

00377
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Caracterización genotípica de
Paecilomyces fumosoroseus (Wize)
Brown & Smith aislado en México y
análisis de su virulencia *in vitro* en la
mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

GINA MARIA CAVALLAZZI VARGAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CONCEPCION TORIELLO NAJERA

MEXICO D. F.



COORDINACIÓN

MAYO, 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de marzo de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Cavalazzi Vargas Gina María con número de cuenta 500470853, y número de expediente 0 con la tesis titulada: "**Caracterización genotípica de Paecilomyces fumosoroseus (Wize) Brown & Smith aislado en México y análisis de su virulencia in vitro en la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae)**", bajo la dirección de la **Dra. Concepción Toriello Nájera**.

Presidente:	Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
Vocal:	Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa
Secretario:	Dra. Concepción Toriello Nájera
Suplente:	Dr. Joaquín Cifuentes Blanco
Suplente:	Dra. María del Rocío Reyes Montes

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de abril de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora de Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Micología Básica y de Micología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, y con el apoyo de CONACYT.

Directora:

Dra. Concepción Toriello Nájera

Coasesora:

Dra. María del Rocío Reyes Montes

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo económico brindado a través de la beca que recibí por parte del CONACYT por medio del proyecto de investigación G31451B.

Agradezco al M. C. Víctor Hernández y a la Bióloga Angélica Berlanga del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico-SAGARPA, Tecomán (Colima) por brindar los aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* utilizados para este estudio.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutorial por su valioso apoyo académico:

Dra. Concepción Toriello Nájera

Dr. Miguel Ulloa

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Agradezco a la Dra. María del Rocío Reyes Montes, Dra. Teresa Mier, Dr. Gerardo Zúñiga, Dr. Eduardo Aranda, Biól. Hortensia Navarro, Biól. Flor Rivera y a la Q.F.B. Amelia Pérez, quienes participaron de una manera activa en el desarrollo del proyecto.

Nuestro trabajo es fruto de la unión de la confianza, el sacrificio y el apoyo pero sobretodo del amor que recibimos cada día. Solo en la medida que permitamos entrar al amor en nuestras vidas veremos reflejados en nosotros el futuro.

INDICE

1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
3. ANTECEDENTES	16
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
6. HIPÓTESIS	22
7. OBJETIVOS	23
7.1 General	23
7.2 Específicos	23
8. MATERIAL Y MÉTODOS	24
8.1 Material fúngico	24
8.2 Obtención de cultivos monospóricos	26
8.3 Selección de cultivos monospóricos	26
8.3.1 Pruebas de Crecimiento	26
8.3.2 Pruebas de tamaño de conidios y esporulación	27
8.3.3 Análisis estadístico	27
8.3.4 Conservación de cultivos monospóricos seleccionados	28
8.4 Caracterización genotípica de los aislados de <i>P. fumosoroseus</i>	28
8.4.1 Extracción de DNA	28
8.4.2 Estandarización del método del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios	29
8.4.2.1 Programa de amplificación	30
8.4.2.2 Concentración óptima de los iniciadores	31
8.4.2.3 Curva de MgCl ₂	31
8.4.2.4 Electroforesis	31
8.4.3 Análisis de datos del RAPD-PCR	31

9. RESULTADOS	34
9.1 Características fenotípicas de los aislados estudiados y de sus cultivos monospóricos	35
9.1.1 Tamaño de los conidios	35
9.1.2 Prueba de crecimiento	36
9.1.3 Prueba de esporulación	37
9.1.4 Selección del cultivo monospórico	37
9.2 Caracterización genotípica de los aislados estudiados y de sus cultivos monospóricos	38
9.2.1 Obtención de DNA	38
9.2.2 Estandarización del método RAPD	39
9.2.2.2 Concentración de los iniciadores	39
9.2.2.3 Concentración de MgCl ₂	40
9.2.3 Condiciones óptimas para el RAPD-PCR	41
9.2.4 RAPD-PCR	41
10. DISCUSIÓN	48
11. CONCLUSIONES	53
12. REFERENCIAS	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Claves hospedero, cultivo, origen geográfico de los aislados y cepas de referencia de <i>P. fumosoroseus</i> en estudio	25
Tabla 2. Iniciadores utilizados en el estudio	30
Tabla 3. Programas de amplificación.	30
Tabla 4. Número, y promedios del largo y ancho de conidios, velocidad de crecimiento, esporulación y selección de los cultivos monospóricos obtenidos de los aislados de <i>P. fumosoroseus</i> estudiados y sus cultivos originales	35
Tabla 5. Selección del cultivo monospórico de acuerdo a la velocidad de crecimiento y esporulación del aislado original EH-506 y de los cultivos monospóricos del aislado	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonia del cultivo monospóric EH-509 de <i>P. fumosoroseus</i>	34
Figura 2. Gráfica de crecimiento del aislado EH-516 y de los ocho cultivos monospóricos obtenidos	36
Figura 3. Concentración de DNA en gel de agarosa al 0.8% de 16 muestras de <i>P. fumosoroseus</i>	39
Figura 4. Curva de MgCl ₂	40
Figura 5. Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR de DNA de los aislados de México originales (izquierda) y monospóricos seleccionados (derecha) de <i>P. fumosoroseus</i> generados con el iniciador OPF5	42
Figura 6. Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR de 5 ng de DNA de los aislados de México y cepas de referencia de <i>P. fumosoroseus</i> con el iniciador OPB7	43
Figura 7. Fenograma que muestra los grupos obtenidos por RAPD-PCR con los diecisiete iniciadores para los 19 aislados	45
Figura 8. Ordenamiento de los aislados procedentes de México y otros países según el análisis de coordinados principales	46
Figura 9. Ordenamiento de los aislados estudiados según el árbol de tendido mínimo	47

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de la selección de cultivos monospóricos	61
Anexo 2. Matriz de presencia/ausencia en todos los aislados y cepas de referencia de <i>P. fumosoroseus</i>	67

1. RESUMEN

Paecilomyces fumosoroseus es un hongo entomopatógeno relevante como biocontrolador de importantes plagas agrícolas como la mosquita blanca (Homoptera:Aleyrodidae). Para este estudio se utilizaron 14 aislados de *P. fumosoroseus* de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) provenientes de los estados de Yucatán, Campeche, Colima, Sinaloa y Nayarit en México, de la colección del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico de Tecomán, Colima, y 5 cepas de referencia de *P. fumosoroseus* de la colección ARSEF-USDA y CENARGEN/Colección EMBRAPA, representantes de los tres grupos fenéticos encontrados por Tigano-Milani *et al.* (1995) provenientes de Brasil, EEUU, Francia y Japón. Los aislados procedentes de México y cepas de referencia se analizaron genotípicamente por medio de RAPD-PCR utilizando 17 iniciadores del Kit Operon. Los productos de amplificación de los diferentes aislados se compararon entre ellos y para su análisis se construyó una matriz de presencia/ausencia de bandas específicas. A través de estos datos se construyó una matriz de similitud genética pareada basada en el coeficiente de Jaccard. La matriz de similitud fue la base para clasificar los aislados mediante el método de promedios aritméticos no ponderados UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average), así como para ordenar los aislados por medio de un diagrama multidimensional usando el análisis de coordinados principales (ACP). Para corroborar si el resultado del fenograma corresponde a la matriz de similitud original y no es producto del azar, se calculó el coeficiente cofenético de correlación (CCC), el cual arrojó un resultado altamente significativo de 0.97. Los análisis anteriores fueron llevados a cabo utilizando el programa NTSYS-PC versión 2.0. Utilizando la prueba de Strauss se calculó el mejor punto de corte del árbol (0.70), el cual originó cinco grupos fenéticos: el grupo I incluye los 14 aislados de México los cuales se relacionan entre sí en un 70% de similitud, el grupo II está formado por las cepas de Brasil (ARSEF 3480 y ARSEF 2956), el grupo III por la cepa de Estados Unidos (ARSEF 3076), el grupo IV por la cepa de Francia (ARSEF 1645) y el grupo V por la cepa de Japón (ARSEF 1645). El método de ordenación nos permitió un análisis tridimensional de todos los aislados donde se corrobora la clasificación del fenograma y se muestra un mayor agrupamiento entre los aislados del continente americano que los de Francia y Japón. El método de RAPD-PCR permitió agrupar con una alta similitud a los aislados de México con los iniciadores utilizados, mientras que las cepas de referencia mostraron patrones polimórficos diferentes con los mismos iniciadores. Sin embargo, se presentan algunas diferencias en los patrones polimórficos entre los aislados procedentes de México, lo que demuestra una variabilidad significativa entre los aislados. Estos resultados nos permiten sugerir que las cepas de México no se integraron a ninguno de los grupos fenéticos sugeridos por Tigano-Milani *et al.* (1995), constituyendo un grupo diferente. La característica fenotípica de la virulencia evaluada por medio de la Concentración Letal Media (CL50) de la especie de la mosquita blanca, *Trialeurodes vaporariorum*, realizada por Castellanos (2001), de los aislados de *P. fumosoroseus* de México estudiados, no presentaron ninguna relación aparente con los patrones polimórficos de DNA encontrados en los mismos aislados estudiados.

2. INTRODUCCIÓN

El control biológico es considerado desde el punto de vista ecológico como una estrategia del control natural, definido como la acción de parásitos, predadores o patógenos en el mantenimiento de la densidad de población de otro organismo en un promedio más bajo al que pudiera presentarse en la ausencia del control (DeBach *et al.*, 1971). El potencial de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico fue pronosticado por Pasteur hace más de dos siglos, debido a que éstos habían sido observados como biorreguladores de poblaciones naturales (Goettel & Inglis, 1997).

Dentro de los hongos más utilizados como agentes biocontroladores de plagas agrícolas en todo el mundo se encuentran las especies *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas (Clarkson & Charnley, 1996).

El hongo *P. fumosoroseus* presenta colonias de crecimiento lento, logrando 4 cm de diámetro en 14 días a 25°C en agar extracto de malta (AEM), formando pequeñas acumulaciones en forma de masa, de color blanco crema a rosa grisáceo. Algunas veces produce grupos compactos de conidióforos erectos reunidos en fiálides ensanchadas en la base; sus conidios son de cilíndricos a fusiformes, 3-4 X 1-2 μm . El dipéptido beauvericina es también producido por esta especie (Domsch *et al.*, 1980). Es un hongo mitospórico, que presenta un ciclo parasexual en condiciones de laboratorio (Riba & Ravelojoana, 1984). El estudio de la especie *P. fumosoroseus* se inició formalmente como micoinsecticida por Osborne y Landa (1992), los cuales aislaron una cepa parasitando la mosquita blanca (Homoptera: Aleroydidae) en un campo de Florida. A partir de ese momento se inician los estudios sobre su biología y patogenicidad hacia diversas especies de insectos.

Este homóptero es una plaga que ataca cultivos agrícolas de gran importancia económica como hortalizas, frutales y plantas ornamentales. Se

encuentra distribuido en las zonas tropicales y subtropicales en un rango de 0 a 1500 msnm (Ortega, 1991). Entre los géneros de mayor importancia se encuentran: *Bemisia*, *Trialeurodes*, *Aleuracanthus*, *Aleurothrixus*, *Dialeurodes*. Las especies de *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* y *Dialeurodes citrifolii* han sido reconocidas como transmisores de virus fitopatógenos (Ramírez, 1996). Entre los diferentes géneros y especies de la mosquita blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) es una de las especies mejor estudiadas, existiendo abundante información sobre su biología y ecología en las revisiones de Cock (1986), Gerling *et al.* (1986), Gerling (1990) y Beyrne & Bellows (1991)

Una de las características de este grupo de microorganismos que los capacita como bioinsecticidas eficientes es su mecanismo de infección a través de la adhesión de los conidios a la superficie del insecto. La penetración del hongo a través de la cutícula del insecto, compuesta sobre todo de fibrillas de quitina entre una matriz de proteínas, es esencial para la infección. En esta etapa se combinan una presión mecánica, formación de estructuras de adhesión (apresorio) y degradación enzimática. Las enzimas extracelulares degradan los principales componentes de la cutícula. La naturaleza refractaria de la cutícula del insecto sugiere que la penetración posiblemente requiere una acción sinérgica de varias enzimas diferentes. Dentro de las primeras enzimas producidas se encuentran las endoproteasas y aminopeptidasas. La principal enzima producida inicialmente es una serina proteasa denominada Pr1, encontrada en diversos hongos entomopatógenos (St. Leger, 1993) que actualmente ya ha sido clonada y secuenciada (St. Leger *et al.*, 1996). Estudios posteriores mostraron la presencia de otras proteasas parecidas a una subtilisina, como la Pr1A (St. Leger *et al.*, 1992) y Pr1B (Joshi *et al.*, 1997). La germinación del conidio inhibe la producción de Pr1 y la presencia de microfibrillas de quitina son degradadas por las quitinasas, sin embargo, su contribución durante la penetración es complicada debido a la multiplicidad de isoenzimas extracelulares involucradas. Una vez llega el hongo al hemocele, el micelio se ramifica y forma blastosporas. La muerte del insecto ocurre como resultado de la combinación de diferentes factores, entre ellos, diversas toxinas fúngicas que son depsipéptidos cíclicos (destruxinas y

beauvericinas) con diferentes efectos como la parálisis del insecto. El crecimiento de las hifas produce la obstrucción física de la circulación de la hemolinfa, pérdida de nutrientes y la invasión de órganos. Después de la muerte, las hifas usualmente emergen del cadáver, y cuando existen las condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa en el ambiente, produce conidios en el exterior del hospedero (Charnley & St. Leger, 1991; Inglis *et al.*, 1997). Estos conidios externos pueden a su vez infectar a otros insectos (epizootias, transmisión horizontal).

