cloroformo (Pfeifer *et al.*, 1993). Se ha observado que este método de extracción es altamente reproducible, y la variación en cuanto a la velocidad de crecimiento y cantidad de DNA obtenido por cada cepa se resuelve al cuantificar y ajustar la concentración de DNA usadas en la reacción de PCR.

Para este estudio seleccionamos los iniciadores OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-11, OPA-13, OPA-18 y OPA-19 del Kit A de Operon Technologies, los cuales poseen entre 60 y 70 % de G+C (Tabla 5). Recientemente se ha reportado el uso de iniciadores con un contenido de 80-100% de G+C en hongos (Kubelik, 1995); sin embargo nosotros obtuvimos patrones de bandas reproducibles, intensos e informativos con

iniciadores de 60-70% de G+C. Así mismo, los iniciadores utilizados poseen un residuo de C en la posición 7-10. Estos iniciadores concuerdan con la tendencia general de usar "primers" con estas características. Los iniciadores usados difieren ligeramente en su secuencia, al parecer no existe preferencia por la posición de los nucleótidos, pero se ha observado que más del 76% de los primers citados poseen G o C en la posición 10, existe además una tendencia de utilizar iniciadores con Citocina en las posiciones 7, 8, 9 y 10 (Haymer, 1994).

La Amplificación al Azar de DNA Polimórfico resultó ser un método eficiente para detectar variabilidad genética entre 7 cepas de *B. bassiana* y 9 de *P. fumosoroseus*, aisladas de diferentes hospederos y zonas geográficas. Recientemente se había demostrado la utilidad de estos marcadores en la separación de cepas en algunos de estos entomopatógenos como *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus* y *B. bassiana* (Fegan, 1993; Bidochka *et al.*, 1994; Tigano *et al.*, 1995).

Al comparar los valores de disimilitud se observó que en este caso las cepas de *B. bassiana* presentaron una mayor variabilidad a nivel genómico (Vd= 0.55) que las cepas de *P. fumosoroseus* (Vd= 0.48). Esto coincide con la gran variabilidad genética que se ha reportado entre aislados de *B. bassiana*, especialmente los procedentes de distintas áreas geográficas (Kosir, 1991). En este estudio cada una de las cepas de *B. bassiana* fue aislada de diferente zona geográfica y diferente hospedero a excepción de las cepas SARL 137 y SARL 139 las cuales comparten ambas características. Esto indica además que los marcadores morfológicos utilizados en la taxonomía de *B. bassiana* no es muy precisa al definir grupos genéticamente uniformes.

En especial con el iniciador OPA-13 se observó una gran variabilidad entre las cepas de *B. bassiana*, lo cual nos indica que este iniciador podría utilizarse en caso de tener cepas que compartan varias características como hospedero, origen geográfico o virulencia. A diferencia de las cepas de *B. bassiana*, todas las cepas de *P. fumosoroseus* a excepción de

la UAN-7 fueron aisladas del género *Bemisia* y en general mostraron patrones de amplificación similares.

Las cepas de ambos hongos amplificaron algunas bandas en común (por ejemplo: 1032-1186 pb en *B. bassiana* con el iniciador OPA-03 y 524-591pb en *P. fumosoroseus* con el iniciador OPA-03). Durante algún tiempo se cuestionó si estos fragmentos que migran a la misma distancia, son realmente homólogos, o representan simplemente bandas con una talla molecular similar. Estudios de hibridación realizados en *B. bassiana*, al igual que en otros entomopatógenos como *M. anisopliae*, y en hongos fitopatógenos como *Eutypa lata* han confirmado la homología de estos fragmentos co-migrantes (Bidochka *et al.*, 1994 ; Peros. 1997). Así pues, estas bandas comunes entre cepas pudieran emplearse en la identificación específica de estos hongos.

Mediante el método de análisis de agrupamiento (Cluster Analysis) se logró separar las cepas de *B. bassiana* en tres grupos. el primero formado por las cepas BB2 y SARL 137, estas cepas a pesar de que no comparten hospedero ni origen geográfico se comportaron de manera similar, ambas presentaron problemas al realizar la extracción de DNA y sus productos de amplificación fueron muy pobres, tanto en número de fragmentos amplificados como en su intensidad.

Un grupo bien definido se formó con las cepas BBGHA y 291/95. estos aislados no comparten hospedero ni origen geográfico. sin embargo ambas cepas se utilizan comercialmente y poseen la característica de que en medio sólido su crecimiento vegetativo se encuentra reprimido y se presentan casi en su totalidad como esporas, se ha observado que estas cepas tienden a ser mas virulentas que las cepas con crecimiento algodonoso (Feng. 1994). Sin embargo, a pesar de que estos aislados comparten varios fragmentos con la mayoría de los iniciadores, solo con el OPA-09 fue posible detectar un patrón de amplificación único para estas cepas, el cual pudiera ser utilizado como marcador genético en la búsqueda de aislados con importancia comercial. Probablemente el grupo con mayor similitud fue el formado por las cepas SARL 137 y SARL 139 las cuales no poseen ninguna

relación en cuanto a sus características de aislamiento, sin embargo con todos los iniciadores presentaron patrones de amplificación muy parecidos.

Solo al realizar dendogramas utilizando los marcadores obtenidos con un solo iniciador, se logró relacionar las cepas mexicanas de *B. bassiana* (BB2 y 291/95), esto se observó con el iniciador OPA-02 con el cual presentaron una banda común de 794-813 pb y con el OPA-18, se presentó un patrón casi idéntico a excepción de un fragmento de 2033 pb presente solo en la cepa 291/95 (Apéndice E). Estas bandas pudieran considerarse como específicas en cepas aisladas de esta región geográfica, ya que ambas cepas fueron aisladas del estado de Sinaloa. Sin embargo sería necesario analizar un número mayor de cepas originarias de esta zona para poder realizar esta afirmación.

Con los iniciadores OPA-02 y OPA-04 se logró asociar las cepas SARL 137 y SARL 139, las cuales a pesar de compartir el mismo hospedero y origen geográfico se comportaron en todos aspectos de manera distinta, sin embargo con estos iniciadores fue posible detectar patrones de amplificación semejantes aunque en ambos casos los fragmentos presentados por la cepas SARL 137 fueron muy tenues. Es probable que no se encontrara asociación entre las cepas de *B. bassiana* aisladas de un mismo hospedero, debido a la amplia gama de insectos que puede infectar (Bidochka *et al.*, 1994). A pesar de que morfológicamente la cepa SARL 141 esta clasificada como *B. bassiana*, esta resultó ser muy divergente con respecto al resto de las cepas, lo cual se observó con los ocho iniciadores utilizados, sin embargo la cepa SARL 141 siempre amplificó bandas características de *B. bassiana* por lo cual no se puede sugerir que esta cepa pudiera representar otra especie. Estos resultados se apoyan en el hecho que estudios de isoenzimas en *B. bassiana* han demostrado que las diferentes cepas presentan mucha homología, aunque existen algunos aislados muy divergentes que aun así se incluyen en el mismo género y especie (Hajek *et al.*, 1994).

Con anterioridad se reportó una correlación entre genotipos particulares y especificidad hacia hospedero en otros entomopatógenos como *M. anisopliae* (Fegan.

1993), pero en las cepas de *P. fumosoroseus* aisladas de *B. tabaci* no se había encontrado relación entre hospedero y patrón de amplificación, al emplear los iniciadores OPA-09, OPA-10, OPA-13, OPA-14 y OPA-17 (Tigano *et al.*, 1995). En este trabajo se logró separar las cepas de *P. fumosoroseus* aisladas de *B. tabaci* al utilizar el iniciador OPA-03, ya que a excepción de la cepa mexicana 270/97 todas las cepas aisladas de “mosquita blanca” formaron claramente un grupo con este iniciador.

A sí mismo, logramos relacionar de manera notable las cepas SARL 114 y SARL 115 las cuales fueron aisladas en Weslaco, Tx. de *B. tabaci*, estas cepas mostraron patrones de amplificación casi idénticos, y tal vez se pueda asumir que estas dos cepas sean una misma. Al igual que en *B. bassiana*, las cepas mexicanas 290/97 y la UAN-7 no presentaron mucha similitud y solo se logró asociarlas con el iniciador OPA-11, con el cual compartieron una sola banda de 562-577 pb (Fig. 7). De hecho estas cepas se diferenciaron porque no amplificaron bandas características en resto de las cepas de *P. fumosoroseus*, la ausencia de un fragmento se puede deber a mutaciones puntuales en uno o ambos sitios de alineamiento del iniciador, o a inserciones que pudieran separar los sitios de alineamiento a una distancia a la que ya no ocurre la amplificación (Black, 1993). Sin embargo en este tipo de ensayos la ausencia de un fragmento no se considera como indicador de similitud.

Un aspecto de llamar la atención es que la cepa mexicana UAN-7 se mostró muy distinta al resto de los aislados, y no se logró asociarla con un grupo definido, esto probablemente se deba a que posee hospedero y origen geográfico diferente del resto de las cepas, y por el contrario la cepa 290/97 aun y cuando fue aislada también en México posee el mismo hospedero y presenta cierta similitud con el resto de las cepas.

En este estudio no encontramos un marcador específico para diferenciar las mutantes de *P. fumosoroseus*, las cuales presentaron mucha similitud con respecto a la cepa Pfr. 612 (paterna). Estas cepas solo se diferenciaron en un par de fragmentos, los cuales no pueden considerarse como marcadores importantes, esto nos indica que tal vez las modificaciones a nivel de DNA fueron tan pequeñas que nos son detectables. En *B.*

bassiana se han empleado análisis de RFLP para identificar mutantes de las silvestres (Kosir, 1991). Quizá sea necesario utilizar otra serie de iniciadores los cuales sean capaces de detectar estas regiones modificadas de DNA, ya que se ha observado que los marcadores RAPD revelan un mayor polimorfismo que otras técnicas como el análisis de isoenzimas, debido a que rastrean una mayor parte del genoma (Tigano *et al.*, 1995).

Por otro lado, se observó que las cepas mutantes se mantuvieron muy cercanas entre ellas con todos los iniciadores, agrupándose además al igual que la cepa paterna P.fr. 612 con el resto de las cepas aisladas del género *Bemisia* originarias de Weslaco, Tx. Este estudio revela un alto grado de variabilidad intraespecífica no solo dentro de estas especies, sino también en cepas aisladas del mismo hospedero y área geográfica. Así mismo, muestra que la variabilidad genética revelada por los marcadores RAPD podrían tomarse como ayuda para realizar una taxonomía más fina que la basada en caracteres morfológicos como la observación de conidias, las cuales comúnmente son utilizadas para la identificación a nivel de género.

Es definitivo que antes de utilizar cepas específicas como agentes de biocontrol, es necesario demostrar su efectividad, para esto se requiere de una determinación precisa de cuales cepas serán capaces de matar al hospedero bajo condiciones de campo. Nuestros datos resaltan la importancia de evaluar la variabilidad genética entre los aislados que se encuentran en poblaciones endémicas, con respecto al las cepas potencialmente usadas como inóculo, antes de iniciar estudios de liberación. Se requiere una buena identificación de los aislados introducidos, cuando se encuentran presente aislados que son genéticamente similares.