En México, se consideran aproximadamente 700,000 ha de cultivos en riesgo. Las pérdidas por infecciones virales (geminivirus) transmitidas por este insecto han llegado al 100% en chile, tomate y melón. Entre las enfermedades más conocidas se encuentran: el chino del tomate, amarillamiento de la venación del pepino, enchinamiento de la hoja de la calabaza, mosaico común del frijol y achaparramiento de la papa (Yañez, 1990; Ramírez, 1996). Además, el daño directo se ha considerado importante sobre todo en tomate donde se han detectado poblaciones altas de ninfas que ocasionan desarrollo inadecuado de la planta y problemas secundarios como la excreción de mielecilla que produce el desarrollo de la fumagina (Ramírez, 1996). Debido a la importancia de este insecto se han llevado a cabo múltiples tratamientos, especialmente químicos, para el control de sus poblaciones.

Una de las características principales de las poblaciones de insectos es el gran número de generaciones en un periodo corto de tiempo, lo que les permite adquirir una resistencia elevada a los controles químicos, produciendo un aumento en la aplicación de dichos productos, con una menor eficiencia (Bellows & Fisher, 1999).

El estudio de los hongos entomopatógenos útiles para el control biológico de plagas agrícolas, plantea la perspectiva de limitar el uso de los plaguicidas químicos, favoreciendo de esta manera el mantenimiento de la salud humana, el equilibrio de los ecosistemas terrestres y la conservación de los recursos naturales renovables mediante el manejo integrado de plagas (Butt *et al.*, 2001).

Los programas de erradicación de insectos en el campo agrícola utilizando principalmente pesticidas químicos, constituyen un mercado global de aproximadamente \$6 billones de dólares, dentro del cual solamente una mínima fracción está compuesto por el uso de productos biológicos (Moore & Prior, 1993). Para que esta fracción del mercado aumente se requieren de amplias investigaciones concernientes a la biología de los agentes potenciales de control biológico, para impulsar su utilización en programas de manejo integrado de plagas.

3. ANTECEDENTES

La mosquita blanca ha llegado a constituir un serio problema para el desarrollo de la agricultura en el mundo. En el caso del algodón y para la temporada algodonera 1993/94, el ataque de esta plaga fue tan severo que los seis principales países productores del mundo (Estados Unidos de América, China continental, Pakistán, India, Uzbekistán y Turquía), disminuyeron sensiblemente sus producciones, y dos de ellos, Pakistán y la India, suspendieron temporalmente las exportaciones de fibra de algodón, por la reducción de las cosechas debido al efecto del virus que transmite la mosquita blanca (Spillari, 1994).

Esta plaga ha sido detectada en los países centroamericanos, en las islas del Caribe, en México, Colombia, Brasil y en África (Ortiz *et al.*, 1995). Otro cultivo que tiene considerables pérdidas a partir de virus transmitidos por la mosquita blanca es el tomate, *Lycopersicum esculentum*. En 1991/1992 Estados Unidos sufrió pérdidas de alrededor de 14 millones de dólares por esta plaga (Salguero, 1994).

Lacey *et al.* (1993) identificaron epizootias extensas en la mosquita blanca, *B. tabaci*, por este hongo en India y Asia Central. Altre *et al.* (1998) observaron la infectividad de *P. fumosoroseus* sobre larvas de *Plutella xylostella* (Polilla nocturna), plaga de col, brócoli y otras crucíferas en Estados Unidos de América.

A principios de 1986 se detectó un brote de la plaga en el interior de México; en 1988 se introdujo en el sureste del desierto de California y al oeste de Arizona; y en el verano de 1991, nubes de mosquitas blancas devastaron la agricultura de la región, invadiendo además del valle de Mexicali, San Luis Río Colorado, Sonora y Sinaloa, en México. Actualmente, se ha extendido hasta Nuevo México, Mississippi y Georgia, además de Texas e invernaderos en Canadá (Romero, 1995).

En México, se han llevado a cabo algunos trabajos de control biológico de mosquita blanca utilizando a *P. fumosoroseus*. Ortiz *et al.*, (1995) determinaron los requerimientos térmicos para el desarrollo de *P. fumosoroseus* en mosquita

blanca recomendando realizar la aplicación del hongo durante la presencia de los cuatro primeros instares ninfales. Ruiz *et al.*, (1995) llevaron a cabo bioensayos con *P. fumosoroseus* a distintas humedades relativas mostrando que las ninfas de la mosquita blanca pueden ser controladas con el hongo presentando diferentes valores de virulencia según la concentración del hongo y la humedad relativa del ambiente. Pineda-Guillermo & Alatorre-Rosas (1995) estudiaron el potencial de este hongo sobre la mosquita basados en los valores de mortalidad sobre el insecto, sugiriendo a *P. fumosoroseus* como una opción viable. García & Gutiérrez (1998) midieron la capacidad de control de *P. fumosoroseus* contra la mosquita blanca en condiciones de campo, en diferentes cultivos de chile jalapeño en Quintana Roo, demostrando una eficiencia indiscutible del micoinsecticida dentro de un plan de manejo integral para el control del insecto. Ortiz & Alatorre (1998) realizaron bioensayos *in vitro* acerca de la efectividad biológica de diferentes hongos entomopatógenos contra la mosquita blanca observando valores de efectividad similares entre *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus* y *P. javanicus* sobre ninfas de cuarto instar. El primero de estos hongos fue probado también en un campo abierto de frijol contra *Trialeurodes vaporariorum* con excelentes resultados de control, sobre todo en ninfas de estadio dos y tres (García-Juárez *et al.*, 1999).

En años recientes, las técnicas de genética molecular han sido utilizadas para resolver problemas de taxonomía, identificación y variación genética en un gran número de hongos (St Leger & Joshi, 1997; Bidochka *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000). Entre las técnicas de biología molecular, el método del polimorfismo del DNA por amplificación al azar con oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR) ha sido utilizado para diferenciar aislados de hongos entomopatógenos (Fegan *et al.*, 1993; Bidochka *et al.*, 1994) Tigano-Milani *et al.* (1995), por medio del método de RAPD-PCR, analizaron la variabilidad genética de 27 aislados de *P. fumosoroseus* de diferentes partes del mundo, concluyendo que constituye una valiosa herramienta para perfeccionar la taxonomía del género *Paecilomyces* y otros hongos mitospóricos. Por otra parte, pusieron en evidencia 365 fragmentos de DNA con los cuales se lograron distinguir tres diferentes grupos fenéticos con

un porcentaje de similitud >65%, dos de los grupos fenéticos arbitrarios están relacionados estrechamente (76% Similitud) con el tercer grupo totalmente diferente (14% similitud solamente). Cantone & Vandenberg (1998) evaluaron la variabilidad genética de 38 aislados de *P. fumosoroseus* de diferentes orígenes geográficos, utilizando dos tipos de marcadores genéticos, compatibilidad vegetativa y RAPD-PCR. Ambos marcadores mostraron un polimorfismo significativo, sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre el hongo con su hospedero, ni entre el hongo con su origen geográfico. Los aislados se agruparon en 19 grupos separados por compatibilidad vegetativa sugiriendo la formación de heterocariones y un posible intercambio genético poco común debido a que no ha sido observado en este hongo un ciclo reproductivo sexual.

Obornik *et al.* (2000) llevaron a cabo un análisis de variabilidad genética y relaciones filogenéticas por medio del método de RAPD-PCR entre aislados de *P. fumosoroseus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *V. lecanii* y *Aschersonia* sp. Estos autores concluyeron que este tipo de análisis es útil en la reconstrucción de relaciones intra e interespecíficas entre las especies estudiadas, proponiendo que la filogenia basada en RAPD-PCR y la variabilidad genética encontradas reflejan su distribución geográfica. Su trabajo propone que la distribución de las distancias genéticas representa un camino útil para demostrar el nivel entre y dentro de taxa seleccionados. Según los autores Obornik *et al.* (2000), la diferencia entre la filogenia y distribución de distancias genéticas de *P. fumosoroseus* y *Aschersonia* sp. es el resultado de dos estrategias de vida diferentes. La esporulación profusa del primero refleja una dispersión abundante en la naturaleza mientras que la esporulación limitada de *Aschersonia* sp. produce una distribución geográfica limitada. Además, concluyen que la movilidad de las esporas posiblemente es un factor crucial para la diversidad genética encontrada y en su evolución.

La caracterización genotípica de los hongos entomopatógenos de cada región geográfica, es relevante en cuanto a la identificación de los aislados, no solamente con el propósito de registros comerciales sino también para monitorear el impacto ambiental de un aislado particular en el campo agrícola (Bridge *et al.*, 1993; Butt *et al.*, 2001). La utilización exitosa del RAPD-PCR en diversos

entomopatógenos apoya su uso para obtener la caracterización genotípica de aislados de *P. fumosoroseus* recolectados en México, que en un futuro podrán ser utilizados como micoinsecticidas. Hasta el momento, no se conocen trabajos realizados acerca de la caracterización genotípica de aislados de este hongo en el país.

4. JUSTIFICACIÓN

El aumento del daño a la salud humana por el uso indiscriminado de insecticidas químicos, así como la presencia de altos niveles de resistencia de la mosquita blanca a estos productos y su efecto negativo en los enemigos naturales de la plaga han llevado al desarrollo de alternativas para el control de plagas agrícolas dentro de un programa de manejo integrado de plagas. Entre las alternativas se encuentra el uso de *P. fumosoroseus* como un micoinsecticida. Para poderlo producir con una calidad óptima, es necesario contar con la caracterización genotípica y fenotípica de los aislados de la región geográfica donde serán utilizados

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado varios estudios de la variabilidad genética de cepas de *P. fumosoroseus* de diferentes orígenes geográficos, evidenciando una alta variabilidad entre ellos. No obstante, se requieren estudios de la diversidad genética de aislados de *P. fumosoroseus* de insectos encontrados en cultivos de México con el propósito de detectar su variación natural en el entorno geográfico específico. Dicha variabilidad puede ser estudiada a través de técnicas moleculares como polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR). Además se requiere conocer una característica fenotípica de relevancia en los bioinsecticidas, como lo es la virulencia hacia el insecto, para observar si se asocia a algún patrón del polimorfismo de DNA encontrado.

6. HIPÓTESIS

Los aislados de *P. fumosoroseus* de México estudiados presentan una alta variabilidad genética evidenciada a través de la técnica molecular del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR), relacionada con su virulencia y demás características fenotípicas estudiadas. Estos aislados constituyen un grupo fenético diferente a los que conforman las cepas de referencia seleccionadas para este trabajo.

7. OBJETIVOS

7.1 General

- Optimizar la selección de aislados del hongo *P. fumosoroseus* recolectados en México, a través de su caracterización genotípica y virulencia *in vitro* en la mosquita blanca, para obtener aquellos con la máxima calidad para utilizarse como micoinsecticida.

7.2 Específicos

- Obtener y seleccionar cultivos monospóricos de diversos aislados de *P. fumosoroseus* recolectados de insectos en México de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (CNRCB-SAGARPA) de Tecomán, Colima.
- Extraer DNA de todos los aislados del hongo de México, y de cepas de referencia de otros países, de las colecciones de la "Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, (ARSEF)" EEUU y Centro Nacional de Recursos Genéticos/ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (CG, CENARGEN / EMBRAPA).
- Caracterizar genotípicamente *P. fumosoroseus*, por medio del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR).
- Analizar y comparar la variabilidad genética de los aislados de *P. fumosoroseus* de México y de cepas de referencia, a partir de coeficientes de similitud, relacionando esta variabilidad con su virulencia en ninfas de mosquita blanca a través de la Concentración Letal Media (CL50) en condiciones de invernadero.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Material fúngico

Se utilizaron para el estudio 14 aislados de *Paecilomyces fumosoroseus*, recolectados de mosquita blanca (*B. tabaci*) en México, de la colección del CNRCB-SAGARPA (M. en C. Víctor M. Hernández Velázquez) de Tecomán, Colima.

Se utilizaron como referencia, cepas de *P. fumosoroseus* de la ARSEF-USDA y CENARGEN/colección EMBRAPA, representantes de los tres grupos genotípicos encontrados por Tigano-Milani *et al.*, 1995. Las características de los hongos pueden observarse en la Tabla 1. Cada aislado obtenido directamente del insecto se preservó en agua destilada y aceite mineral a -4°C y nitrógeno líquido a -196°C , y se mantienen en la colección de hongos en el laboratorio de Micología Básica en la Facultad de Medicina, UNAM. Los aislados se cultivaron en agar papa dextrosa (infusión de papa blanca filtrada al 30%, glucosa (Droguería Cosmopolita, México) al 20%, agar (Bioxon, México) al 1.5%)(APD) y Agar de Sabouraud (glucosa (Droguería Cosmopolita) al 40%, peptona (Bioxon) al 10%, agar (Bioxon) al 1.5%).

Tabla 1. Claves, hospedero, cultivo y origen geográfico de los aislados y cepas de referencia de *P. fumosoroseus* en estudio.

COLECCIÓN DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA EN CONTROL BIOLÓGICO (CNRCB, SAGARPA)				
Clave CNCB	Clave UNAM del aislado	Hospedero o Substrato	Cultivo	Origen
MBP	EH-503	<i>B. tabaci</i>	Pepino	Yucatán
MBP1	EH-504	<i>B. tabaci</i>	Pepino	Yucatán
MBCH	EH-505	<i>B. tabaci</i>	Chile Hab	Yucatán
PFCAM	EH-506	<i>B. tabaci</i>	Chile	Campeche
MBPO1N	EH-507	<i>B. tabaci</i>	Noche buena	Colima
MBPO2N	EH-508	<i>B. tabaci</i>	Noche buena	Colima
MBPO3A	EH-509	<i>B. tabaci</i>	Noche buena	Colima
AMBAS2	EH-511	<i>B. tabaci</i>	Sandia	Armeria, Col.
AMBAS4	EH-513	<i>B. tabaci</i>	Sandia	Armeria, Col.
MBPO4	EH-516	<i>B. tabaci</i>	Noche buena	Colima
MBTH	EH-517	<i>B. tabaci</i>	--	Sinaloa
MBMAC	EH-518	<i>B. tabaci</i>	--	Sinaloa
MBBRT	EH-519	<i>B. tabaci</i>	Berenjena	Colima
PSMB1	EH-520	<i>B. tabaci</i>	Tomate	Nayarit

COLECCIONES: AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI (ARSEF, USDA), ITHACA, NY; CENARGEN/EMBRAPA, BRASIL				
Grupo 1*				
EH-456	<i>Cyperus rotundus</i>	--		Brasilia/DF/Brasil
Grupo 2*				
EH-454	<i>Spaethiella sp.</i>	--		Manaos/AM/Brasil
EH-455	<i>Bemisia tabaci</i>	--		FL/ USA
Grupo 3*				
EH-452	<i>Bombyx mori</i>	--		Saitama/Japón
EH-453	<i>Musca domestica</i>	--		Britania/Francia

*Grupos de *P. fumosoroseus* caracterizados genotípicamente por Tigano-Milani *et al* (1995).

8.2 Obtención de cultivos monospóricos

Los cultivos monospóricos de los aislados obtenidos del insecto se llevaron a cabo por el método modificado de Goettel & Inglis (1997).

En un portaobjetos colocado sobre un triángulo de vidrio, dentro de una caja de Petri (estériles), se añadieron 3 ml de agarosa (GIBCOBRL[®], OK, US) al 0.8% en condiciones de esterilidad. Una vez solidificada la agarosa se hizo una suspensión conidial de *P. fumosoroseus* de 1×10^4 conidios/mL, aplicando y extendiendo 5 μ L de la suspensión sobre el portaobjetos con la agarosa. Al localizar un conidio en el objetivo de 10 x y verificarlo con el objetivo de 40 x se colocó el conidio exactamente al centro del campo. Se bajó el revolver con el tornillo macrométrico y se cerró el diafragma hasta que solo se observó un pequeño haz de luz sobre la región donde estaba localizado el conidio (área de 2 mm² aprox.). Se practicaron pequeños cortes con un bisturí estéril de manera que se formó un cuadrado en torno a la circunferencia del haz de luz. Nuevamente se observó a 10 y 40 x verificando que el área donde se hizo el corte incluyera solamente un conidio, todo bajo condiciones de esterilidad. Finalmente se tomó la fracción de agarosa con el conidio, colocando la parte del conidio hacia arriba en una caja de Petri con APD e incubando a 28°C. Los cultivos fueron revisados diariamente en el microscopio estereoscopio para observar el crecimiento de la colonia a partir de un solo conidio.

8.3 Selección de cultivos monospóricos

Éstos fueron seleccionados con base en las siguientes características fenotípicas: crecimiento colonial, tamaño de los conidios y esporulación.

8.3.1 Pruebas de crecimiento

Cada uno de los cultivos monospóricos obtenido fue sembrado en medio APD con el propósito de observar y medir su crecimiento radial. El registro de su velocidad de crecimiento (mm/día) fue obtenido a partir de los valores de

crecimiento expresada como la relación entre su valor final menos el valor inicial dividido entre el número de días en los que ocurren. Dicho parámetro fue registrado hasta el momento en el cual se estabilizó el crecimiento. Una vez obtenido este valor, las mediciones de crecimiento se detuvieron, el período de tiempo varió para cada aislado. Además, se registró el aspecto morfológico de cada colonia, comparándolo con el cultivo original.

8.3.2 Pruebas de tamaño de conidios y esporulación

Finalizadas las pruebas de crecimiento los cultivos fueron utilizados para la medición del tamaño de conidios y cuantificación de la esporulación.

El tamaño de los conidios se realizó por medio de un montaje directo que fue observado al microscopio Olympus CH2, el cual posee una reglilla en uno de los oculares, calibrada para cada aumento. Se midieron diez conidios de cada cultivo monospórico y original, registrando su ancho y largo en μm .

Para medir la esporulación se llevó a cabo una suspensión de conidios obtenida de la caja de Petri al final del experimento de crecimiento radial. Se agregaron 10 ml de agua destilada a cada caja de cultivo con el fin de remover el mayor número de conidios posibles, y a continuación la suspensión fue cuantificada en la cámara de Neubauer. Todos los resultados obtenidos fueron debidamente tabulados y graficados con el propósito de utilizarlos para la selección del monospórico comparándolos siempre con las características del aislado original.

8.3.3 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.01$) para evaluar sus diferencias.

8.3.4 Conservación de cultivos monospóricos seleccionados

Los cultivos monospóricos seleccionados fueron conservados en agua destilada estéril y aceite mineral a 4°C y en agua glicerinada al 10% en nitrógeno líquido a -196°C.

8.4 Caracterización genotípica de los aislados de *P. fumosoroseus*

Esta caracterización fue realizada obteniendo DNA de los aislados originales y de los cultivos monospóricos seleccionados.

8.4.1 Extracción de DNA

La masa micelial se obtuvo de cultivos en medio líquido de Sabouraud (Bioxón) incubados a 25°C durante 7 a 10 días en agitación a 150 rpm. Posteriormente, el micelio se separó por filtración con un embudo Büchner y papel Whatman No 1, y se lavó con agua destilada estéril. El micelio fue colectado en papel filtro estéril, secado, y finamente pulverizado, al añadirle nitrógeno líquido. Se colocó este material en un tubo Eppendorf (Elkay, MA, US) estéril, hasta la parte cónica del mismo, se agregaron 600 µL de buffer de lisis (Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS al 3%, Mercaptoetanol al 1%), se agitó firmemente hasta obtener una mezcla homogénea, y se centrifugó a 10,000 rpm. Al sobrenadante se le añadieron 200 µg/mL de Proteasa K (QIAGEN, CA, US) y se agitó firmemente. La muestra se incubó en un baño de agua a 65°C por 1 hora. Luego se añadieron 500 µg/mL de RNAsa (QIAGEN, CA, US) incubando a 37°C, 30 min. Después, se agregaron 500 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y el tubo se agitó firmemente hasta obtener una muestra con un aspecto lechoso. Luego se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min. La capa más superficial del sobrenadante y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. Se agregó nuevamente Proteasa K, incubando a 65°C, por 30 min. Se repitió el tratamiento de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) de manera similar a

como se había hecho, centrifugando y obteniendo el sobrenadante. Se añadieron 10 μ L de una solución de acetato de sodio (SIGMA, MO, US) para iniciar la precipitación y dos volúmenes de etanol al 100% (a -20°C) e invirtiendo el tubo varias veces hasta visualizar la precipitación del DNA. La muestra se centrifugó 2 min a 14,000 rpm hasta obtener el precipitado en el fondo del tubo. Se decantó el etanol (J. T. Baker, México) al 100% y luego se lavó dos veces con etanol (Baker) al 70% sin perturbar la pastilla, centrifugando 2 min a 14,000 rpm. Se decantó el alcohol y el DNA se secó al vacío por 10 min. El DNA obtenido fue resuspendido en agua destilada estéril, manteniendo la muestra a -20°C hasta su uso.

Para la cuantificación del DNA se utilizaron concentraciones estándar del fago λ (GIBCOBRL[®], OK, US) en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (Baker) a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador TBE 0.5 X a 90 V durante 1 hora.

8.4.2 Estandarización del método del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)

La caracterización genotípica de los aislados de *P. fumosoroseus* recolectados en México, se realizó a través del RAPD-PCR. Se utilizaron los siguientes iniciadores (Bioselect, México), sugeridos por Cantone y Vandenberg (1998) y Obornik *et al.* (2000) para este hongo (Tabla 2). De todos los iniciadores se escogieron aquellos que mejor amplificaron los aislados en estudio. La estandarización del método se llevó a cabo con el aislado EH-504.

Tabla 2. Iniciadores utilizados en el estudio.

INICIADOR	SECUENCIA
OPA11	5' CAATCGCCGT 3'
OPA19	5' CAAACGTCGG 3'
OPC1	5' TTCGAGCCAG 3'
OPC7	5' GTCCCGACGA 3'
OPC20	5' ACTTCGCCAC 3'
OPE2	5' GGTGCGGGAA 3'
OPE3	5' CCAGATGCAC 3'
OPE11	5' GAGTCTCAGG 3'
OPE14	5' TGCGGCTGAG 3'
OPF 1	5' ACGGATCCTG 3'
OPF 5	5' CCGAATTGCC 3'
OPF 6	5' GGAATTCCG 3'
OPF7	5' CCGAATTGCC 3'
OPF 16	5' GGAGTACTGG 3'
OPF 17	5' AATCCGGGAA 3'
OPB 5	5' GCGCCCTTC 3'
OPB 6	5' TGCTCTGCC 3'
OPB7	5' GGTGACGCAG 3'

8.4.2.1 Programa de amplificación

Se probaron dos programas de amplificación en un termociclador iCycler™ (BioRad, Hercules, CA) que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Programas de amplificación.

A (Reyes et al., 1999)	B (Sobral & Honeycutt, 1993)
1 Ciclo	1 Ciclo
94°C – 5 min	94°C – 5 min
45 Ciclos	40 Ciclos
92°C – 1 min	94°C – 1 min
35°C – 1 min	35°C – 1 min
72°C – 1 min	72°C – 1 min
1 Ciclo	1 Ciclo
72°C – 5 min	72°C – 7 min

8.4.2.2 Concentración óptima de los iniciadores

Se eligió al azar un iniciador del Kit Operon (OPE-14) y se llevó a cabo una curva con las concentraciones de 50, 100, 200, y 300 pmoles/ μ L y se realizó el RAPD-PCR bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

8.4.2.3 Curva de $MgCl_2$

Se realizó una curva de magnesio con las concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5 mM usando DNA de la cepa EH-504 bajo las condiciones antes mencionadas para obtener la concentración óptima de magnesio para los aislados ensayados.

8.4.2.4 Electroforesis

Todos los productos de amplificación fueron observados a través de geles de agarosa (DIFCO) al 1.5% teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g/mL en amortiguador TBE 0.5 X a 60 V durante 4 horas. El estándar de pares de bases fue el 123 bp en escalera (123 bp DNA ladder, GIBCOBRL[®]). La imagen de los geles se capturó con un fotodocumentador Synopsis (Syngene, Cambridge, MA) y se imprimió con una impresora térmica SONY 650 (Syngene, Tokio). La imagen de los geles se invirtió con el programa GeneSnap[™] (Syngene) para una óptima resolución. El tamaño de los fragmentos se calculó con la ayuda de una ecuación obtenida a partir de una regresión basada en los valores observados del estándar de pares de bases

$$T = (-1101.16393 * LN(Rf)) + 116.70171$$

8.4.3 Análisis de datos del RAPD-PCR

Los productos de amplificación de los diferentes aislados se compararon entre ellos y se analizaron para la presencia o ausencia de bandas específicas

Estos datos se relacionaron para obtener un estimado de similitud para cada par de aislados.