Conclusiones

- 1.- El acetato de sodio afecta de manera importante la amplificación de DNA en los ensayos tipo RAPD.
- 2.- El análisis de los marcadores RAPD revelaron mayor polimorfismo en *B. bassiana* que en *P. fumosoroseus*
- 3.- El iniciador OPA-13 reveló gran variabilidad genética entre las cepas de *B. bassiana*.
- 4.- Las cepas comerciales BBGHA y 291/95 de *B. bassiana* presentaron un patrón de amplificación único con el iniciador OPA-09.
- 5.- Los iniciadores OPA-02 y OPA-18 relacionaron las cepas mexicanas BB2 y 291/95 de *B. bassiana*.
- 6.- Las cepas de *P. fumosoroseus* aisladas de *B. tabaci* se agruparon al utilizar el iniciador OPA-03.
- 7.- La cepa mexicana UAN-7 aislada de *Musca domestica* no se asoció a ningún grupo definido de *P. fumosoroseus*.
- 8.- Las cepas mutantes de *P. fumosoroseus* se mantuvieron cercanas entre ellas con todos los iniciadores empleados.
- 9.- Las mutantes obtenidas de *P. fumosoroseus* se agruparon con el resto de las cepas aisladas del género *Bemisia*.

Apéndice A

Talla Molecular (pares de bases) de los productos de RAPD's obtenidos con diferentes iniciadores a partir de las cepas de *B.bassiana* .

<i>B.bassiana</i> cepa 141							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
538.58	199.30	221.70	339.47	179.16	391.27	221.70	450.98
1020.98	316.20	294.52	519.80	690.54	467.28	284.25	578.22
	391.27	599.12	666.46	1057.36	599.12	405.41	917.37
	620.77	1176.20	741.36	1308.40	795.92	538.58	1677.55
	768.15	1619.04	854.49	1508.06	984.88	643.21	
	885.37	2003.43	1135.17	1562.56	1404.69	984.88	
	1135.17		1508.06	2003.43	1619.04	1218.71	
	1308.40		1619.04	2568.67	1933.54	1455.45	
	1404.69		1866.10	2960.65	2075.83	1619.04	
	1562.56		2075.83			1738.18	
	1677.55		2857.37			1866.10	
	1801.01					2309.14	
	1933.54					2857.37	
	2075.83						

<i>B.bassiana</i> cepa 137							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
288.84	1100.69	307.84	620.39	620.39	727.50	216.85	661.20
307.84	1375.62	480.83	751.04	853.10	1250.25	582.10	1823.89
546.17	1420.14	853.10	1100.69	1774.87	1513.56		
661.20		909.21	1250.25		1774.87		
1173.09		1250.25					
1250.25							
1562.54							
1665.32							

<i>B. bassiana</i> cepa 139							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
528.09	374.49	291.66	374.49	579.98	511.84	213.40	265.57
657.19	544.85	466.04	598.39	792.70	699.57	544.85	562.14
959.15	1083.44	636.97	744.68	1083.44	843.82	843.82	1626.32
1153.30	1348.31	843.82	1050.11	1677.94	1017.80	959.15	1786.14
1183.62	1435.25	1227.67	1153.30		1189.90		
1527.81	1677.94		1626.36		1266.63		
1626.32	1901.32		1786.14		1435.25		
2099.97			2023.92		1731.19		
2721.35			2154.43		1901.32		

<i>B. bassiana</i> cepa 291/95							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
675.63	847.64	272.71	389.49	654.09	521.36	224.53	272.70
794.45	1098.46	521.36	764.23	847.64	1063.44	574.58	556.27
934.17	1334.17	675.63		1172.00	1210.59	1134.63	1134.63
1172.00	1518.79	847.64		1470.37	1291.64	2033.02	
1518.79	1728.96	1134.63		1785.90	1518.79		
1673.84	1844.71	1250.46		1905.46	1673.84		
1785.90	2033.02	1518.79		2169.13	1785.90		
	2240.56	1728.96		2810.97	2033.02		
	2721.35	2099.97			2240.56		
	2999.16	2240.56			2390.56		
		3526.60					

B. bassiana cepa BB 2

OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
316.85	433.89	270.76	394.84	204.04		224.22	
557.97	632.73	492.03	613.15	652.94		575.78	
594.17	866.46	717.51	866.46	813.66		1079.74	
632.73	952.15	866.46	1263.52	952.15			
813.66	1046.32	1224.42	1478.58	1525.80			
922.68	1186.52			1785.51			
1114.22	1525.80						
1525.80	2089.42						
1624.82							

Apéndice B

Talla Molecular (pares de bases) de los productos de RAPD's obtenidos con diferentes iniciadores a partir de las cepas de *P. fumosoroseus*.

<i>P.fumosoroseus</i> cepa 115							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
149.63	307.49	350.52	278.73	412.86	967.16	374.24	744.30
261.06	328.30	412.86	697.12	470.63	1432.60	572.79	1633.05
1139.18	591.85	905.86	821.11	999.35	1861.55	1177.09	1923.50
1216.27	769.07	967.16	1256.75	1177.09	2582.63	1298.58	2341.02
1580.41	936.01	1077.09	1432.60	1743.56		1633.05	2757.40
1687.40	1102.49	1480.27	1687.40	2122.02		1801.59	
2053.67	1177.09	1743.56	2265.62	2341.02		2122.02	
2265.62	1529.54		2499.44	2849.17		2582.63	
2418.93	1633.05					2668.58	
	1987.52					3825.49	
	4360.76						

<i>P.fumosoroseus</i> cepa 76							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
115.79	308.17	99.60	168.73	1029.59	320.00	358.26	1029.59
245.86	584.45	1108.40	196.15	1195.08	953.45	562.85	1108.40
562.85	732.57	1240.93	255.29	2182.72	1389.31	851.62	1497.95
851.62	953.45	1741.40	401.09	2266.47	1555.42	990.03	1877.58
1029.59	1108.40	2024.41	630.15		1741.40	1108.40	2266.47
1150.93	1288.54	2266.47	705.50		2182.72	1497.95	2634.81
1240.93	1741.40	3429.25	884.30		2735.89	1555.42	
1497.93	1877.58		1195.08		2949.85	1808.21	
1741.40	2182.72		1497.95			2024.41	
1877.58	2353.42		1741.40			2182.72	
2024.41	4139.52		1877.58			2443.71	
2443.71			2024.41				
2735.89			3180.53				
3180.53							

<i>P. fumosoroseus</i> cepa 114							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
107.06	229.26	90.73	214.57	364.42	289.04	329.97	661.28
200.82	261.72	683.54	618.92	416.02	754.91	507.43	920.78
474.92	524.50	806.58	730.33	951.77	920.78	806.58	1415.98
661.28	833.73	920.78	806.58	1123.10	1369.87	951.77	1616.46
1016.92	890.80	1123.10	1199.97	1727.10	1785.23	1123.10	1907.43
1123.10	1016.92	1325.26	1415.98	2037.99	2037.99	1240.36	2326.53
1463.64	1086.53	1415.98	1670.86	2326.33	2250.78	1616.46	2837.72
1616.46	1463.64	1512.90	1970.43	2933.24	2837.72	1785.23	
1786.23	1907.43	1670.86	2655.93			2037.99	
1907.43	4510.72	1907.43				2655.93	
2177.49		2037.99				4084.28	
2485.78		2177.49					
2933.24		2837.72					
3239.51		3461.24					

<i>P. fumosoroseus</i> cepa 270/97							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
115.67	276.44	96.81	233.80	577.77	308.46		1745.76
1129.29	540.32	305.68	638.87	923.61	966.65		2523.82
1380.76	1092.07	807.76	1427.81	1092.07	1387.56		2984.15
1745.76	1207.56	1129.29		1380.76	2065.07		
2064.17		1745.76		1632.60	2141.09		
2282.45							

<i>P.fumosoroseus</i> cepa M-84							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
133.85	275.88	117.71	256.63	410.65	342.72	368.43	681.30
230.24	296.57	846.39	657.11	457.70	978.12	548.42	943.38
510.15	548.42	943.38	846.39	657.11	1404.24	611.26	1354.37
732.40	909.87	1130.35	978.12	759.37	1808.74	846.39	1509.56
1051.48	1014.14	1306.26	1215.13	1014.14	2016.00	978.12	1808.74
1130.55	1130.35	1404.24	1404.24	1130.35	2167.21	1130.35	
1455.05	1455.95	1509.56	1622.78	1215.13	2504.50	1565.15	
1622.78	1565.15	1682.54	1744.50	1682.54	2596.72	1808.74	
1808.74	1622.78	1875.34		2016.00	2791.48	2016.00	
1875.34	1875.34	1944.40		2247.01		2504.50	
1944.40		2090.24		2504.50		3727.99	
2167.21							
2329.76							

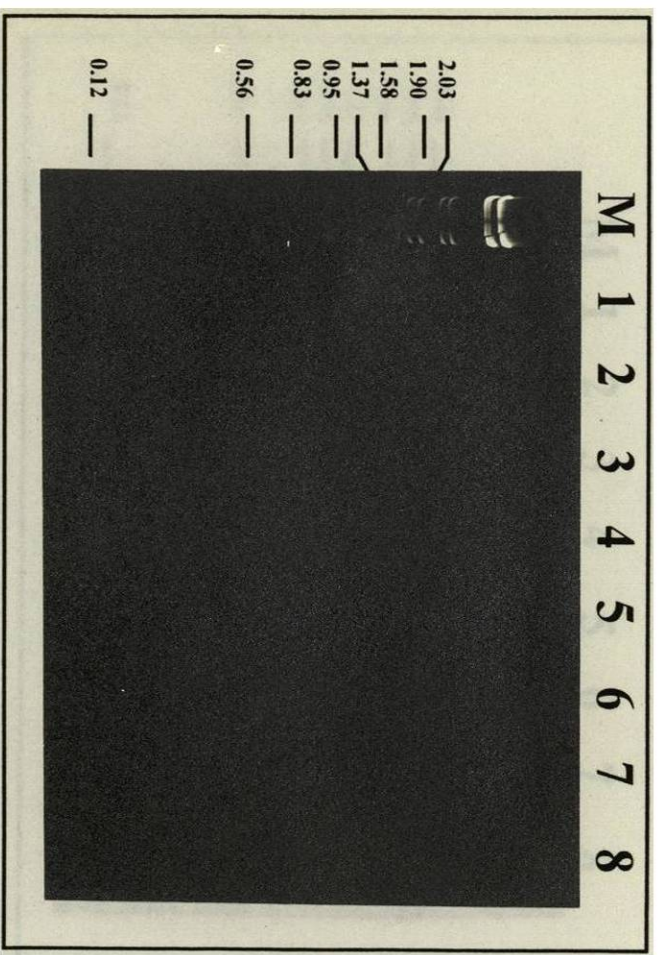
<i>P.fumosoroseus</i> cepa M-846							
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
137.90	306.70	121.34	261.38		1378.29	359.86	1617.22
528.16	563.04	750.78	383.63		1708.03	545.32	1837.86
1067.22	939.10	800.93	800.93		2226.53	826.36	
1174.66	1137.70	1001.11	1378.29		2530.29	969.61	
1517.05	1334.92	1174.66	1423.07			1137.70	
1669.77	1517.05	1334.92	1669.77			1566.33	
1724.02	1669.77	1378.29	1837.86			1708.03	
1837.86	1897.57	1469.31	2022.88			2022.88	
2022.88		1566.33				2530.29	
2298.86		1724.02				3713.64	
2450.67		1959.23					
		2022.88					
		2226.53					