La similitud se calculó por medio del coeficiente de Jaccard (Real & Vargas, 1996), y se obtuvo una matriz de similitud genética pareada entre los aislados. Dicha matriz fue la base para construir tanto un fenograma por medio del método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA) como la relación entre los aislados, en un diagrama multidimensional usando el análisis de coordinados principales (ACP). Para medir si el resultado del fenograma coincidía con la matriz de similitud original se calculó el coeficiente cofenético de correlación (Sneath & Sokal, 1973). Los análisis anteriores fueron llevados a cabo utilizando el programa NTSYS-PC versión 2.0 (Rohlf, 1998). Con la finalidad de establecer los grupos dentro del fenograma con robustez estadística se realizó la prueba de Strauss (1982). Para ello, la matriz de similitudes genéticas pareadas fue aleatorizada 100 veces por el método de bootstrap por medio de la técnica de remuestreo de Efron (1982). Los datos de distancia de las 100 matrices aleatorizadas fueron ordenadas de manera descendente, eliminando los unos de las diagonales que resultan de la comparación entre una misma cepa. Una distribución de frecuencias de los valores de distancia con intervalos de 0.01 fue construida. Una vez establecida la distribución de frecuencia de estos valores, la frecuencia asociada al valor de distancia más alto fue restada a la frecuencia inmediata superior, la inmediata superior a la subsiguiente y así sucesivamente hasta agotar todas las posibilidades de resta a lo largo de la distribución de frecuencias. Con estos valores se construyó una distribución de diferencias acumulativas, partiendo de las dos primeras diferencias hasta sumar todos los valores. Por último, el valor obtenido de la relación algebraica, $(A(A-1) / 2) \times 100 \times 0.05$, donde A denota el número de cepas u OTU's, 100 es el número de veces que la matriz de distancia es aleatorizada y 0.05 el nivel de significancia, se interpola en la distribución de diferencias acumulativas para obtener el punto de corte que determina la significancia o robustez estadística de los grupos en el fenograma. La confiabilidad estadística del árbol inferido a través de marcadores RAPD fue evaluada por el método de remuestreo de bootstrap de Efron (1982).

Para estimar la variabilidad genética del grupo se llevó a cabo el cálculo de índice de variabilidad nucleotídica según Nei & Li (1979).

9. RESULTADOS

Se obtuvieron entre cuatro y trece cultivos monospóricos de cada uno de los aislados originales (Tabla 4). La figura 1 muestra como ejemplo la colonia del cultivo monospórico EH-509 de *P. fumosoroseus*. Se encontró una gran diversidad en la coloración de las colonias de color blanco a color rosa grisáceo. Predominó el aspecto algodonoso al inicio del crecimiento y a medida que los cultivos llegaron a la fase de esporulación (aprox. 8 días) presentaron diferentes tonalidades de gris. En la morfología microscópica se observaron grupos compactos de conidióforos erectos reunidos en fiálides ensanchadas en la base, con conidios de cilíndricos a fusiformes, 3-4 X 1-2 μm .



Figura 1. Colonia del cultivo monospórico EH-509 de *P. fumosoroseus*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Número, promedios del largo y ancho de conidios, velocidad de crecimiento, esporulación, y selección de los cultivos monospóricos obtenidos de los aislados de *P. fumosoroseus* estudiados y sus cultivos originales

AISLADO	CULTIVOS MONOSPÓRICOS (Número)	LARGO Y ANCHO DE CONIDIO (Promedio) (μm)	VELOCIDAD CRECIMIENTO (Promedio) mm/día	ESPORULACIÓN (Promedio) Conidios/mL	CULTIVO MONOSPÓRICO SELECCIONADO
EH-503	12	5.4 X 2	0.27	3.85×10^8	3
EH-504	8	4.9 X 2	0.181	2.44×10^9	1
EH-505	10	4.8 X 2	0.203	6.08×10^7	1
EH-506	5	5.6 X 2	0.38	1.17×10^7	3
EH-507	13	5.1 X 2	0.308	2.1×10^8	3
EH-508	5	4.9 X 2	0.341	2.08×10^8	3
EH-509	8	4.2 X 2	0.177	1.28×10^6	3
EH-511	5	4.6 X 2	0.14	1.19×10^8	3
EH-513	4	4.4 X 2	0.177	3.24×10^7	3
EH-516	8	5.0 X 2	0.211	2.34×10^8	2
EH-517	12	5.1 X 2	0.26	4.07×10^9	6
EH-518	5	4.8 X 2	0.192	1.78×10^8	6
EH-519	7	4.8 X 2	0.158	4.47×10^8	2
EH-520	6	4.8 X 2	0.223	3.97×10^6	3

9.1 Características fenotípicas de los aislados estudiados y de sus cultivos monospóricos

9.1.1 Tamaño de los conidios

Los resultados de la medición de los conidios fueron en promedio de 4.2-5.6 X 2 μm , la forma fue de cilíndrica a fusiforme (Tabla 4). No se encontraron diferencias significativas ni en el largo ni en el ancho de los conidios. El aspecto microscópico corresponde a la descripción de Domsch *et al.* (1980).

9.1.2 Prueba de crecimiento

Se realizaron gráficas de crecimiento con el diámetro (mm) de las colonias que se midieron diariamente durante un periodo de 15 a 25 días, con el propósito de comparar la velocidad de crecimiento de cada uno de los cultivos monospóricos con el aislado original y seleccionar el más adecuado. En la tabla 4 se muestra el promedio (mm/día) de la velocidad de crecimiento del aislado original y sus cultivos monospóricos. La figura 2 muestra el crecimiento del aislado original EH-516 y ocho cultivos monospóricos derivados del mismo.

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) en la velocidad de crecimiento entre los aislados originales EH-507, EH-503, EH-506, EH-511, EH-520 y EH-518 y sus cultivos monospóricos.

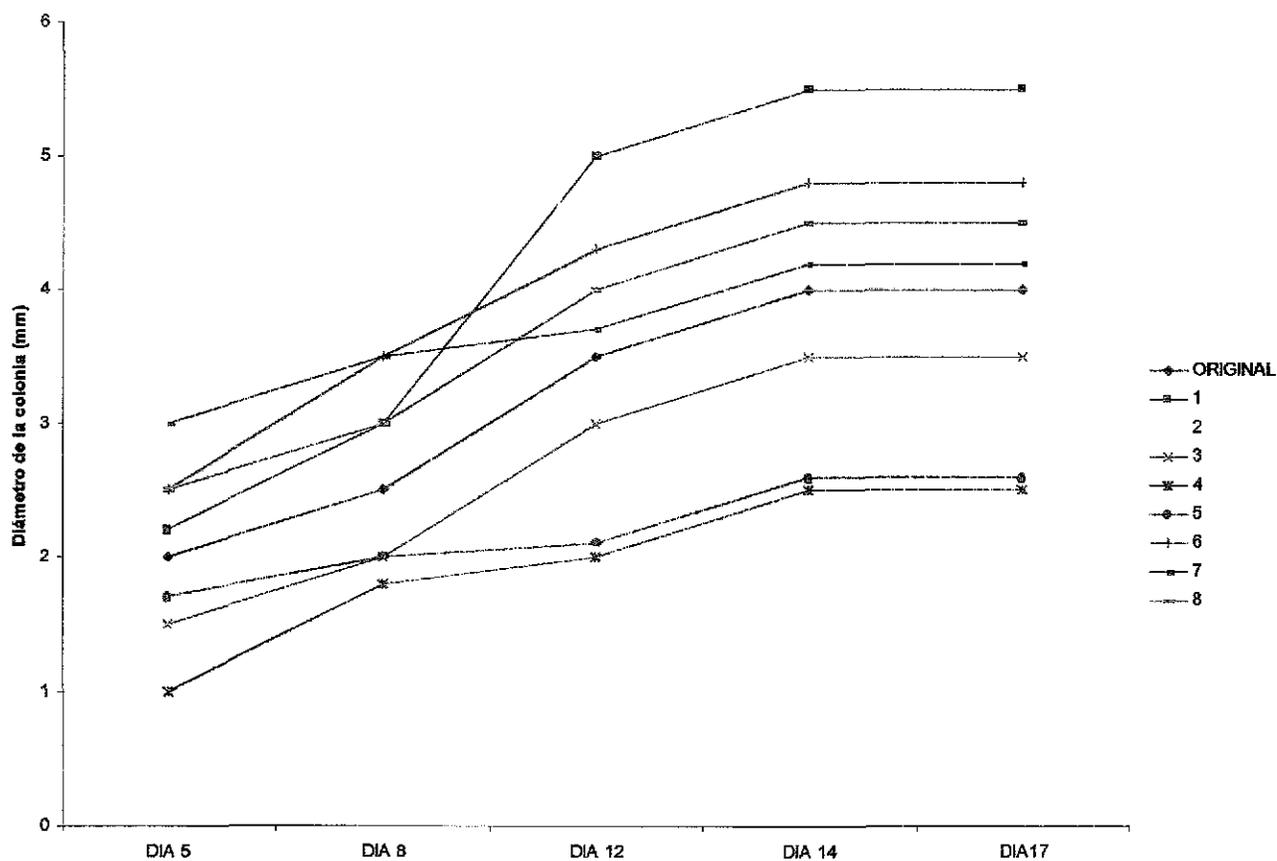


Figura 2. Gráfica de crecimiento del aislado EH-516 y de los ocho cultivos monospóricos obtenidos

9.1.3 Prueba de esporulación

El promedio de la esporulación en conidios/mL de todos los aislados originales y sus cultivos monospóricos se muestra en la Tabla 4. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) en la esporulación de los aislados originales EH-507, EH-503, EH-506, EH-511, EH-520 y EH-518 y sus cultivos monospóricos.

9.1.4 Selección del cultivo monospórico

Para seleccionar el cultivo monospórico de cada aislado a estudiar, se compararon los resultados del análisis de varianza para cada prueba entre el aislado original y los cultivos monospóricos. Todos los análisis fueron realizados con una significancia (α) de 0.01

Se seleccionó el cultivo monospórico para el estudio genotípico y pruebas de virulencia de acuerdo al que mostró la mejor velocidad de crecimiento y mayor esporulación cuando se comparó con el aislado original (Tabla 4). En la Tabla 5 se muestra un ejemplo con el aislado EH-506, de la selección del cultivo monospórico, con base en las características arriba mencionadas.

Tabla 5 Selección del cultivo monospórico de acuerdo a la velocidad de crecimiento y esporulación del aislado original EH-506 y de los cultivos monospóricos del aislado.

Aislado	Largo de conidio	Velocidad de	Esporulación
EH-506	(μm)	crecimiento (mm/día)	(conidios/mLx10⁷)
Original	5.514	0.44	4.3
Monospóricos			
M-1	5.002	0.408	2.89
M-2	6.026	0.416	3.23
M-3*	5.898	0.433	5.14
M-4	5.514	0.358	1
M-5	6.026	0.25	1.17
Análisis de varianza	Sin diferencia significativa	$P < 0.01$	$P < 0.01$

* Cultivo monospórico seleccionado

En el anexo 1 se muestran los análisis estadísticos para la selección de cultivos monospóricos de todos los aislados originales estudiados.

9.2 Caracterización genotípica de los aislados de *P. fumosoroseus*

9.2.1 Obtención de DNA

Se obtuvo el DNA de los 14 aislados originales y de los cultivos monospóricos seleccionados de cada uno, y de las cinco cepas de referencia de *P. fumosoroseus* de acuerdo al método descrito anteriormente. Las concentraciones de DNA obtenidas fluctuaron entre 50 a 300 ng/ μl . La figura 3 muestra por ejemplo la cuantificación de 16 muestras de DNA del aislado EH-504 en electroforesis en gel de agarosa utilizando concentraciones estándar (10, 20,

50 y 100 ng) del fago λ . Todas las muestras ensayadas contienen entre 100 y más de 250 ng de DNA.

10 ng
20 ng
50 ng
100 ng
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

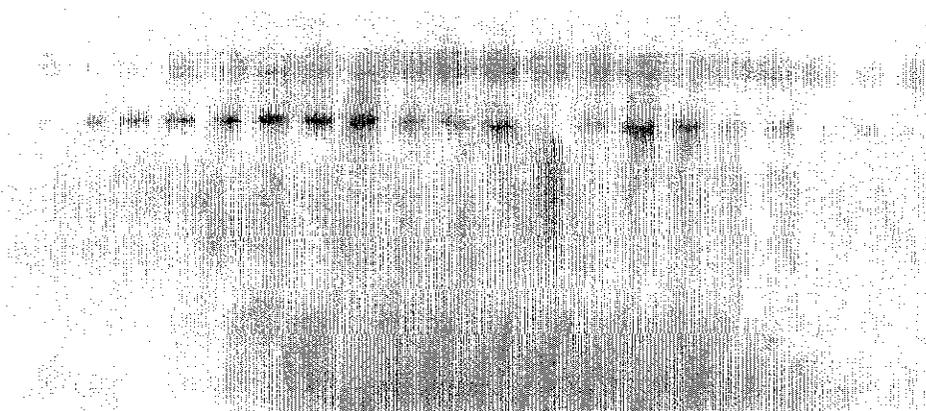


Figura 3. Concentración de DNA en gel de agarosa al 0.8% de 16 muestras de *P. fumosoroseus*. La electroforesis se realizó a 100 V por 45 min, los geles se tiñeron con bromuro de etidio. Los primeros cuatro carriles muestran diferentes concentraciones del fago λ . En los demás carriles, se observa las concentraciones de DNA de las muestras del aislado EH-504.

9.2.2 Estandarización del método RAPD-PCR

El programa con el cual se obtuvo la máxima amplificación fue el B (Tabla 3), debido a que se llevó a cabo satisfactoriamente el procedimiento de RAPD-PCR de todos los aislados con el iniciador de prueba.

9.2.2.2 Concentración de los iniciadores

La estandarización de la concentración del iniciador OPE14 se llevó a cabo con diferentes concentraciones del iniciador y utilizando el aislado EH-504. El RAPD fue realizado bajo las condiciones descritas en materiales y métodos.

Sólo a una concentración mayor de 100 pmoles se puso en evidencia el polimorfismo del DNA de la muestra utilizada. En consecuencia se seleccionó dicha concentración para realizar todos los experimentos posteriores.

9.2.2.3 Concentración de $MgCl_2$

La concentración óptima de $MgCl_2$ fue de 3.0 mM. En la figura 4 se puede observar la curva realizada utilizando el aislado EH-504 con el iniciador OPE14.



Figura 4. Curva de $MgCl_2$. Se utilizó DNA del aislado EH-504 y el iniciador OPE14 con diferentes concentraciones de $MgCl_2$. El gel de agarosa se utilizó a una concentración de 1.5% y se corrió a 60V durante 2 h.

TEXIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.2.3 Condiciones óptimas para el Método Polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)

Para establecer las condiciones se utilizó el aislado EH-504, comenzando con los iniciadores OPA11 y OPC, y concentraciones de DNA de 5, 10 y 20 ng. Las primeras reacciones de amplificación mostraron bandas que indicaron que las condiciones en las cuales fueron realizadas son óptimas para continuar con los iniciadores faltantes. Además, se observó que hubo amplificación con las tres concentraciones de DNA utilizadas, indicando que las reacciones posteriores se podrían llevar a cabo desde una concentración de 5 ng de DNA en adelante.

La amplificación para todos los ensayos posteriores se efectuó en un aparato iCyclerTM (Biorad) bajo las siguientes condiciones: un volumen de reacción de 25 μ l conteniendo 5 ng de DNA genómico, 300 pmol de cada iniciador, 3 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, y 1 U de Taq DNA polimerasa. El patrón de temperaturas fue: un ciclo de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 35°C por 1 min y un ciclo de 72°C por 1 min, finalmente se llevó a cabo una extensión final de 72°C por 7 min (Sobral & Honeycutt, 1993). El corrimiento electroforético de los segmentos de DNA se efectuó en geles de agarosa al 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio. El estándar de pares de bases fue el 123 bp en escalera (123 bp DNA ladder, Gibco).

9.2.4 RAPD-PCR

El RAPD-PCR tanto de los catorce aislados originales como de los catorce cultivos monospóricos seleccionados de cada uno mostraron el mismo polimorfismo del DNA (Figura 5). Los ensayos con los DNA's de los cultivos originales de *P. fumosoroseus* y de los monospóricos se llevaron a cabo por duplicado con cada uno de los dieciocho iniciadores ensayados. La figura 5 muestra un ejemplo de los perfiles polimórficos de los aislados originales y su monósporico seleccionado.

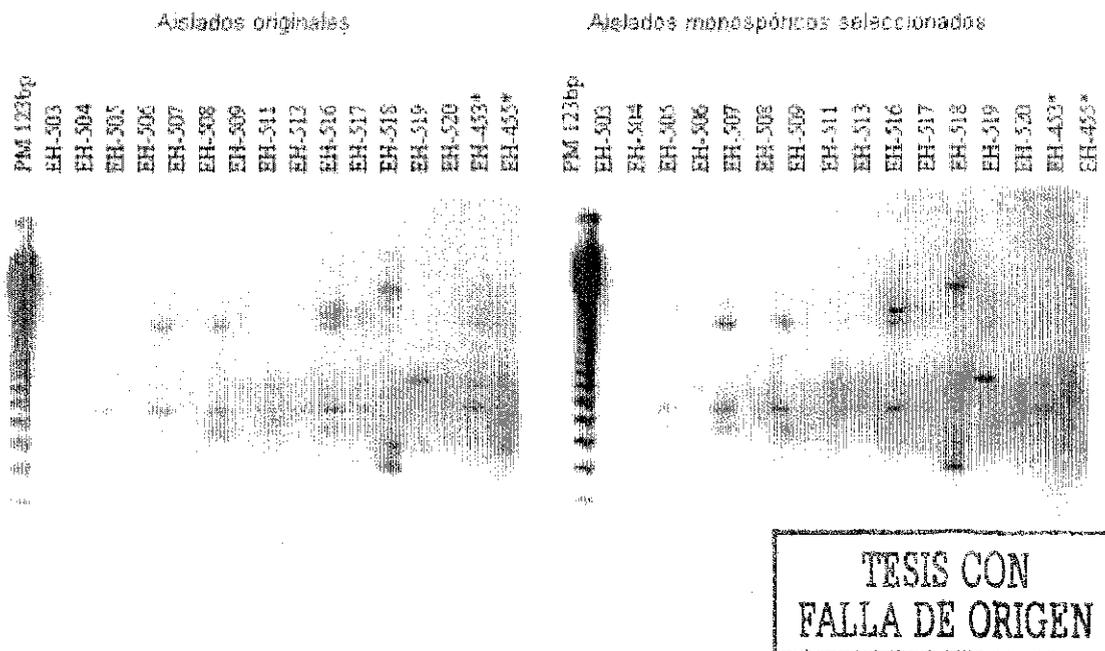


Figura 5. Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR de DNA de los aislados de México originales (izquierda) y monospóricos seleccionados (derecha) de *P. fumosoroseus* generados con el iniciador OPF5. La electroforesis de los productos de RAPD-PCR se realizó en gel de agarosa al 1.5% coloreado con bromuro de etidio a 60 V durante 4h. M = 123 pb DNA en escalera. * DNA de cepas de referencia de Francia y Estados Unidos. La imagen fue invertida con el programa GenSnapTM de Syngene para una óptima resolución.

La figura 6 muestra los perfiles polimórficos obtenidos con el iniciador OPB7, con el DNA de los aislados de México y de dos cepas de referencia. Se puede observar una similitud entre los patrones polimórficos de los aislados de México y diferencia con aquellos de las cepas de referencia^{*} de Estados Unidos (EH-455) y Francia (EH-453). Este fenómeno se observó con la mayoría de los oligonucleótidos ensayados. Con este iniciador (OPB7) una cepa de referencia de Brasil (EH-454) no mostró ningún polimorfismo.

El iniciador que mostró el mayor polimorfismo fue el OPC20 (184 bandas) y el menor OPE11 (65 bandas). Las cepas de referencia mostraron un polimorfismo pobre con todos los iniciadores utilizados. Tres bandas polimórficas de 1742,

1342 y 819 bp se destacaron en los patrones RAPD-PCR amplificados con el iniciador OPB7 y obtenidos de los aislados y/o cepas estudiadas (Figura 6). Cabe referir que dichas bandas son comunes en todos los aislados independientemente de su origen. Existen fragmentos polimórficos que aparecen constantes en todos los aislados de México y las cepas de referencia. Los fragmentos constantes con el iniciador con el que fueron amplificados respectivamente son: 910 bp y 620 bp con el OPC20 y 1053 bp con OPF17. Además, se amplificaron dos bandas 1796 bp y 996 bp utilizando el iniciador OPF7 que fueron constantes para todos los aislados de México.

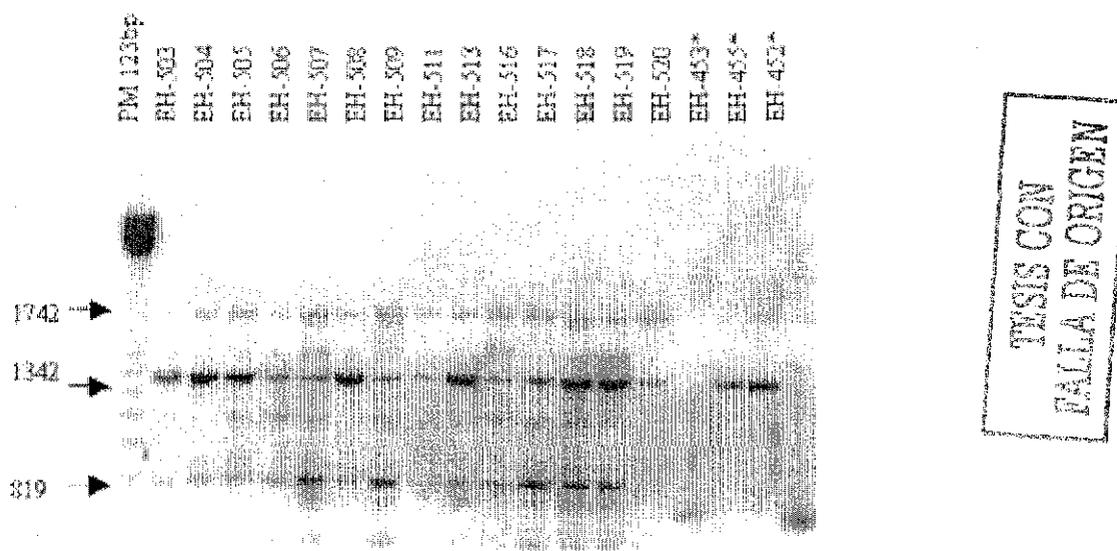


Figura 6. Perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR de 5 ng de DNA de los aislados de México y cepas de referencia (*) de *P. fumosoroseus* generados con el iniciador OPB7. La electroforesis de los productos de RAPD-PCR se realizó en gel de agarosa al 1.5% coloreado con bromuro de etidio a 60 V durante 4 h. M = 123 pb DNA en escalera. La imagen fue invertida con el programa GenSnap™ de Syngene para una óptima resolución

Todos los iniciadores que originaron productos de amplificación fueron incluidos en el análisis estadístico con excepción del iniciador OPF16, que no originó ninguno. Se obtuvieron un total de 1776 bandas polimórficas, utilizadas en la construcción de la matriz básica de presencia/ausencia (Anexo 2). Para el cálculo de las matrices de similitud se utilizó el coeficiente de Jaccard (Real & Vargas, 1996) y a partir de éste, se clasificaron los aislados a través de un fenograma (Figura 7). Para que los grupos formados fueran altamente significativos se calculó el punto de corte que fue de 0.70 (línea punteada en el fenograma), a partir del cual se formaron cinco grupos reales (Figura 7). El primer grupo (I) corresponde a los aislados de México con una similitud del 72%; el segundo grupo (II) corresponde a las cepas de Brasil (EH-454 y EH-456) con una similitud del 75%; el tercero (III) corresponde a la cepa proveniente de Estados Unidos (EH-455); el cuarto (IV) a la cepa de Francia (EH-453) y el quinto (V) a la cepa de Japón (EH-452).

Con los iniciadores estudiados no fue posible incluir las cepas de México dentro de ninguno de los tres grupos fenéticos propuestos por Tigano-Milani *et al.* (1995), ya que no se pudo observar ninguna correlación entre los polimorfismos del DNA de los aislados de México y el polimorfismo mostrado por las cepas de referencia representativas de los tres grupos fenéticos mencionados arriba.

Con la misma matriz de similitud mencionada anteriormente se ordenaron los aislados estudiados utilizando la técnica de coordenados principales (Figura 8), y el árbol de tendido mínimo (Figura 9) que muestran el ordenamiento de los aislados con base en el porcentaje acumulado de comparación entre los aislados estudiados.