P. fumosoroseus cepa M-32

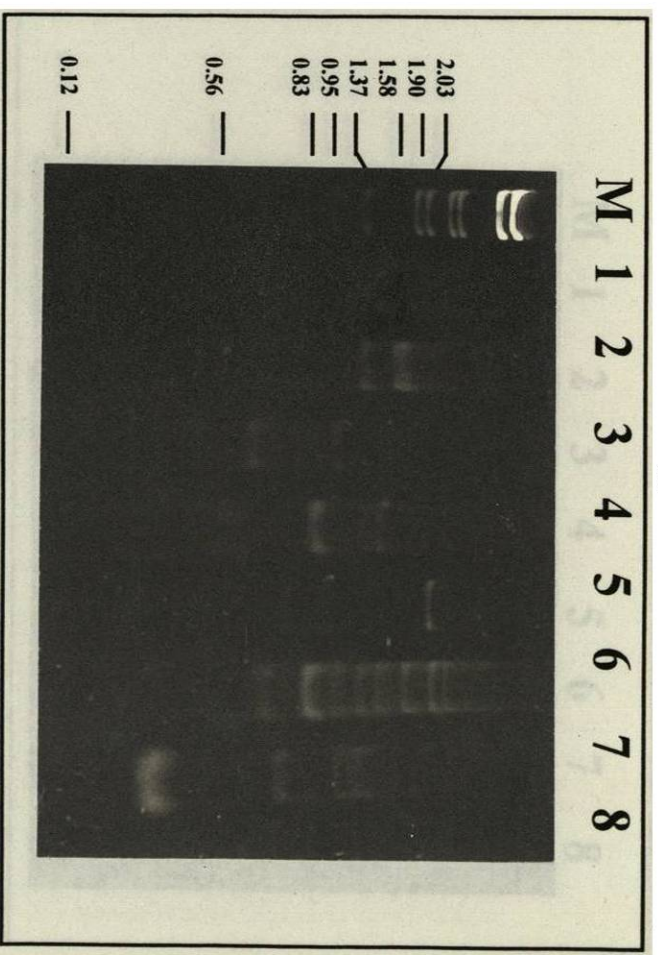
OPA-02	OPA-03	OPA-04	OPA-09	OPA-11	OPA-13	OPA-18	OPA-19
116.34	243.22	97.61	226.72	411.86	345.54	333.61	1510.08
218.90	270.24	300.26	627.69	923.63	457.61	508.45	1799.90
990.83	526.62	697.42	802.60	1619.94	923.63	564.93	
1100.90	860.99	802.60	1140.24	1999.86	1359.09	802.60	
1407.66	1062.91	891.76	1359.09	2145.35	1799.90	923.63	
1619.94	1510.08	110.90	1619.94		2648.50	1062.91	
1737.80	1864.23	1359.09	1737.80			1564.04	
1864.20	4180.70	1619.94				1737.80	
2145.35		1864.23				1999.86	
2301.44		2071.33				2468.88	
2841.18						2557.11	
3269.64							

Apéndice C.- Patrón de amplificación genética de las cepas de *B. bassiana*

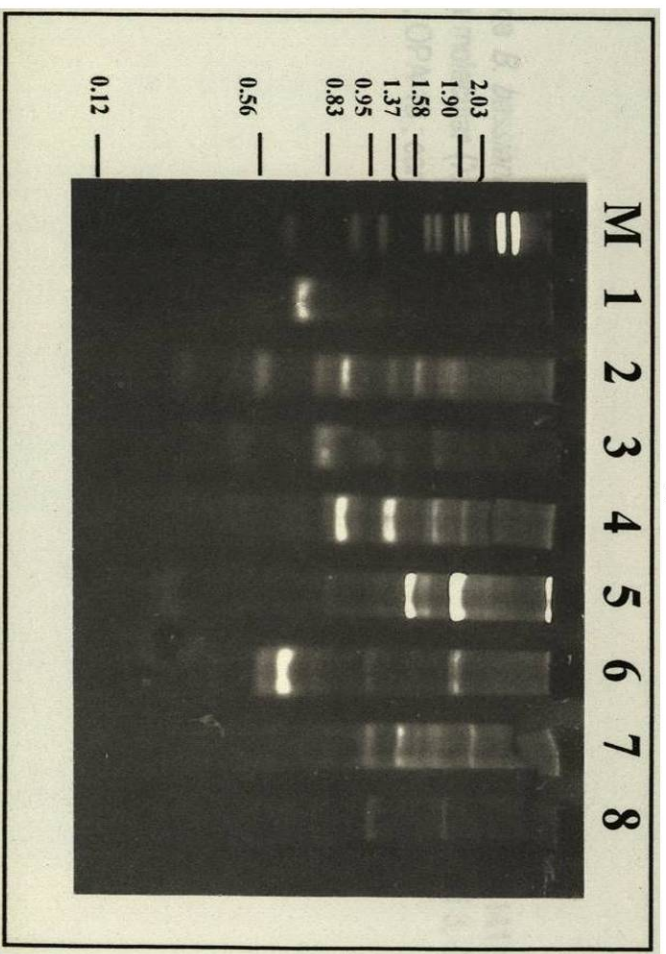
A



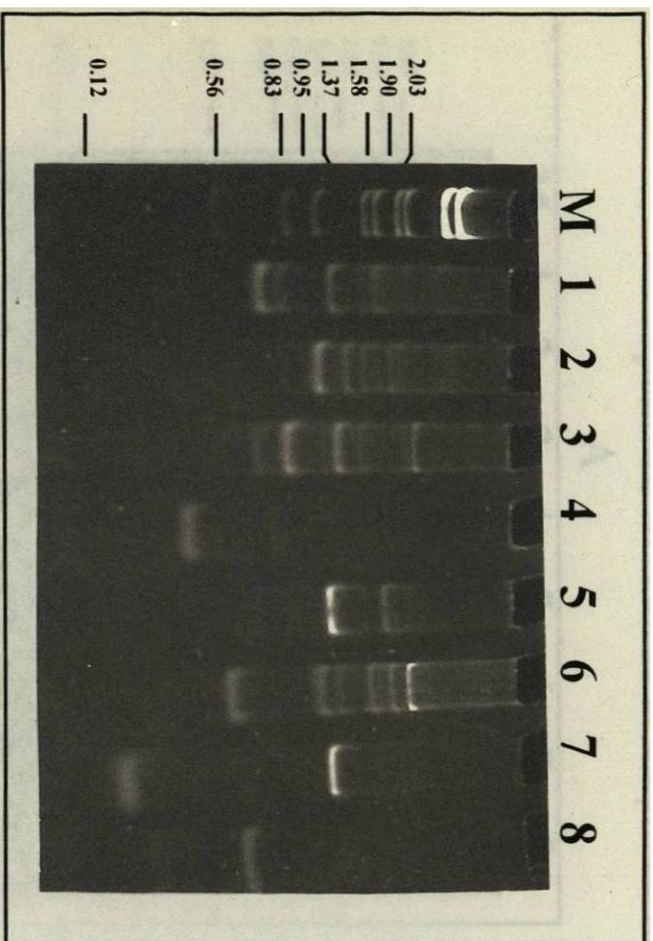
B



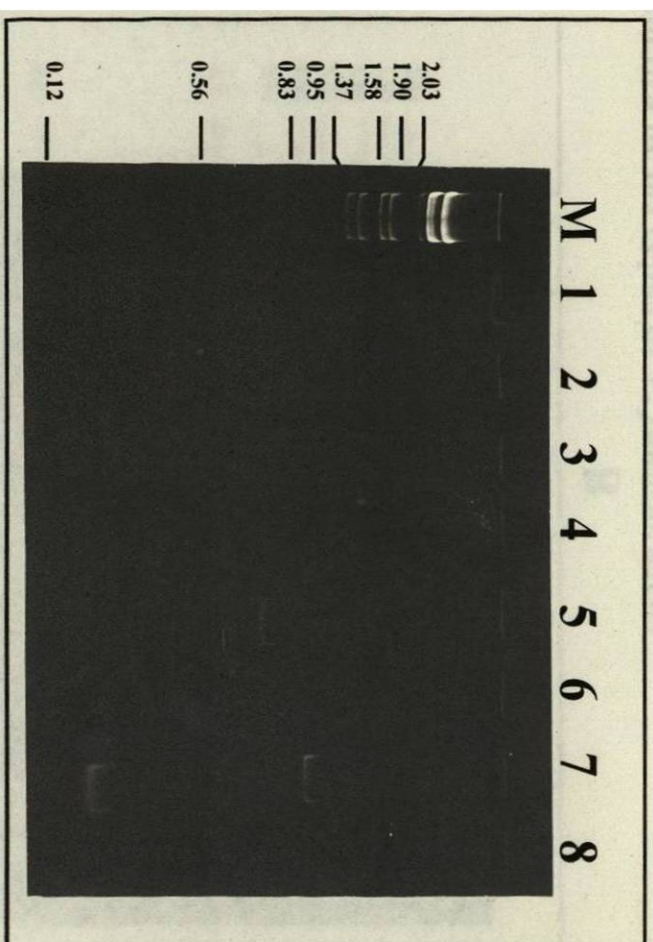
C



D



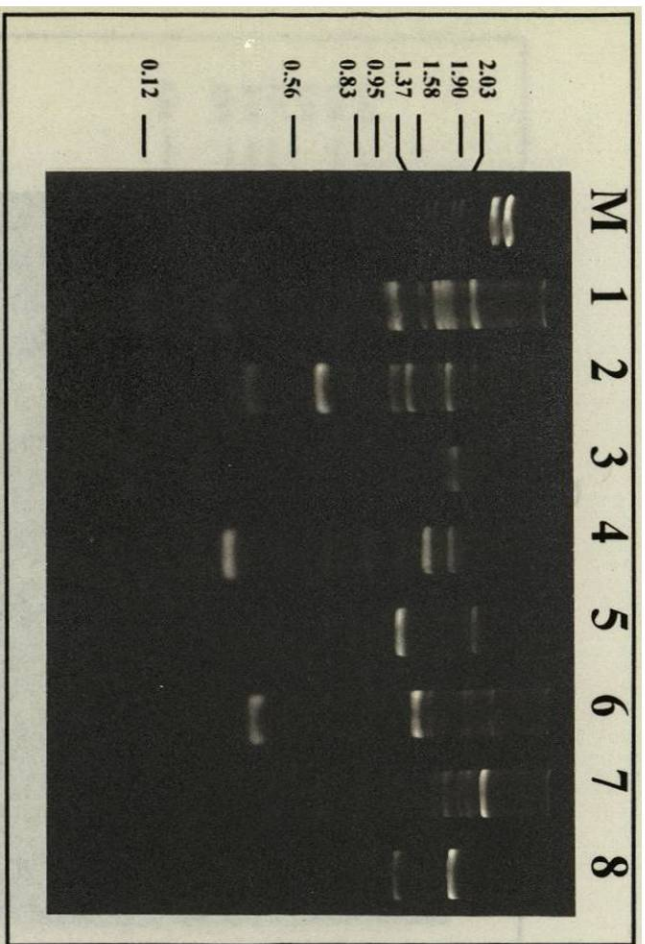
E



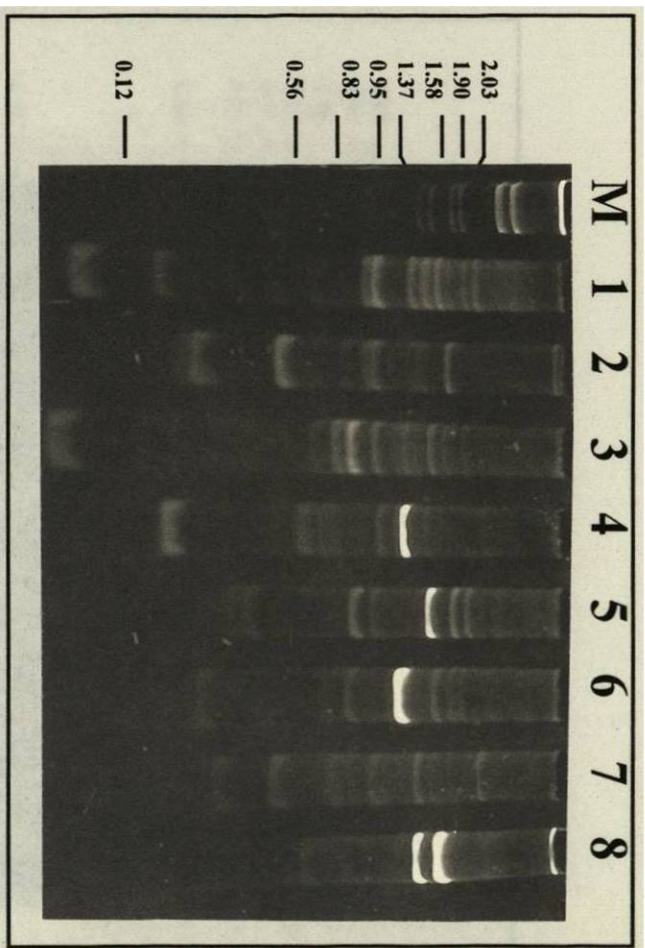
Patrón de amplificación genética de *B. bassiana* cepas SARL 137 (panel A), SARL 139 (panel B), SARL 141 (panel C), 291/95 (panel D), BB 2 (panel E). M, Marcadores de talla molecular (λ -HindIII-EcoRI); carril 1, OPA-02; carril 2, OPA-03; carril 3, OPA-04, carril 4, OPA-09; carril 5, OPA-11, carril 6, OPA-13; carril 7, OPA-18; carril 8, OPA-19.

Apéndice D.- Patrón de amplificación genética de las cepas de *P. fumosoroseus*

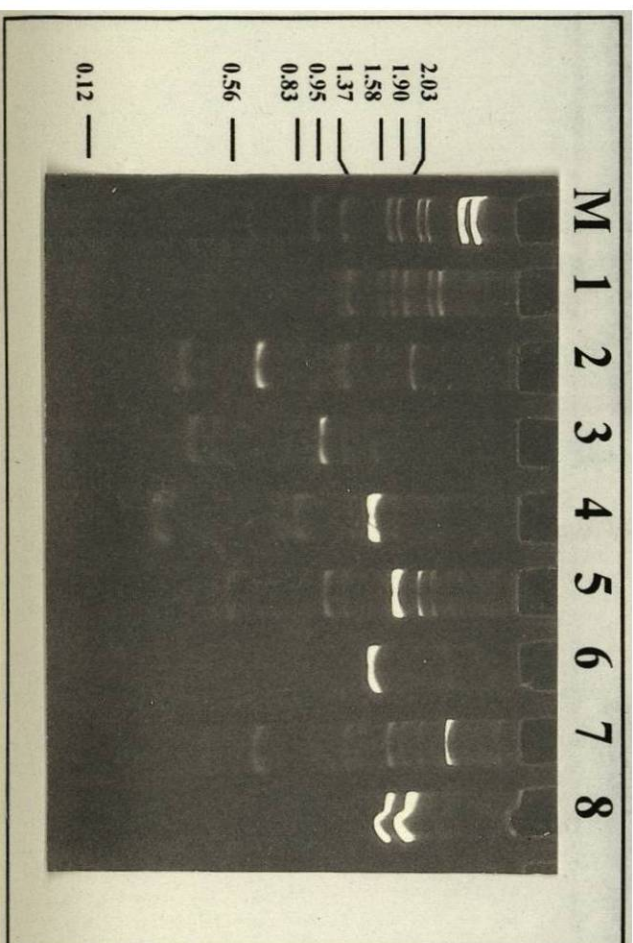
A



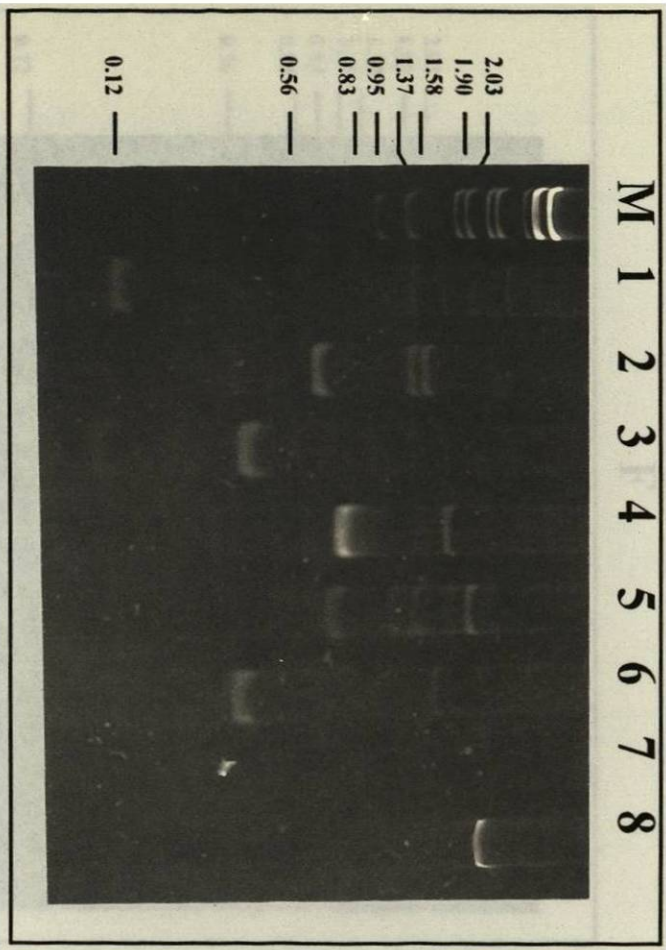
B



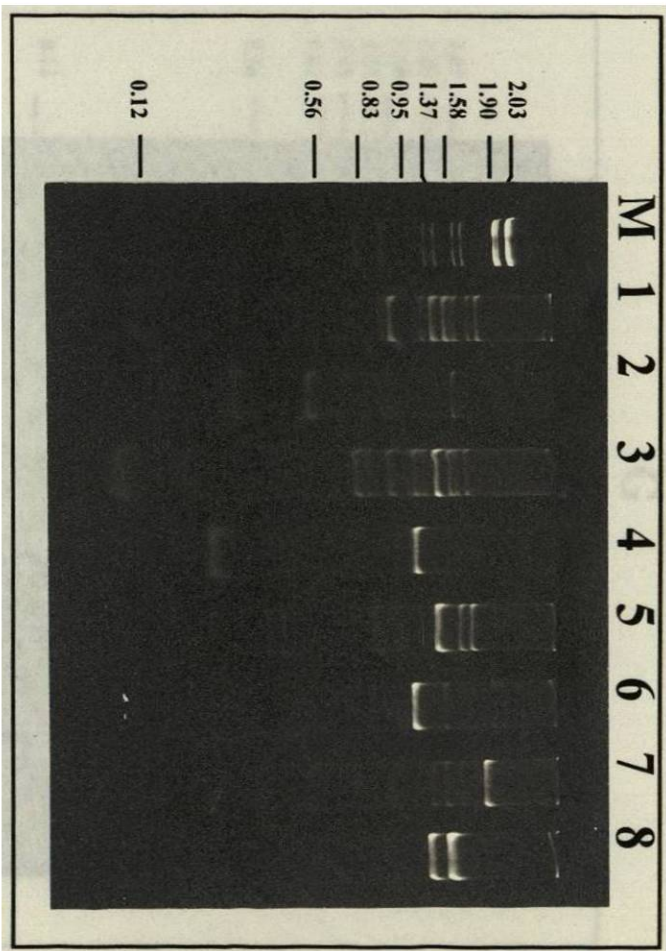
C

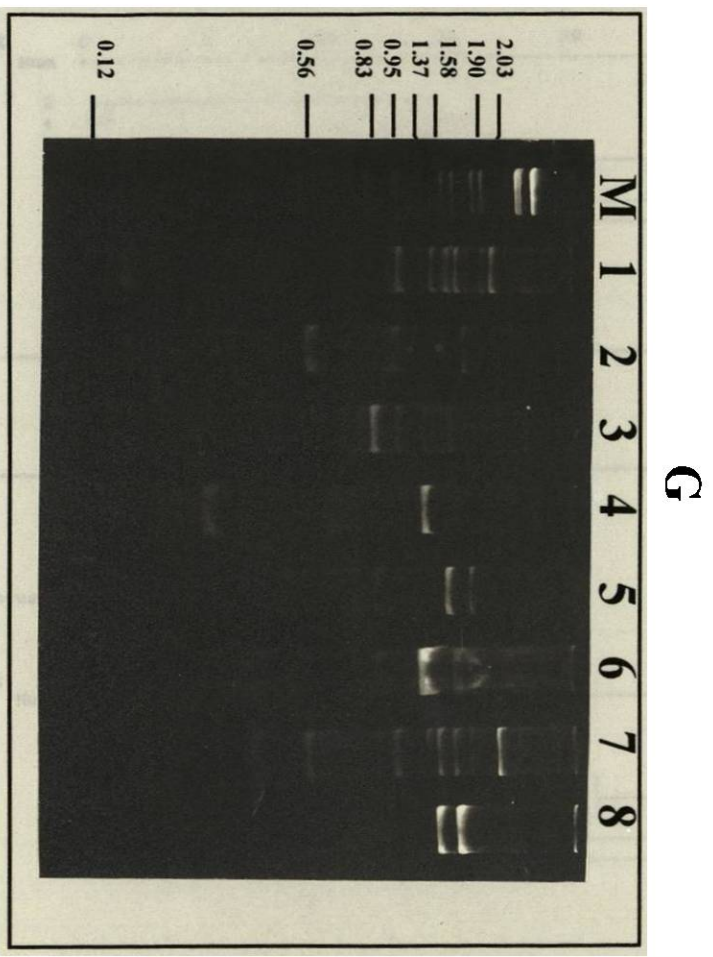
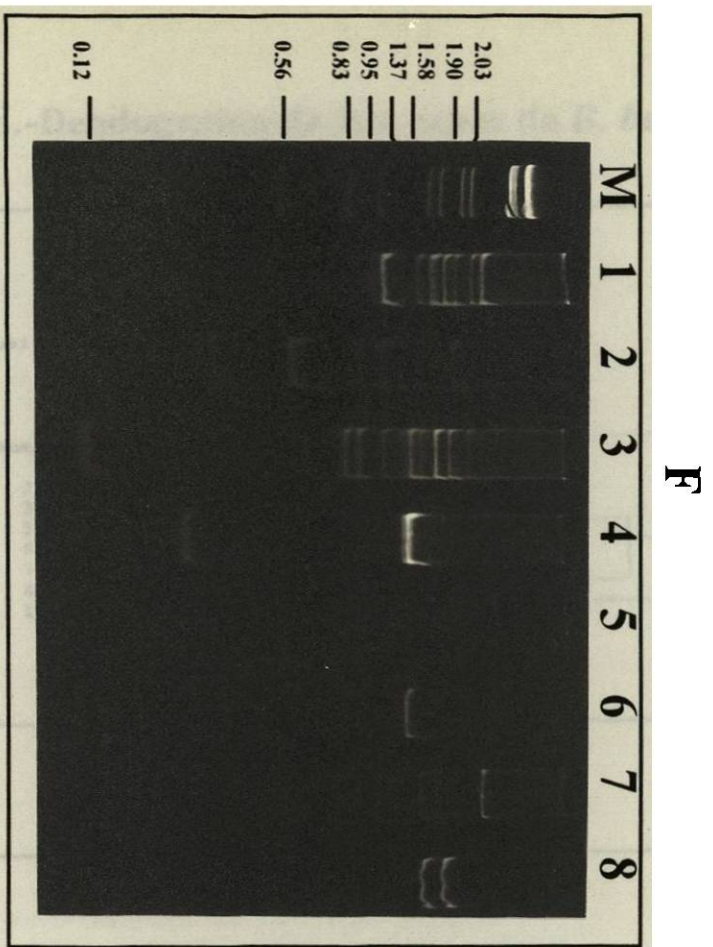