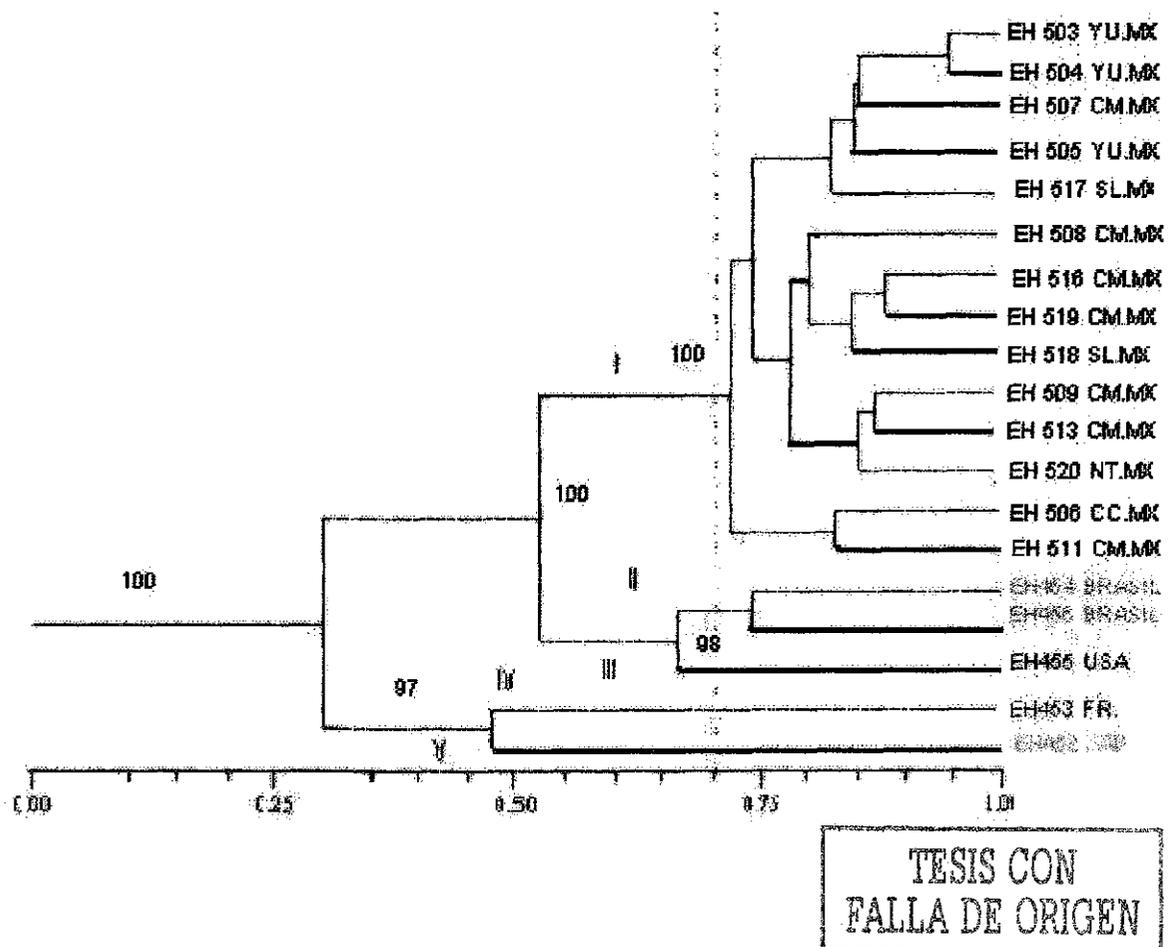


Figura 7. Fenograma que muestra los grupos obtenidos por RAPD-PCR con los diecisiete iniciadores para los 19 aislados. El fenograma fue generado a partir de la matriz de similitud utilizando el método UPGMA. La línea punteada indica el punto de corte obtenido del análisis. Los valores de los bootstrap fueron generados del procedimiento de Efron (1982), los valores menores de 97% no son mostrados.

La prueba de Mantel ($r = 0.97$, $P < 0.001$) o sea, el coeficiente cofenético de correlación y el mejor punto de corte del árbol (0.70) (Figura 7) mostraron que el análisis y los grupos resultantes fueron resultado de una verdadera relación biológica entre los aislados estudiados y no fue un producto al azar.

Además el análisis de componentes principales como se muestra en la figura 8, explica una variabilidad entre los aislados de México y refleja su agrupamiento y ubicación geográfica con los aislados de Brasil (EH-454 y EH-456) y Estados Unidos (EH-455) y de manera inversa con los de Francia (EH-453) y Japón (EH-452).

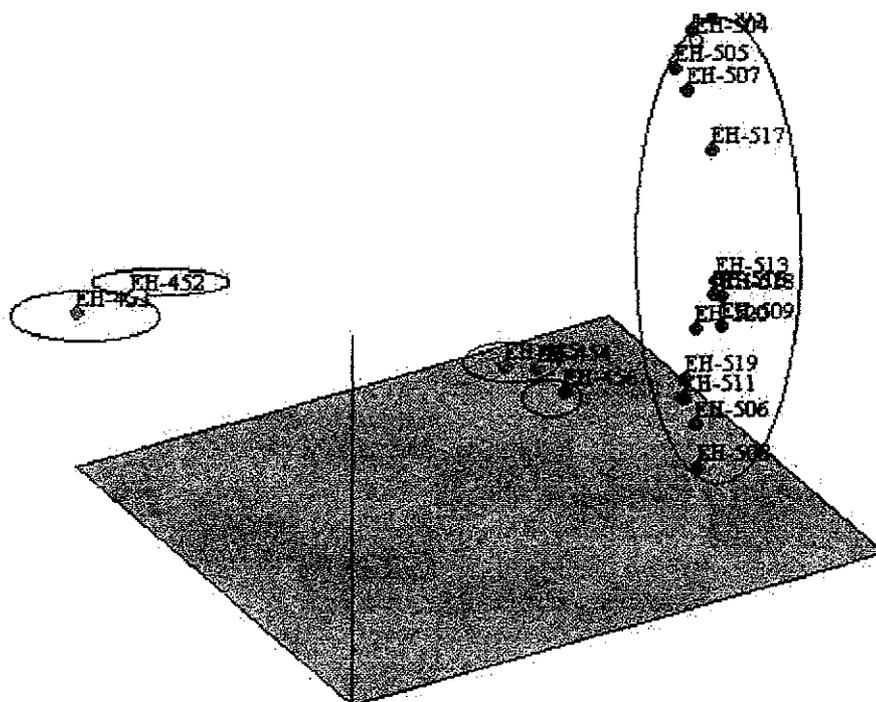


Figura 8. Ordenamiento de los aislados procedentes de México y otros países según el análisis de coordenados principales. Los aislados se encuentran distribuidos de acuerdo al eje de ordenadas.

La sobreposición del árbol de tendido mínimo (Figura 9) corrobora que los aislados de México mantienen una estrecha relación entre sí, ya que se encuentran ordenados en el mismo plano vertical. Además, las cepas que

muestran una distancia menor con las de México son las cepas de referencia provenientes del continente americano, de Brasil (EH-454 y EH-456) y de Estados Unidos (EH-455); y las que muestran una distancia mayor, son las de Japón (EH-452) y Francia (EH-453), que pertenecen a otros continentes. El índice de diversidad nucleotídica fue de 0.3 con una desviación estándar de 0.15, lo que indica una alta variabilidad genética de los cinco grupos.

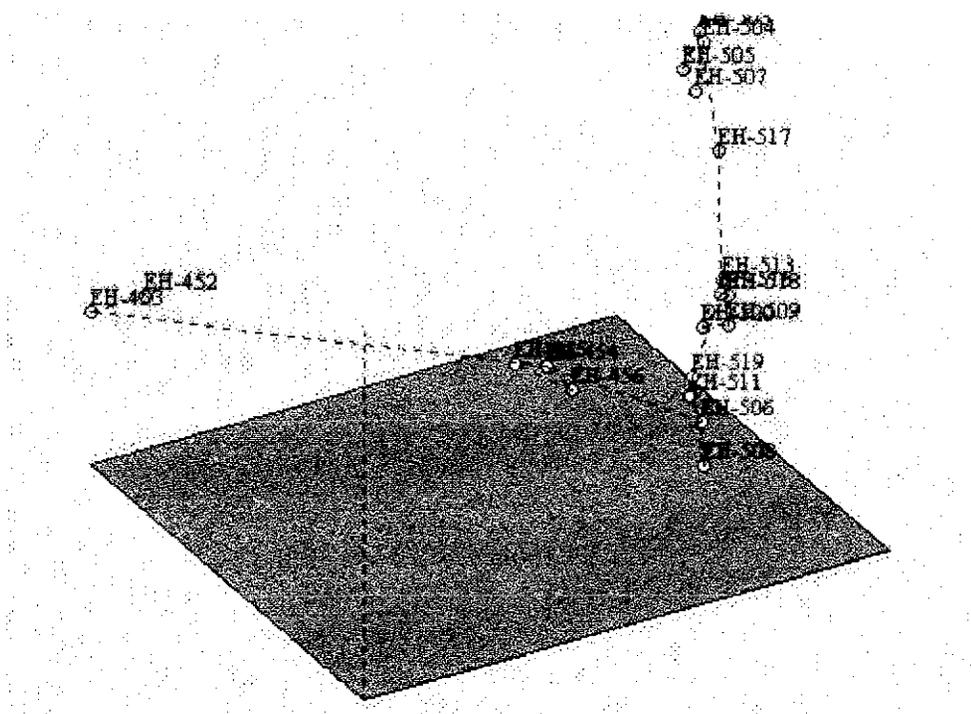


Figura 9. Ordenamiento de los aislados estudiados según el árbol de tendido mínimo. Las líneas punteadas indican la relación directa entre los aislados.

10. DISCUSIÓN

Para llevar a cabo un control biológico eficiente de plagas agrícolas relevantes como la mosquita blanca en México, utilizando insecticidas biológicos, se requiere una caracterización genotípica y fenotípica de los aislados de la región geográfica donde serán utilizados. Este trabajo aporta conocimientos básicos acerca de estudios de la variabilidad genética de aislados de *P. fumosoroseus* de diferentes estados de la República, poniendo en evidencia variabilidad entre ellos, así como diferencias genotípicas cuando fueron comparados con cepas de referencia de otros países.

Con respecto a los cultivos monospóricos seleccionados obtenidos de cada aislado se encontraron solamente diferencias en algunos de ellos al ser comparados con el cultivo original, en cuanto a la velocidad de crecimiento y a la esporulación ($P < 0.001$), más no en el tamaño de los conidios. Tampoco se encontraron diferencias entre el RAPD-PCR de los aislados originales y sus cultivos monospóricos en todos los ensayos repetidos realizados. Esto sugiere que los cambios genéticos, si acaso ocurrieran, no se hacen evidentes con esta prueba en especial. Es importante señalar que para el estudio de los aislados de microorganismos debe obtenerse siempre el cultivo monospórico, para que independientemente de las pruebas que se realicen, la población del microorganismo siempre sea homogénea. La pureza genotípica (Goettel & Inglis, 1997) es necesaria para llevar un control de calidad estricto tanto en la empresa de producción masiva, como al momento de utilizar el hongo como bioplaguicida en campo. Es relevante también, reconocer el genotipo asperjado para estudios sobre impacto ambiental de estos entomopatógenos, realizados de manera infrecuente hasta la fecha. Por lo anterior, en este trabajo todos los ensayos se llevaron a cabo con cultivos monospóricos; los cultivos están conservados por diferentes métodos en la colección de cultivos del laboratorio de Micología Básica, Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

La caracterización fenotípica de los aislados estudiados es también de relevancia en los bioplaguicidas ya que su eficiencia en el campo agrícola depende,

entre otros muchos factores, de la temperatura óptima para su crecimiento, germinación y máxima esporulación. La influencia de las condiciones ambientales, en particular la temperatura y humedad, determina la capacidad de los hongos entomopatógenos para infectar a su hospedero (Benz, 1987; McCoy *et al.*, 1988; Glare & Milner, 1991). Para el desarrollo exitoso de un agente de control biológico, especialmente de un hongo patógeno, éste debe estar adaptado a las condiciones ambientales, especialmente al microclima y a la temperatura del área donde va a ser aplicado (Ferron *et al.*, 1991; Maniania & Fargues, 1992, Lomer *et al.*, 2001).

Los resultados que se obtuvieron en cuanto a la velocidad de crecimiento a 28° C, temperatura seleccionada debido a que según Landa *et al.* (1994) es adecuada para tener los valores de crecimiento y esporulación máximos en este hongo, muestran gran variabilidad en la velocidad de crecimiento en un rango de 0.15 mm a 0.38 mm/día a esa temperatura; y esta misma variación se observó en la esporulación, desde 3.97×10^6 hasta 4.07×10^9 conidios/ml. Estas diferencias interspecíficas están de acuerdo con el trabajo de Vidal *et al.* (1997), donde observaron la misma variabilidad intraespecífica entre aislados de *P. fumosoroseus* provenientes de diferentes países con diferentes climas. Estos autores mostraron variabilidad en los aislados de este hongo, en cuanto a la velocidad de crecimiento y temperatura, relacionado al microclima del biotopo fúngico.

Hasta la fecha, no se conoce en México la caracterización genotípica de *P. fumosoroseus* aislado de la mosquita blanca. Para evaluar a este hongo como un agente biorregulador, es esencial conocer su distribución y potencial de intercambio genético entre y dentro de poblaciones. La genética y los estudios de poblaciones de *P. fumosoroseus* son difíciles de abordar debido a la carencia de marcadores fisiológicos, de virulencia, y a la variación fenotípica en cultivo (Cantone & Vandenberg, 1998). Esta es la primera investigación en el país que estudia el genotipo de los aislados de *P. fumosoroseus* aislados de la mosquita blanca, *B. tabaci*, provenientes de los estados de Campeche, Colima, Nayarit, Sinaloa y Yucatán a través de marcadores RAPD-PCR. Los resultados revelaron un amplio polimorfismo entre todos los aislados estudiados

El grupo I de RAPD-PCR que incorpora a todos los aislados de México, mostró variabilidad genética entre los aislados distribuidos en esta región geográfica. Todos ellos provienen de estados con clima cálido seco, de acuerdo a la clasificación del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Este mismo fenómeno fue observado por Tigano-Milani *et al.* (1995) en donde encontraron varios genotipos en una misma región geográfica. Según Obornik (2000) esta variabilidad probablemente se debe al rango de hospederos, a su distribución geográfica y en especial a la alta movilidad de sus esporas. Por otro lado, también podría deberse a la capacidad del microorganismo para adaptarse a los cambios ambientales de manera eficaz. Además, es posible que este hongo presente recombinación aunque no se le conoce un estado sexual, pero se reportó una vía de recombinación meiótica *in vitro* a través de la reproducción parasexual, que posiblemente podría ser una estrategia para el intercambio genético en este hongo (Riba & Ravelojoana, 1984). La elevada diversidad genética en los hongos anamórficos podría explicarse posiblemente por la aparición de heterocariones (Cantone & Vandenberg, 1998). La presencia de diferentes genotipos podría sugerir que los aislados simples pueden ser menos efectivos en el campo y se debe llevar a cabo la combinación de ellos en su formulación (Tigano-Milani, 1995).