D



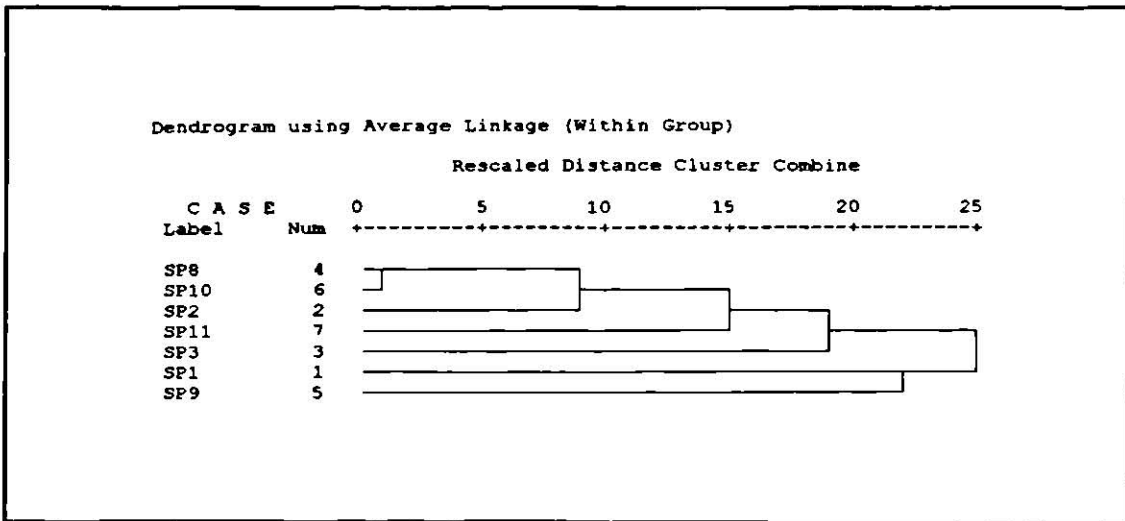
E



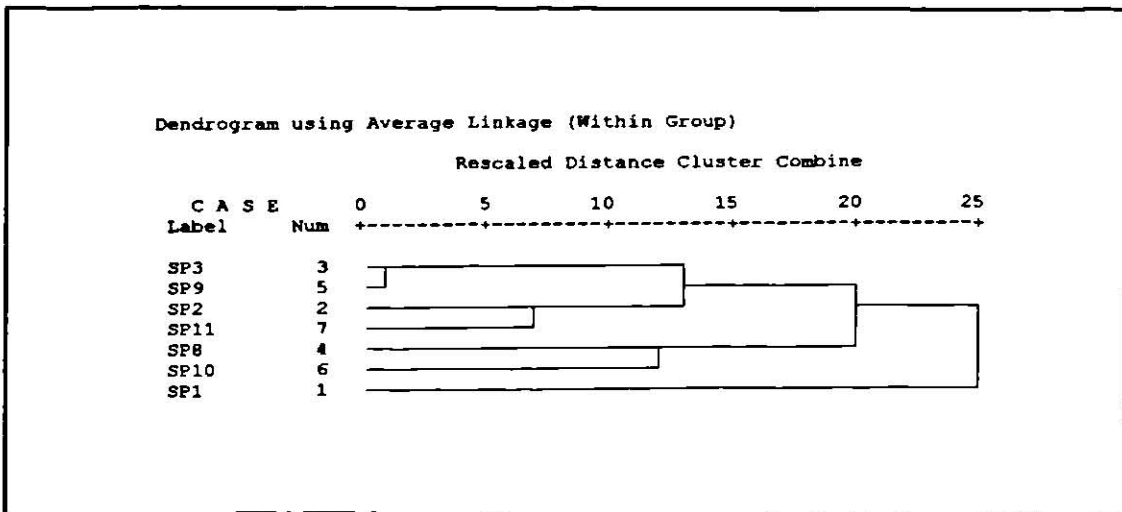


Patrón de amplificación genética de *P. fumosoroseus* cepas SARL 76 (panel A), SARL 114 (panel B), SARL 115 (panel C), 270/97 (panel D), M-84 (panel E), M-846 (panel F), M-32 (panel G). M, Marcadores de talla molecular (λ -*Hind*III-*Eco*RI); carril 1, OPA-02; carril 2, OPA-03; carril 3, OPA-04; carril 4, OPA-09; carril 5, OPA-11; carril 6, OPA-13; carril 7, OPA-18; carril 8, OPA-19.

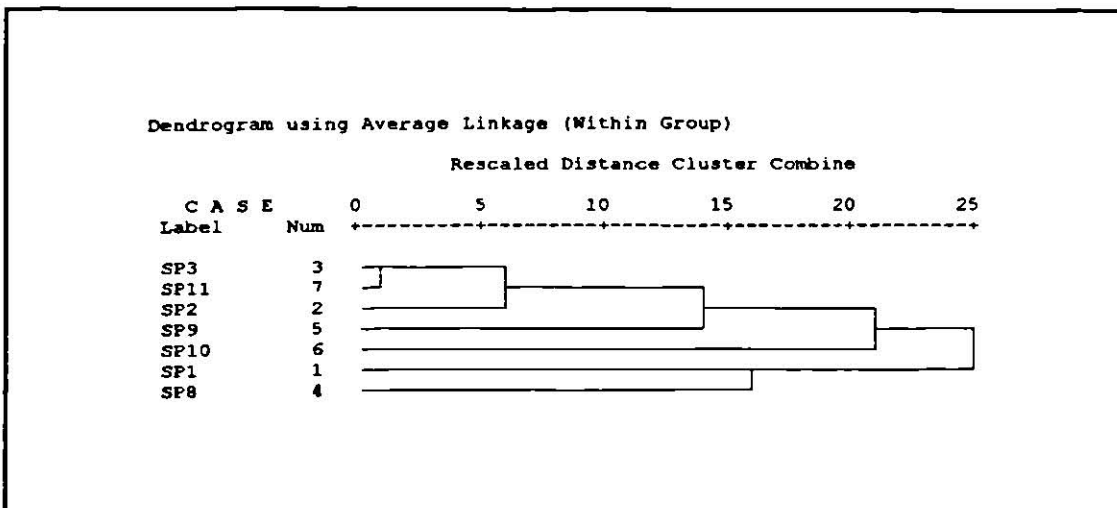
D



E

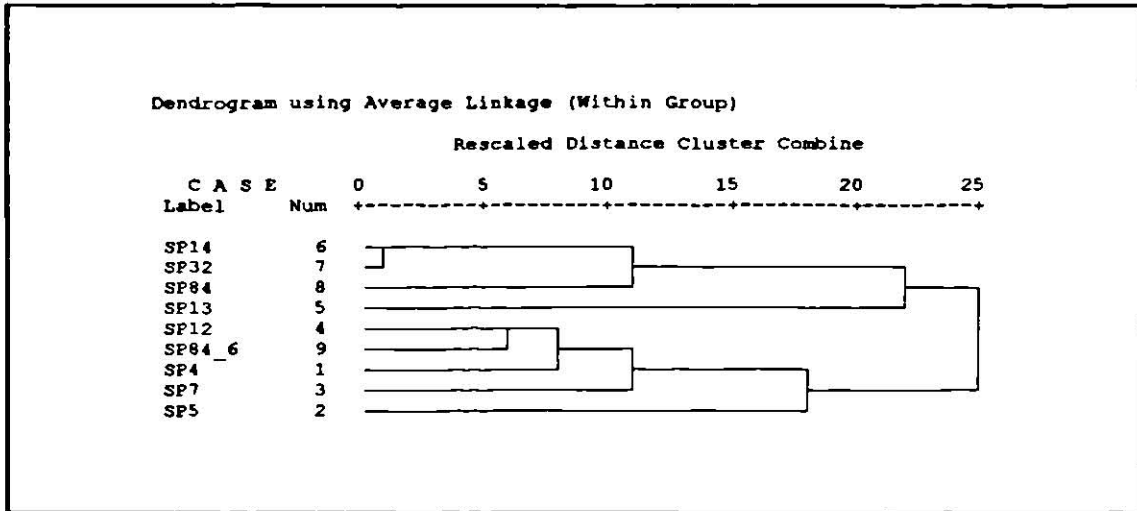


F

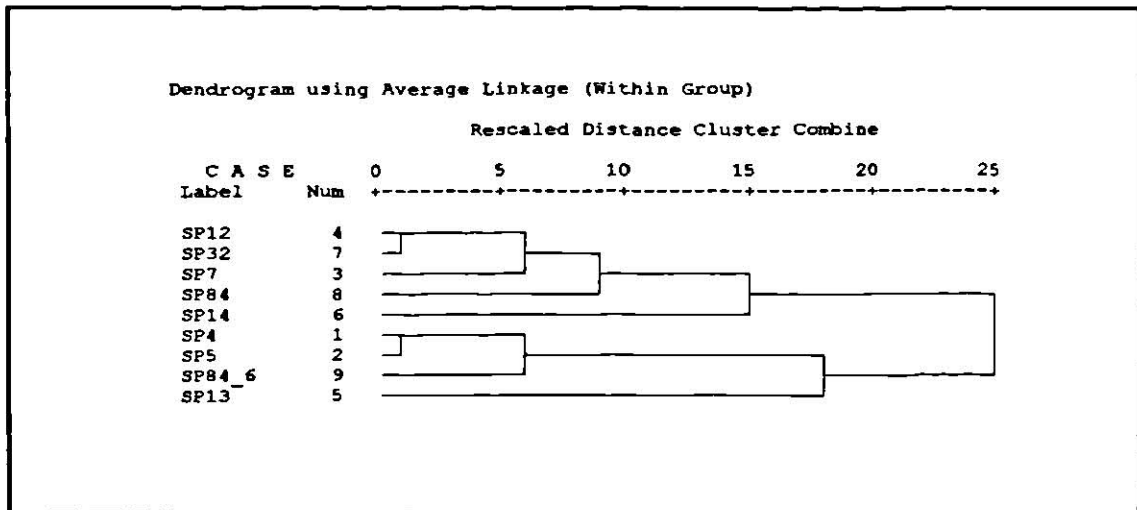


Apéndice F.- Dendrograma de las cepas de *P. fumosoroseus*

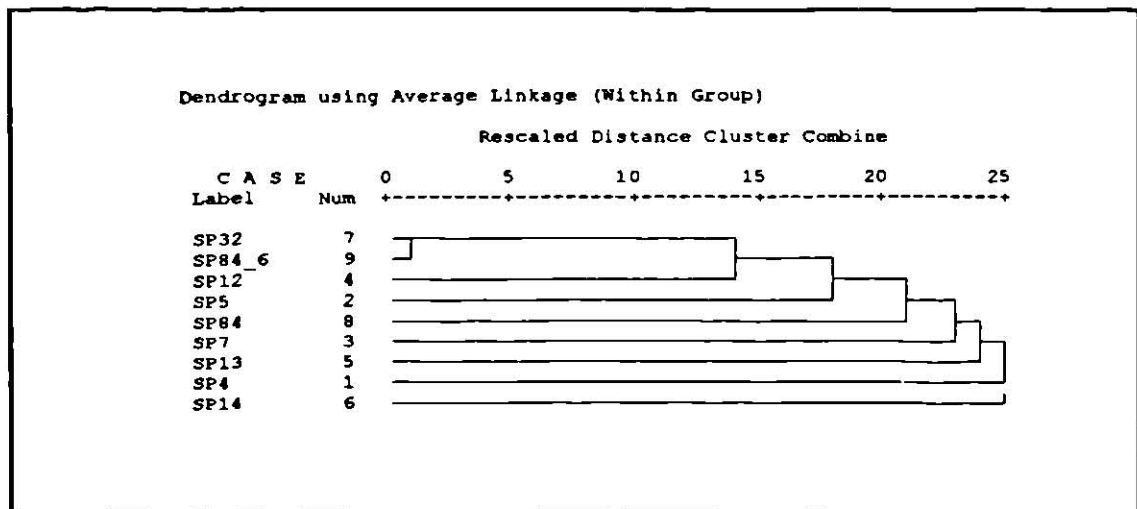
A



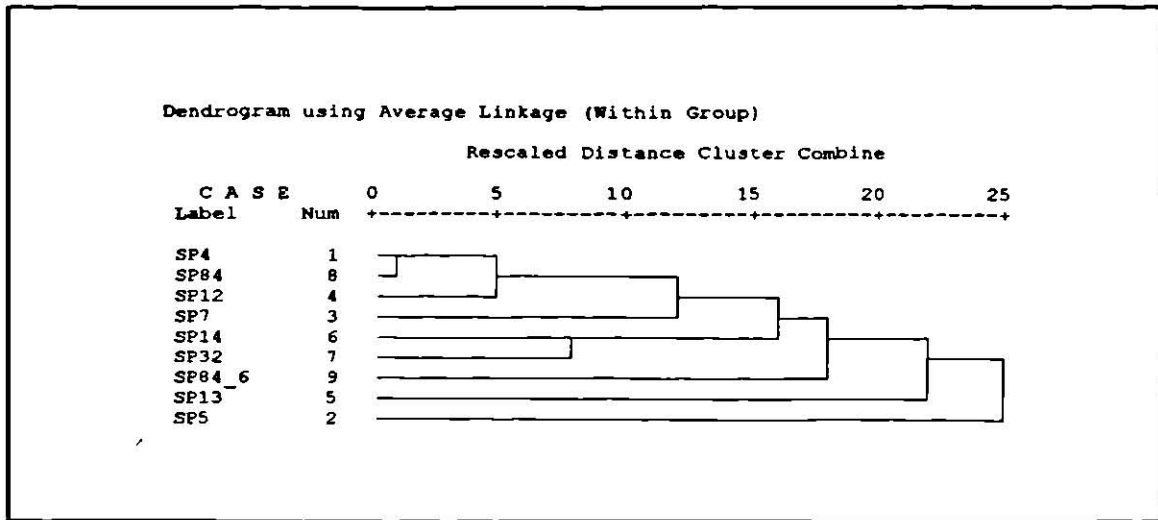
B



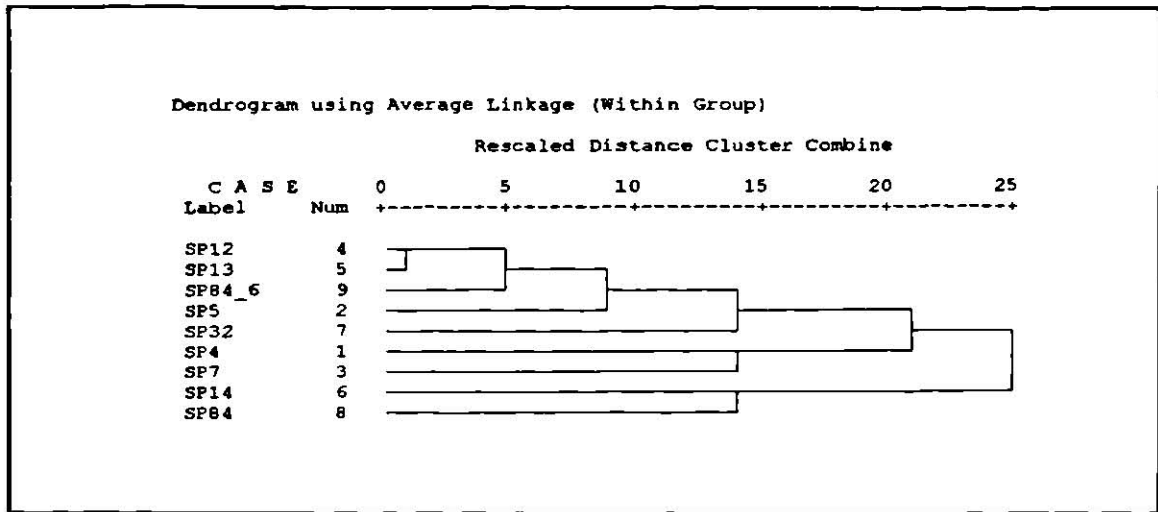
C



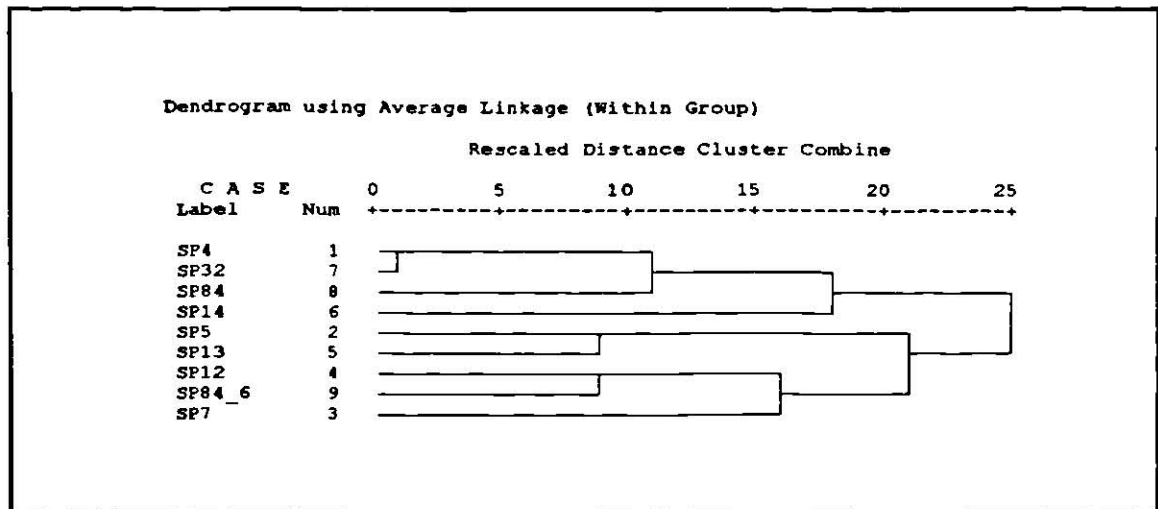
D



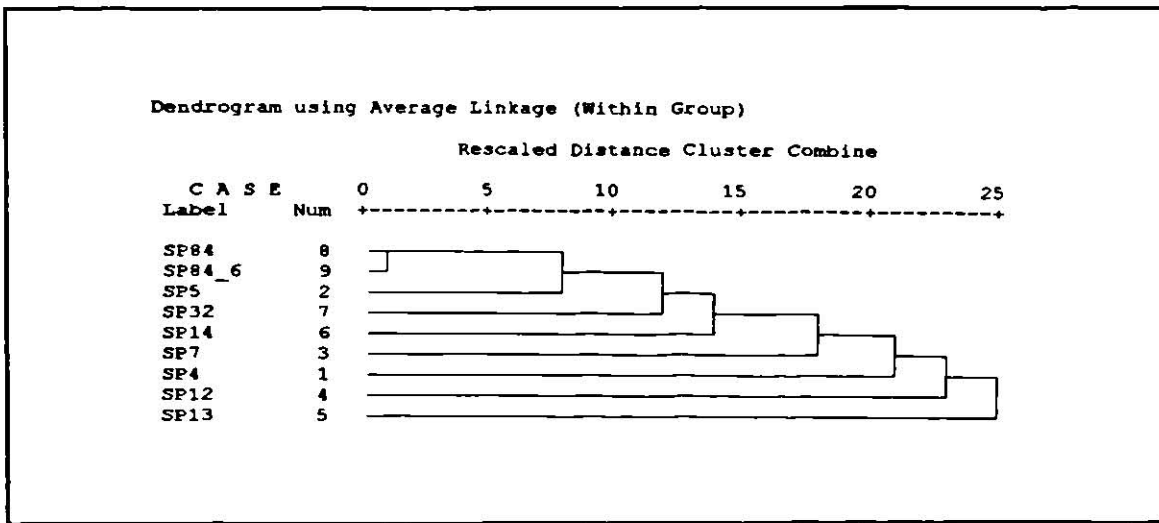
E



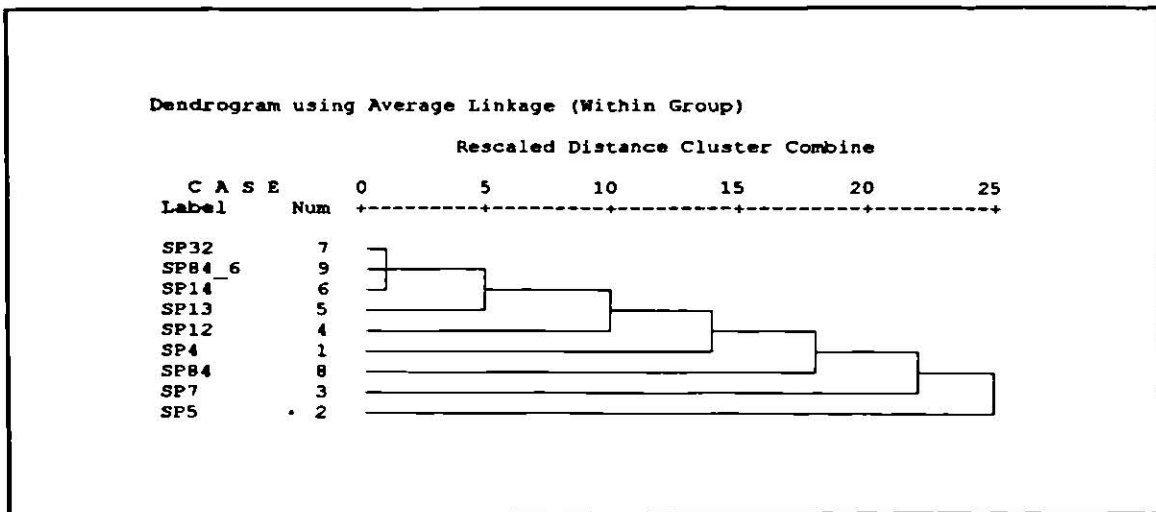
F



G



H



Dendrograma de *P.fumosoroseus* usando los iniciadores OPA-02 (panel A), OPA-03 (panel B), OPA-04 (panel C), OPA-09 (panel D), OPA-11 (panel E), OPA-13 (panel F), OPA-18 (panel G), OPA-19 (panel H). Simbología : SP 5 = SARL 76 ; SP 7 = SARL 114 ; SP 4 = SARL 115 ; SP 12 = 270/97 ; SP 13 = UAN-7 ; SP 14 = Pfr. 612 ; SP 84 = M-84 ; SP 846 = M-846 ; SP 32 = M-32.