Los aislados de México que presentan entre sí la mayor similitud (> 88%), y por consiguiente mayor homogeneidad son: EH-503 y EH-504 (Yucatán); EH-516 y EH-519 (Colima); EH-509 y EH-513 (Colima). Esta homogeneidad entre ellos probablemente se debe a que fueron aislados de la misma región geográfica. Sin embargo, también fueron detectados aislados con diferentes genotipos procedentes de la misma región y esto puede ser explicado por las implicaciones que la diversidad genética tenga en el control biológico. Tigano-Milani & Aljanabi (2000) sugieren que es posible especular que genotipos específicos son más efectivos en diferentes etapas de epizootias y que el conjunto de genotipos diferentes son necesarios para generar efectos sinérgicos y por consiguiente llevar un control biológico más eficiente. Los otros cuatro grupos obtenidos provienen de otros países, grupo II y III del continente americano y los grupos IV y

V de los continentes europeo y asiático respectivamente, ordenamiento que se observa claramente en las gráficas del análisis de componentes principales y árbol de tendido mínimo (Figuras 8 y 9).

Los resultados del RAPD-PCR en nuestro estudio mostraron una estrecha relación entre los patrones polimórficos de DNA observados y la procedencia geográfica de los aislados. Esta relación también se ha reportado en otro importante patógeno de mosquitos, *Aschersonia* sp., donde también se demostró una correlación entre los grupos fenéticos y su origen geográfico (Obornik, 1995, Obornik *et al.*, 1999). Existen estudios realizados en hongos patógenos del hombre como *Histoplasma capsulatum* (Reyes *et al.*, 1999) y *Sporothrix schenckii* (Mesa, 2000) donde claramente se observa una relación directa entre los patrones polimórficos de DNA obtenidos y su procedencia geográfica, que son corroborados con un análisis de componentes principales. Lo anterior contrasta con otros análisis genotípicos a través del RAPD-PCR en hongos entomopatógenos, como *Metarhizium* (Driver *et al.*, 2000) y *Beauveria bassiana* (Berretta *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 1999), donde los autores no encontraron relación entre los grupos formados y su distribución geográfica, indicando que los aislados genéticamente similares pueden ser encontrados infectando las mismas especies de insectos hospederos colectados en lugares diferentes. Sin embargo, en el trabajo de Driver *et al.* (2000), que es una revisión taxonómica basada en el análisis de secuencias del DNAr, utilizan un solo iniciador cuando comparan patrones de RAPD-PCR entre los aislados. En comparación, en nuestro trabajo se utilizaron 18 iniciadores los que produjeron un análisis sólido que separa claramente los hongos estudiados en las regiones geográficas de procedencia.

En otro hongo patógeno del hombre, *Coccidioides immitis*, que no tiene estado sexual reportado hasta hoy, y que también exhibe una elevada variabilidad genética, existe evidencia por pruebas moleculares, de recombinación, y de aparente sexo críptico (Burt *et al.*, 1996). Aunque no se conoce la fase sexual de la especie de *P. fumosoroseus* se puede suponer la existencia de algún

mecanismo de recombinación como los observados en otros hongos mitospóricos mencionados anteriormente.

Tigano-Milani *et al.* (1995), Cantone & Vandenberg (1998) y Obornik *et al.* (2000) han demostrado, a través del RAPD-PCR, la variabilidad que existe en diferentes aislados de *P. fumosoroseus*. La diversidad y las cepas distintas genéticamente de este hongo pudieran representar un agregado de especies estrechamente relacionadas como lo sugiere Tigano-Milani *et al.* (1995). Por consiguiente, el grupo I en donde se encuentran la totalidad de los aislados procedentes de México, podrían constituir un nuevo grupo fenético diferente a los encontrados por estos últimos autores.

Los métodos de ordenamiento corroboraron la agrupación resultante de los análisis realizados y muestran de manera gráfica la estrecha relación que guardan los aislados estudiados procedentes de México y la mayor distancia a la cual se encuentran las cepas de referencia.

La característica fenotípica de la virulencia evaluada por medio de la Concentración Letal Media (CL50) en la especie mosquita blanca, *T. vaporariorum*, realizada por Castellanos *et al.* (2001), de los aislados de *P. fumosoroseus* estudiados, presentaron niveles de alta, media y baja actividad enzimática tanto de proteasas como quitinasas. Los aislados con virulencia más elevada fueron EH-506 y EH-518, los aislados de nivel medio EH-519 y EH-504 y los aislados de nivel más bajo, EH-503 y EH-509. Dichos niveles de virulencia no presentaron ninguna relación aparente con los patrones polimórficos de DNA encontrados en los mismos aislados estudiados.

Este tipo de investigaciones aportan información necesaria para apoyar el uso de insecticidas biológicos, que brindan un gran número de beneficios al ambiente, incluyendo seguridad para el ser humano y organismos benéficos, la reducción de residuos de plaguicidas en los alimentos, el incremento de la actividad de enemigos naturales y por ende el aumento de la biodiversidad dentro de los agroecosistemas (Lacey *et al.*, 2001).

11. CONCLUSIONES

- El RAPD-PCR fue un método útil para mostrar la variabilidad genética entre los aislados de *P. fumosoroseus* estudiados.
- EL método del RAPD-PCR permitió agrupar con una alta similitud a las cepas de México con los iniciadores utilizados, mientras que las cepas de referencia mostraron patrones polimórficos diferentes con los mismos iniciadores, incluyéndolas en otros grupos.
- Los patrones polimórficos de los aislados de México obtenidos sugieren un grupo fenético diferente a los ya establecidos para cepas de referencia de otros países.
- La virulencia de los aislados estudiados hasta ahora no presentó ninguna relación con los patrones polimórficos generados por RAPD-PCR, aunque sí con su origen geográfico.
- Se cuenta con el patrón polimórfico de DNA específico para cada uno de los aislados de México estudiados, con los iniciadores utilizados

12. REFERENCIAS

- Altre, J., Vandenberg, J., Cantone, F. 1998. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to Diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed and attachment to cuticle. **J. Invertebr. Pathol.** **73**: 332-338.
- Bellows, T., Fisher, T. 1999. Handbook of Biological Control. Academic Press. New York. pp:87-101.
- Benz, G. 1987. Environment. In "Epizootiology of Insects Diseases" (J.R. Fuxa and Y. Tanada, EDS), pp. 177-203. Wilney, New York.
- Berretta, M.F., Leucona, R.E., Zandomeni, R. O., Grau, O. 1998. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD-PCR with fluorescent labels. 1998. **J. Invertebr. Pathol.** **71**: 145-150.
- Beyrne, D.N., Bellows J.R. 1991. Whitefly Biology. **Ann. Rev. Entomol.** **36**: 431-457.
- Bidochka, M. J., McDonald, M., St. Leger, R., Roberts, D. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Curr. Genet.** **25**: 107-113.
- Bidochka, M., St Leger, R., Stuart, A., Gowanlock, K. 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relation to insect and plant virulence, extracelullar proteases and carbohydrases **Microbiology** **145**: 955-963.
- Bridge, P , Williams, M., Prior, C., Paterson, R. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Gen. Microbiol.** **139**: 1163-1169.
- Burt, A., Carter, D., Koenig, G., White, T., Taylor, J. 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**:770-773.
- Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. 2001. Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential. CABI Publishing. Wallingford, UK.

- Cantone, F., Vandenberg, J. 1998. Intraespecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycol. Res.** **102**: 209-215.
- Castellanos, J., Cruz Camarillo, M.J., Toriello, C. 2001. Selección de aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith con base en los niveles de proteasa y quitinasa. En IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz, Mexico. Sept. 10-14. pp. 10-14.
- Castillo, L.A., Brian, M.W., Wayne, M.B. 1999. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **J. Invertebr. Pathol.** **73**: 269-175.
- Charnley, A., St. Leger, R. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole TG, Hoch CH (Eds.). *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press, New York.
- Clarkson, J. M., Charnley, A. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiol.** **5**: 197-202
- Cock, M. J. W. 1986. *Bemisia tabaci*: A Literature Survey. CAB International Biological Control. Silwood Park.
- DeBach, P., Rosen, D., Kennett, C. 1971. *Biological Control*. Plenum Press. New York. pp.195-194.
- Domsch, K., Gams, W., Anderson, T. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, New York. pp. 529-530.
- Driver, F., Milner, R., Trueman, J. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycol. Res.** **104**: 134-150.
- Efron, B. 1982. *The Jackknife, the Bootstrap and other Resampling Plants*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia.
- Fegan, M., Manners, J., Maclean, D., Irwin, J., Samuels, K., Holdom, D., Li, D. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **J. Gen. Microbiol.** **139**: 2075-2081.

- Ferron, P., Fargues, J., Riba, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. In Handbook of Applied Mycology D.K. Arora, L. Ajello and K.G. Mujerki. (Eds.) Vol 2. Dekker, New York. pp 665-706.
- García, J., Gutiérrez, A. 1998. Impacto de *P. fumosoroseus* contra la mosca blanca *B. tabaci* en Quintana Roo. En XXI Congreso Nacional de Control Biológico SAGAR. Tamaulipas, México. Nov 5-6. pp 189-192.
- García-Juárez, M., Ramírez, C., Rivera, F., Mier, T. 1999. Evaluación en campo de *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Homoptera: Aleyrodidae) en un cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev. Mex. Mic.** 15: 1-9.
- Gerling, D., Horowitz, A. R., Baumgaertner, J. 1986. Autoecology of *B. tabaci*. **Agri. Ecosyst. Environ.** 17: 5-19.
- Gerling, D. 1990. Whiteflies: Their bionomics, pest status and management. Gerling, D. (Ed.). Athenaeum Press. New Castle, UK.
- Glare, T. R., Milner, R. J. 1991. Ecology of Entomopathogenic Fungi. In Handbook of Applied Mycology. D.K. Arora, L. Allejo and K.G. Mujerki, (Eds.). Vol. 2. Dekker, New York. pp. 665-706.
- Goettel, M.S., Inglis, G D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Manual of Techniques in Insect Pathology. Lacey, L.A. (Ed.). Academic Press, New York. pp. 214-249.
<http://www.inegi.gob.mx/>
- Inglis G., Johnson, D., Goettel, M. 1997. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes : Symptomulosporeae) of grasshoppers under field conditions. **Environ. Entomol.** 26: 400-409.
- Joshi, L., St. Leger, R., Roberts, D. 1997. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. **Gene** 197: 1-8.
- Lacey, L., Kirk, A., Hennessey, R. 1993. Foreign exploitation for natural enemies of *Bemisia tabaci* and implementation in integrated control programs in the United States. In: Third International Conference on Agricultural Pests, Association Nationale de Protection des Plantes, Paris. pp 351-360.

- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol.* **46**: 667-702.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vails, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol. Control* **1**:1-19.
- Landa, Z., Osborne, S., Lopez, F., Eyal, J. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomopathogenic fungi on whiteflies. *Biol. Control* **4**: 341-350.
- Maniani, N.K., Fargues, J. 1992. Susceptibility of *Mamestra brassicae* (L.) and *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae (Lep., Noctuidae) to the hyphomycetes *Paecilomyces fumosoroseus* (Brown and Smith) and *Nomuraea rileyi* (Samson) at two temperatures. *J. Appl. Entomol.* **113**:518-524.
- McCoy, C.W., Samson, R., Boucias, D.G. 1988. Entomogenous fungi. In *Handbook of Natural Pesticides*. C.M. Ignoffo, (Ed).CRC Press, Boca Raton. pp 151-236.
- Mesa, A. 2000. Caracterización de aislados clínicos y de la naturaleza de *Sporothrix schenckii* por el polimorfismo del DNA obtenido por amplificación al azar utilizando iniciadores arbitrarios (RAPD-PCR) y su correlación con métodos fenotípicos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Moore, D., Prior, C. 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontr. News Info.* **14**: 31N-40N.
- Nei, M., Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5269-5273.
- Obornik, M. 1995. Molecular characterization and phylogeny of entomopathogenic fungus. Ph. D. Thesis, Department of Plant Sciences, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic
- Obornik, M., Stouthamer, R., Meekes, E., Schilthuizen, M. 1999. Molecular characterization and phylogeny of the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *Plant Protect. Sci.* **35**: 1-9.