Apéndice G

Cuantificación de DNA (Medición espectrofotométrica)

1. Colocar 1 ml de agua bidestilada en un tubo eppendorf de 1.5 ml, añadir 1 μ l de la muestra y mezclar por inversión.
2. Colocar en la celda para UV 1 ml de agua bidestilada, para calibrar a cero el espectrofotómetro.
3. Realizar lecturas de las muestras a una absorbancia de 260 y 280 nm.
4. Para determinar la concentración de DNA se realiza el siguiente cálculo :

Factor de dilución :
$$\frac{\text{Volumen total en la celda}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Concentración de DNA :

(Factor de dilución) (Factor de Conversión a $\text{ng}/\mu\text{l} = 50$) (Lectura a 260nm).

5. La concentración de DNA estará dada en $\text{ng}/\mu\text{l}$, y su calidad se determina dividiendo la lectura a 260 nm entre la lectura a 280 nm. Un DNA de buena calidad deberá dar un valor entre 1.8 y 2.0.

Apéndice H

Electroforésis horizontal en geles de agarosa

1. Disolver la agarosa 1% (P.V) o 1.5% preparada en buffer TAE 1X en una plancha térmica. Dejar enfriar a más o menos 50 °C y verter el volumen apropiado para formar una capa de 5 mm en el molde. Previamente el molde debe haberse montado según las especificaciones del fabricante. Colocar el peine para formar los pozos donde se colocan las muestras, dejando un espacio de 1 mm entre el borde inferior del peine y la base del molde. Dejar gelificar completamente la agarosa (alrededor de 20 min). Retirar el peine y lavar los pozos con buffer TAE o agua bidestilada para eliminar restos de agarosa no gelificada.
2. Colocar el gel con todo y su base en la cámara de electroforésis horizontal (Hoefer), y llenar el depósito con el volumen de buffer TAE 1X necesario para cubrir el gel con un exceso de aproximadamente 1 o 2 mm por encima del mismo.
3. Mezclar la cantidad de solución de DNA que se desee observar con 0.2 volúmenes de buffer de carga. Usar la puntilla de la micropipeta para mezclar bien.
4. Depositar el volumen de DNA deseado en cada pozo, usando una micropipeta Pipetman.
5. Colocar la tapa de la cámara y conectar los cables de los electrodos de tal forma que el negativo quede atrás de las muestras y el positivo en el extremo opuesto. Conectar los cables a la fuente de poder y dejar correr el gel a 100V hasta que el indicador azul de bromofenol (azul mas intenso) llegue a $\frac{3}{4}$ del gel (aprox. 45-60 min)
6. Apagar la fuente de poder y entonces retirar la tapa y sacar el gel con todo y su base.
7. Colocar el gel en una charola de plástico y agregar un volumen de bromuro de etidio suficiente para cubrirlo completamente. El bromuro de etidio es un potente carcinógeno, de aquí en adelante el gel debe de manejarse con guantes de látex y con las precauciones necesarias para evitar que entre en contacto directo con la piel. Dejar teñir por 5 min.
8. Devolver el bromuro de etidio a su contenedor y lavar el gel con abundante agua corriente.
9. Agregar al gel un volumen de buffer TAE 1X, para eliminar el exceso de bromuro de etidio, y abrillantar las bandas. Dejar el gel en esta solución durante cinco minutos.
10. Colocar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta para observar el DNA que aparece como bandas color anaranjado fosforescente. El DNA se desplaza más lejos del polo negativo conforme sea más pequeño o más compacto.

Electroforésis en geles de poliacrilamida

1. Preparar el molde para formar los geles de poliacrilamida según las recomendaciones del fabricante.
2. Preparar la acrilamida al 3.5%
3. Vaciar la poliacrilamida sin polimerizar al molde, colocar rápidamente el peine para formar los pozos y esperar alrededor de 20 min para que se forme el gel.
4. Enjuagar el gel con agua bidestilada para eliminar el exceso de poliacrilamida que halla quedado sin polimerizar.
5. Montar el molde con los geles en la cámara de electroforésis, previamente llenar con buffer TAE 1X.
6. Colocar 5 μ l de cada muestra en los pozos del gel.
7. Agregar buffer TAE 1X en el depósito superior de la cámara y conectar los cables alimentadores de corriente.
8. Correr la electroforésis a 50V hasta que el colorante de referencia llegue al borde inferior del gel (alrededor de 2 h).
9. Sacar el gel del molde y colocarlo en una charola de plástico y agregar un volumen de bromuro de etidio suficiente para cubrirlo completamente. El bromuro de etidio es un potente carcinógeno, de aquí en adelante el gel debe de manejarse con guantes de látex y con las precauciones necesarias para evitar que entre en contacto directo con la piel. Dejar teñir por 5 min.
10. Devolver el bromuro de etidio a su contenedor y lavar el gel con abundante agua corriente.
11. Agregar al gel un volumen de buffer TAE 1X, para eliminar el exceso de bromuro de etidio, y abrillantar las bandas. Dejar el gel en esta solución durante cinco minutos.
12. Colocar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta para observar el DNA que aparece como bandas color anaranjado fosforescente. El DNA se desplaza más lejos del polo negativo conforme sea más pequeño o más compacto.

Apéndice I

Medios de cultivo y soluciones

I.1. Medios de cultivo

Nota : Todos los medios de cultivo se esterilizan en autoclave a 15 lb/pulg² durante 20 min.

Caldo YPD

Extracto de Levadura	3.0 g/l
Peptona de Caseína	10.0 g/l
Dextrosa	20.0 g/l

Agar YPD

Extracto de Levadura	3.0 g/l
Peptona de Caseína	10.0 g/l
Dextrosa	20.0 g/l
Agar-agar	20.0 g/l

I. 2. Soluciones

Nota : Todas las soluciones se preparan con agua bidestilada en los volúmenes indicados. Los buffers Tris se ajustan a pH 8.0 y se filtran en membranas millipore de 0.45 μm al igual que las soluciones marcadas con asterisco.

Buffer TAE 10X

Tris-base	48.4 g/l
Acido Acético Glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 ml

Buffer de Carga

Azul de Bromofenol	0.25%
Xilencianol	0.25%
Glicerol	30%

Persulfato de Amonio al 10%

Persulfato de Amonio	10 g
Agua bidestilada cbp	100 ml

Etanol al 70%

Etanol Absoluto	70 ml
Agua bidestilada	30 ml

Agarosa al 1%

Agarosa	1 g
Buffer TAE 1X cbp	100 ml

Agarosa al 1.5%

Agarosa	1.5 g
Buffer TAE 1X cbp	100 ml

Acrilamida-Bisacrilamida 30%*

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Agua bidestilada	100 ml

Buffer TE (pH 8.0)

Tris base	10mM
EDTA	1mM

Buffer de extracción

Tris-HCl (pH 8.5)	200mM
NaCl	250mM
EDTA	25mM
SDS	0.5 %

Acetato de Sodio 3M (pH 5.2)

Acetato de Sodio	408.24 g/l
------------------	------------

Literatura Consultada

- Alves, S.B. y R.M. Pereira.** 1989. Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill in plastic trays. *Ecosistema*. **14**:188-192.
- Arnheim, N., T. White y W.E. Rainey.** 1990. Application of PCR : Organismal and population Biology. *BioScience* **40**:174-182
- Bidochka, M.J., M.A. McDonald, R.J. St.Leger y R.W. Donald.** 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) *Curr. Genet.* **25**:107-113.
- Black, W.C.** 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol.* **2**:1-6.
- Boucias, D.G. y J.C. Pendlan.** 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycosis in arthropod host. En "*The fungal spore and disease initiation in plants and animals*" G.T. Cole y H.C. Hoch (Ed). Editorial Plenum. N.Y. pp. 101-128.
- Boucias, D.G., C.M. McCoy y O.J. Joclyn.** 1982. Differentiation isoenzymatic between 17 geographic isolates of *Hirsutella thompsonii*. *J. Invertebr. Pathol.* **39**: 329-337.
- Brey, P.T., J.P. Latgé y M.C. Prevost.** 1986. Intergumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* by *Condiobolus obscurus*. *J. Invertebr. Pathol.* **48**: 34-41.
- Cenis J.L.** 1992 Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucl. Acid Res.* **20**: 2380
- Charnley, A.K.** 1990. Secondary metabolites, toxins and entomopathogenic fungi: and evolutionary perspective. *Proceedings and Abstracts of 5th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control.* Adelaide, Australia. pp. 303-307.
- Charnley, A.K. y R.J. St. Leger.** 1991. The rol of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. En "*The fungal spore and disease initiation in plants and animals*" G.T. Cole y H.C. Hoch (Ed). Editorial Plenum. N.Y. pp. 267-286.
- Chen, C.J., J.W. Wu, Z.Z. Li, Z.X. Wang, Y.W. Li, S.H.Chang, F.M. Yin, X.P. Wang, L.Y.Day, L. Tao, Y.A. Zhang, J. Tang, S. Ding, G.G. Ding, Z.H. Gao y Y.C. Tan.** 1990. Application of microbial pesticides in IPM, En "*Integral Management of Pine Caterpillars in China*" (Chen, C.J. Ed.) China Forestry Publishing House, Beijing. Rep. Popular China. p.p. 214-308.
- Domnas, A.J. y S.A. Warner.** 1991. Biochemical activities of entomophagous fungi. *C.R.Microbiol.* **18**:1-13.