- Obornik, M., Marek, K., Lukas, Z. 2000. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. **Can. J. Bot.** **78**: 1150-1155.
- Ortega, A. L. 1991. Mosquitas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) vectores de virus en hortalizas. En: Plagas de Hortalizas y su manejo en México. Amaya, S., Bautista, N (Eds.). Centro de Entomología y Acarología, Sociedad Mexicana de Entomología.
- Ortiz, M., Alatorre, R., Osada, S., Aceves, L. 1995. Requerimientos térmicos para el desarrollo de cepas de tres especies de hongos patógenos a mosquita blanca. En XVIII Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Chiapas, México. Nov 9-10. pp. 74-76.
- Ortiz, M., Alatorre, R. 1998. Efectividad biológica de hongos contra mosquita *Trialeurodes vaporariorum* West. (Homoptera: Aleyrodidae). En XXI Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Tamaulipas, Mexico. Nov 9-10. pp. 196-198.
- Osborne, L., Landa, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. **Fla. Entomol.** **75**: 456-471.
- Pineda-Guillermo, S., Alatorre-Rosas, R. 1995. Potencialidad de los hongos entomopatógenos *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beaveria bassiana* sobre la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum*. En: XVIII Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico Chiapas, México. Nov 9-10. pp. 77-78.
- Ramírez, J. 1996. Manejo integrado de la mosquita blanca de la hoja plateada. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agronomía, Culiacán, Sinaloa. México.
- Real, R., Vargas, J.M. 1996. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. **Syst. Biol.** **45**: 380-385.
- Reyes, M.R., Bobadilla, M., Martínez, M.A., Rodríguez, G., Maravilla, E., Sifuentes J., Taylor, M.L. 1999. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by

- using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patients. **J. Clin. Microbiol** **37**:1404-1408
- Rholf, F. 1993. NTSYS-pc v 2.0. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Applied Biostatistics. Setuket, New York.
- Riba, G., Ravelojoana, A.M. 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. **Can. J. Microbiol.** **30**: 922-926.
- Romero, M. 1995. Aspectos biológicos de la mosquita blanca. En: Fitófilo, Desafíos Fitosanitarios: Mosquita Blanca. SAGARPA, México. pp. 11-23.
- Ruiz, V., Ibarra, J., Perez, P. 1995. Bioensayos con hongos entomopatógenos de mosquita blanca a distintas humedades relativas En: XVIII Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Chiapas Nov 9-10. pp. 72-74.
- Salguero, R. 1994. Análisis del complejo mosca blanca-virosis en tomate. In Biología y Manejo del Complejo Mosca Blanca-Virosis. Mata, M., Dardón, D., Salguero, V. (Eds.). Antigua, Guatemala. pp. 16-22.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. 1973. Taxonomic Structure. In: Numerical taxonomy. WH Freeman, San Francisco. pp. 188-305.
- Sobral, B. W. S., Honeycutt, R. J. 1993. Genetics, Plants and the Polymerase Chain Reaction. In The Polymerase Chain Reaction. Mullis, K.B., Ferre, F., Gibbs, R. A. (Eds.). Birkhauser, Boston. pp. 304-320.
- Spillari, A. 1994. Problemática del complejo mosquita blanca-virus en algodón en Centroamérica. En: Biología y Manejo del Complejo Mosquita Blanca-Virosis. Mata, M., Dardón, D., Salguero, V. (Eds.). Antigua, Guatemala. pp. 23-38.
- Strauss, R. E. 1982. Statistical significance of species cluster in association analysis. **Ecology** **63**: 634-639.
- St. Leger, R., Frank, J., Roberts, D., Staples, R. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Biochem. Biophys.** **313**:1-7.

- St. Leger, R. 1993. Biology and mechanisms of invasion of deuteromycete fungal pathogens. **Parasites Pathogens Insects 2**: 211-229.
- St. Leger, R., Joshy, L., Bidochka, M., Roberts, D. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide over-expressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93**: 6349-6354.
- St. Leger, R., Joshy, L. 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. New York. pp: 367-393.
- Strongman, D , MacKay, R. 1993. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicola* var. *cornuta* using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Mycologia 85**: 65-70.
- Taylor, J., Jacobson, D., Kroken, S , Kasuga, T., Geiser, D., Hibbet, D., Fisher, M. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fung. Genet. Biol. 31**: 21-32.
- Tigano-Milani, M., Honeycutt, R., Lacey, L., McClelland, M., Sobral, B. 1995. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. **J. Invertebr. Pathol. 65**: 274-282.
- Tigano-Milani, M., Aljanabi, S. 2000. RAPD analysis of *Nomuraea rileyi*. **J. Invertebr. Pathol. 75**: 240-242.
- Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. **J. Invertebr. Pathol. 70** : 18-26.
- Yañez, M. 1990. La mosquita blanca. Agromundo, Sepomex, México. pp. 14-22

Anexo 1. Análisis estadístico de la selección de cultivos monospóricos

Aislado	CONIDIOS	VELOCIDAD	ESPOR.
	µm	mm/día	conidios-ml
EH507			
ORIGINAL	5.129	0.46	4.10E+04
Cultivos monospóricos			
1	5.129	0.259	4.86E+08
2	4.974	0.333	2.23E+07
3	5.102	0.388	4.47E+08
4	5.13	0.289	2.30E+07
6	5.257	0.367	3.70E+06
8	5.386	0.189	8.55E+08
9	5.327	0.285	4.75E+07
10	4.974	0.23	9.00E+08
11	4.848	0.351	4.75E+07
12	5.221	0.181	8.94E+07
13	4.874	0.185	4.75E+07
14	5.386	0.433	4.00E+07
15	5.002	0.363	4.00E+07
PROMEDIO	5.128	0.308	2.10E+08
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.04$	Si $P<0.01$ $P=3.38E-8$	Si $P<0.01$ $P=0.09$

EH503			
Original	5.386	0.267	5.42E+09
Cultivos monospóricos			
2	5.386	0.442	6.65E+09
3	5.388	0.383	7.50E+09
4	5.386	0.15	6.52E+09
5	5.642	0.292	5.82E+08
6	5.386	0.1	6.10E+09
7	5.514	0.117	6.20E+09
8	5.026	0.258	5.93E+08
9	6.026	0.308	6.40E+09

10	5.59	0.108	5.30E+08
11	5.642	0.333	6.34E+09
12	5.13	0.325	5.75E+09
13	5.514	0.425	6.62E+09
PROMEDIO	5.463	0.27	3.85E+08
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.28$	Si $P<0.01$ $P=0.000000751$	Si $P<0.01$ $P=0.000000494$
<hr/>			
EH506			
Original	5.514	0.44	4.30E+07
Cultivos monospóricos			
1	5.002	0.408	2.89E+07
2	6.026	0.416	3.23E+07
3	5.898	0.433	5.14E+07
4	5.514	0.358	1.00E+07
5	6.026	0.25	1.17E+07
PROMEDIO	5.66	0.38	1.17E+07
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.28$	Si $P<0.01$ $P=0.001$	Si $P<0.01$ $P=0.00022$
<hr/>			
EH516			
Original	5.642	0.265	2.50E+08
Cultivos monospóricos			
1	4.95	0.255	2.50E+08
2	5.258	0.289	2.90E+07
3	5.026	0.193	1.30E+08
4	4.255	0.211	2.70E+08
5	5.13	0.157	2.90E+08
6	5.078	0.259	7.30E+08
7	5.13	0.155	3.00E+07
8	4.922	0.155	1.30E+08
PROMEDIO	5.043	0.211	2.34E+08
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.45$	Si $P<0.01$ $P=0.005$	No $P>0.01$ $P=0.011$
<hr/>			
EH508			
Original	5.13	0.361	1.85E+08

Cultivos monospóricos

1	5.13	0.322	7.65E+08
2	4.95	0.262	9.35E+06
3	5.002	0.389	5.67E+06
4	4.36	0.377	2.12E+08
5	5.13	0.377	7.07E+07
PROMEDIO	4.95	0.341	2.08E+08
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.91$	Si $P<0.01$ $P=0.006$	No $P>0.01$ $P=0.011$

EH505

Original	5.258	0.23	1.05E+10
Cultivos monospóricos			
1	5.258	0.261	1.50E+08
2	5.13	0.203	1.80E+08
3	4.362	0.22	4.10E+07
4	4.234	0.185	5.20E+06
5	5.13	0.164	9.50E+07
6	5.13	0.177	3.90E+07
8	5.13	0.201	1.00E+07
9	4.106	0.198	5.00E+06
10	5.13	0.195	5.50E+06
PROMEDIO	4.89	0.203	6.08E+07
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.88$	Si $P<0.01$ $P=0.003$	No $P>0.01$ $P=0.04$

EH518

Original	5.256	0.182	2.00E+08
Cultivos monospóricos			
1	5.256	0.167	1.96E+08
2	4.487	0.183	5.85E+07
4	4.359	0.211	2.35E+08
5	5.128	0.196	1.25E+08
6	4.473	0.213	2.56E+08
PROMEDIO	4.87	0.192	1.78E+08
	Significancia	Significancia	Significancia

	No $P=0.31$	Si $P<0.01$ $P=0.001$	Si $P<0.01$ $P=0.0001$
<hr/>			
EH513			
Original	4.358	0.136	2.25E+06
Cultivos monospóricos			
1	4.998	0.13	1.43E+08
2	4.487	0.207	6.25E+06
3	3.847	0.216	5.35E+06
4	4.645	0.197	5.15E+06
PROMEDIO	4.46	0.177	3.24E+07
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.31$	Si $P<0.01$ $P=0.004$	No $P>0.01$ $P=0.27$
<hr/>			
EH504			
Original	4.315	0.154	5.28E+08
Cultivos monospóricos			
1	3.974	0.217	5.28E+08
2	4.249	0.222	1.03E+08
3	5.384	0.134	6.67E+07
4	4.871	0.097	1.22E+09
5	4.871	0.096	8.65E+09
6	4.146	0.191	3.83E+09
7	3.846	0.162	5.97E+08
8	3.846	0.174	6.47E+09
PROMEDIO	4.938	0.181	2.44E+09
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.52$	Si $P<0.01$ $P=0.0000718$	Si $P<0.01$ $P=0.03$
<hr/>			
EH509			
Original	4.615	0.173	4.50E+05
Cultivos monospóricos			
1	3.769	0.169	1.47E+05
2	4.102	0.209	1.25E+05
3	4.666	0.276	5.00E+05
4	4.743	0.074	6.00E+05
5	4.487	0.173	7.50E+05
6	3.974	0.213	5.00E+05

7	4.23	0.192	5.00E+05
8	4.1	0.113	8.00E+06
PROMEDIO	4.298	0.177	1.29E+06
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.45$	Si $P<0.01 P=0.0000744$	No $P>0.01 P=0.146$
<hr/>			
EH520			
Original	4.743	0.207	5.00E+06
Cultivos monospóricos			
1	4.999	0.207	2.50E+06
2	4.872	0.219	2.50E+06
3	4.799	0.252	2.50E+06
4	4.743	0.219	2.40E+06
5	4.872	0.239	2.45E+06
6	4.999	0.218	2.50E+06
PROMEDIO	4.861	0.223	3.97E+06
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.31$	Si $P<0.01 P=0.0005$	Si $P<0.01 P=0.00000453$
<hr/>			
EH519			
Original	5.206	0.14	1.00E+09
Cultivos monospóricos			
1	4.49	0.17	1.20E+09
2	5.258	0.171	9.20E+09
3	5.13	0.148	2.22E+08
4	4.746	0.166	5.86E+08
5	4.618	0.17	1.75E+07
6	4.746	0.144	1.45E+07
PROMEDIO	4.884	1.58	4.47E+08
	Significancia	Significancia	Significancia
	No $P=0.31$	Si $P<0.01 P=0.0005$	No $P>0.01 P=0.03$
<hr/>			
EH511			
Original	4.745	0.172	1.50E+08
Cultivos monospóricos			
1	4.49	0.198	1.90E+08
2	5.002	0.186	1.30E+08

3	3.8545	0.119	2.40E+08
5	5.258	0.165	8.50E+06
PROMEDIO	4.67	0.14	1.19E+08
	Significancia	Significancia	
	No $P=0.87$	Si $P<0.01$ $P=0.003$	Si $P<0.01$ $P=0.005$
<hr/>			
EH517			
Original	5.586	0.318	1.97E+10
Cultivos monospóricos		Significancia	
1	5.001	0.26	4.07E+09
2	4.973	0.226	1.11E+08
6	5.001	0.26	4.07E+09
7	5.001	0.263	3.92E+09
8	5.28	0.24	1.60E+08
9	5.18	0.248	3.04E+08
10	5.307	0.167	2.30E+08
12	5.102	0.26	4.07E+09
PROMEDIO	5.159	0.26	4.07E+09
	No $P=0.22$	Si $P<0.01$ $P=0.0006$	No $P>0.01$ $P=0.22$

Anexo 2. Matriz de presencia/ausencia en todos los aislados y cepas de referencia de *P. fumosoroseus*

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
5	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
9	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
13	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
14	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
19	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
21	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
25	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
26	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1

68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
69	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
70	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
72	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
76	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
77	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
78	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
79	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1
80	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
81	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
82	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	0	0	0	0	
83	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
84	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
85	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
86	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
87	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
88	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
89	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
90	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
91	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
92	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
93	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
94	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
95	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
96	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
97	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
98	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
99	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
100	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	
101	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
102	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

ESTA TRISIS NO SALE
DE LA BINT 100 201