- Eyal J., MD A.Mabud, K.L.Fischbein, J.F.Walter, L.S.Osborne y Z. Landa.** 1994. Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 strain, which produces a red pigment for microbial control. *App. Biochem. Biotechnol.* **44**: 65-80.
- Fargues J., T. Duriez, R. Popeye, P.H. Robert y J. Biguet** 1981. Immunological characterization of the entomopathogenic hyphomycetes *Beauveria* and *Metarhizium*. *Mycopathology* **75**:101-108
- Fegan M., J.M. Manners, D.J. Maclean, J.A.G. Irwin, K.D.Z. Samuels, D.G. Holdom y Li D.P.** 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2075-2081
- Feng, M.G., T.J. Poprawski y Khachatourians.** 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci. Technol.* **4**:3-34.
- Furman, B.J., D. Grattapaglia, W.S. Dvorak y D.M. O'Malley.** 1997. Analysis of genetic relationship of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Mol. Ecol.* **6**:321-331
- Gabriel, C.J. y R.J. Cook.** 1990. Biological control-the need for a new scientific framework. *BioScience* **40**:204-206.
- Garza González, E., P.A. Berlanga y V. M. Hernández** 1994 Guía técnica. producción de hongos entomopatógenos. SARH (Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos), Tecoman, Col., México.
- Gillespie, A.T. y N. Claydon.** 1989. The use of entomopathogenous fungi for pest control and the rol of toxins in pathogenesis. *Pest. Sci.* **27**:203-215.
- Glare, T.R., A. Jackson y E. A. Cisternas.** 1993 *B. vermiconia* is an entomopathogenic fungus *Mycol. Res.* **97**: 336-338.
- Goettel, M.S.** 1984. A simple method for mass culturing entomopathogenic Hyphomycete fungi. *J. Microbial Meth.* **3**: 15-20.
- Goettel, M.S., R.J. StLeger, N.W. Rizzo, R.C. Staples y D.W. Roberts.** 1989. Ultraestructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2233-2239.
- Hadrys, H., M. Balick y B. Schierwater.** 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**: 55-63

- Haig, S.M., R. Bowman, y T.D. Mullins.** 1996. Population structure of red cockaded woodpeckers in south Florida : RAPDs revisited. *Mol. Ecol.* **5**:725-734
- Hajek, A.E., T.M. Butt, L.I. Strelow y S.M. Gray.** 1991. Detection of *Entomophagaimaiga* (Zygomycetes:Entomophthorales) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Invertebr. Pathol.* **58**:1-9.
- Hajek, A.E., R.A. Humber, J.S. Elkinton, B. May, S.R. Walsh y J.C. Silver.** 1990. Allozyme and RFLP analyses confirm *Entomophaga maimaiga* responsible for 1989 epizootics in North American gypsy moth populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:6979-6982.
- Hajek, A.E., R.A.Humber, S.R. Walsh y J.C. Silver.** 1991. Sympatric occurrence of two *Entomophaga aulicae* (Zygomycetes: Entomophthorales) complex species attacking forest Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* **58**:373-380.
- Hajek, A.E. y R.J. St.leger.** 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* **39**: 293-322.
- Hegedus, D., M. J. Bidochka, G. S. Miranpuri y G. G. Kachaturians.** 1992. A comparison of the virulence, stability and cell - wall - surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:785-789
- Hegedus, D. y G. G. Kachaturians.** 1993. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolyocladium*, and *Metarhizium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4283-4288
- Hegedus, D., y G. G. Kachaturians.** 1996. Identification and Differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Invertebr. Pathol.* **67**:289-299
- Hilton, A.C., J.G. Banks y C.W. Penn.** 1997. Optimization of RAPD for fingerprinting Salmonella. *Letters Appl. Microbiol.* **24** : 243-248
- Hughes, R.D. y M.A. Bryce.** 1984. Biological characterization of two biotypes of pea aphid of susceptible and other resistant to fungal pathogens coexisting on Lucerne in Australia. *Entomol. Exp. Appl.* **36**: 225-229.
- Jackson, M., M.R. McGuire, L.A. Lacey y S.P. Wraight.** 1996. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 000 95-326

- Johansson, M.L., M. Quednau., G. Molin y S. Ahrné.** 1995. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Letter Appl. Microbiol.* **21**: 155-159
- Khachatirians, G.G.** 1986. Production and use of biological pest control agents. TIBTECH May. 120-124.
- Kimberling, D.N., A.R. Ferreira, S.M. Shuster y P. Keim.** 1996. RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog populations in the south-western USA. *Mol. Ecol.* **5**: 521-529
- Latgé, J-P. y R. Moletta.** 1988. Biotechnology. En "*Atlas of entomopathogenic fungi*". pp152-164. Springer-Verlag. NY.
- Lin, Athena W., M.A. Usera, T.J. Barrett y R. A. Goldsby.** 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 870-876.
- Mes, J.J., D.J. Van, E.J.A. Roebroek y P.M. Boonekamp.** 1994. Detection and identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* by RFLP and RAPD analysis. En "*Modern assays for plant pathogenic fungi: Identification, detection and quantification*". Schots A., Dewey F.M., Oliver R. (Ed) pp. 37-45
- Meyer, W., R. Morawetz, T. Borner y C.P. Kubicek.** 1992. The use of DNA fingerprint analysis in the classification of some species of the *Trichoderma aggregate*. *Curr. Gen.* **21**: 27-30
- Muthumeenakshi, S., P.R. Mills, A.E. Brown y D.A. Seaby.** 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* **140**: 7669-777
- Osborne, L., G. K. Storey, C. W. Mc Coy y J. F. Walter.** 1994. Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. University of Florida, Central Florida Research and Education Center, Apopka, Florida.
- Paccola-Meirelles, L.D. y J.L. Acevedo.** 1991. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **52**:172-176
- Permaul, K., D. Pillay y B. Pillay.** 1996. Random-amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis shows intraspecies differences among *Xanthomonas albilineans* strains. *Letters Appl. Microbiol.* **23**: 307-311
- Péros, J.P., G. Berger y F. Lahogue.** 1997. Variation in pathogenicity and genetic structure in the *Eutypa lata* population of a single vineyard. *Phytopathology* **87**: 799-806

- Pfeifer, T. y G. G. Khachatourians.** 1989. Isolation and characterization of DNA from the Entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Exp. Mycol.* **13**: 392-402
- Pfeifer, T. y G.G. Khachatourians.** 1993. Isolation of DNA from entomopathogenic fungi grown in liquid cultures. *J. Invertebr. Pathol.* **61**:113-116
- Power, E.G.M.** 1996. RAPD typing in microbiology- a technical review. *J. Hospital Infection.* **34** : 247-265.
- Rakotonirainy, M.S., M. Dutertre, Y. Brygou y G. Riba.** 1991. rRNA sequence comparison of *Beauveria bassiana*, *Tolypocladium cylindrosporum* and *Tolypocladium extinguens*. *J. Invertebr. Pathol.* **57**:17-22.
- Rawlins, S.C.** 1989. Biological control of insect pests affecting man and animals in the tropics. *CRC Critical Rev. Microbiol.* **16**:235-251.
- Ruma, P., S.C. Chen., T.C. Sorrell y A.G. Brownlee.** 1996. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. *Lett. Appl. Microbiol.* **23** : 312-316.
- Samsinakova, A. y S. Kalalova.** 1981. Mass Production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* Populations. *J. Invertebr. Pathol.* **38**:169-174
- Samsinakova, A. y S. Kalalova.** 1983. The influence of a single-spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**:156-161
- Samson, R.A., H.C. Evans y J-P. Latgé.** 1988a. Taxonomy of entomopathogenic fungi. En "*Atlas of entomopathogenic fungi*". pp 5-16. Springer-Verlag. NY.
- Samson, R.A., H.C. Evans y J-P. Latgé.** 1988b. Biological control: past, present and future. En "*Atlas of entomopathogenic fungi*". pp 165-172. Springer-Verlag.
- Samuel, R.I., A.K. Charnley y S.E. Reynolds.** 1988. The rol of destruxins in the pathogenesis of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathology.* **104**:51-58.
- Schafer, C. y J. Wostemeyer.** 1994. Molecular diagnosis of the rapeseed pathogen *Leptosphaeria maculans* Based on RAPD-PCR. En "*Modern assays for plant pathogenic fungi: Identification, detection and quantification*". Schots A., Dewey F.M. y Oliver R. (Ed). pp. 1-7
- Schilling, A.G., E.M. Moller, y H.H. Geiger.** 1994. RAPDs of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*: Application for genotyping and species identification. En: "*Modern assays*

for plant pathogenic fungi: Identification, detection and quantification". Schots A., Dewey F.M y Oliver R. (ed). pp. 47-55

- Shimizu, S., Y. Arai y T. Matsumoto.** 1992. Electrophoretic karyotype of *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. **60**:185-187
- Sicard, D., Y. Michalakis, M. Dron y C. Neema.** 1997. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology. **87**: 807-813
- Smith, R.J., y E.A. Grula.** 1981. Nutritional requirements for conidia germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. **37**:222-230
- Smith, R.J. y E.A. Grula.** 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. **42**:319-326
- Soper, R.S. y M.G. Ward.** 1981. Production, formulation and application of fungi for insect control. En: "*Biological Control in Crop Production*". Symposium No. 5. Papavizas, G.C. (Ed.). Allan held, Osmum, Totowa, p.p. 161-180.
- Soper, R.S., B. May y B. Martinell.** 1983. *Entomophaga grylli* enzyme polymorphism as a technic for pathotype identification. Environ. Entomol. **12**:720-723
- Sorrell, T.C., S.C. Chen, P. Ruma, W. Meyer, T.J. Pfeiffer, D.H. Ellis y A .G. Brownlee.** 1996. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J. Clin. Microbiol. **34**: 1253-1260.
- Stephen, W.P. y B.L. Fichter.** 1990. Chalkbrood (*Ascosphaera aggregata*) resistance in the leaf cutting (*Megachile rotundata*). II Random matting of resistant lines to wild type. Apidologie **21**: 221-231
- Storey, G.K. y C. W. Mc Coy.** 1992. Potential for biological control of soil insects using microbial pesticides in the Caribbean. Florida Entomologist. **75**:356-360
- StLeger, R.J., T.M. Butt, R.C. Staples y D.W. Roberts.** 1989. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Exp. Mycol. **13**: 253-257
- St.Leger, R.J.** 1991. Intergument as a barrier to microbial infections. En: "*The physiology of insect epidermis*". A. Retnakaran y K. Binnington (Ed). Editorial. CSIRO. Adelaida. Australia. pp. 286-308.

- StLeger, R.J., T.M. Butt, M.C. Goettel, R.C. Staples y D.W. Roberts.** 1989. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.* **13**: 274
- St.Leger, R.J., D.C. Frank, D.W. Roberts y R.C. Staples.** 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle degrading protease structural gene for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.* **204**: 991-1001.
- St.Leger, R.J., M. Goettel, D.W. Roberts y R.C. Staples.** 1991. Pre-penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **58**: 168-179.
- St.Leger, R.J., B. May, L.L. Allee, D.C. Frank, y D.W. Roberts.** 1992. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 89-101
- Tan Yingchun, K.M. y A. Ekramoddoullah.** 1991. Immunochemical characterization of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **57**:269-276.
- Thomas, K.C., G.G. Kachaturians y W.M. Ingledew.** 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **33**:12-20
- Tigano-Milani, Myrian S., R.J. Honeycutt, L.A. Lacey, R. Assis, M. McClelland y W.S. Sobral.** 1995. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *J. Invertebr. Pathol.* **65**: 274-282
- Tigano-Milani, M.S., R.A. Samson, I. Martins y W.S. Sobral.** 1995. DNA markers for differentiating Isolates of *P. lilacinus*. *Microbiology* **141**: 239-245
- Tigano-Milani, M.S., A.C. M.M.Gomes y W.S. Sobral.** 1995. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **65**: 206-210
- Van Reenen, C.A. y T.D. Leon.** 1996. Evaluation of numerical analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *Current. Microbiol.* **32**:183-187
- Vey, A. y J.M. Quiot.** 1989. Effect cytotoxique *in vitro* et chez l'insecte hôte des destruxines, toxines cyclodipeptidiques produites par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* **35**: 1000-1008.
- Walsh, R.A., D. Tyrrell, R.A. Humber y J.C. Silver.** 1990. DNA restriction fragment length polymorphism in the rDNA repeat unit of *Entomophaga*. *Exp. Mycol.* **14**:381-392
- Whitten, M.J. y J.G. Oakeshott.** 1990. Agricultural biotechnology. Opportunities for international development. C.A.B. International Cap. 8

- Wilding, N.** 1990. Entomophthorales in pest control-recent developments. Proceedings and Abstracts of 5th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide, Australia. pp. 138-141.
- Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski y S.V. Tingey.** 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Meth. Enzymol. **218**:704-741.
- Zacharuk, R.Y.** 1981. Fungal diseases of terrestrial insects. En: "*Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*". E.W. Davidson (Ed). Editorial. Allanheld Osmun. New Jersey. pp. 367-402

