



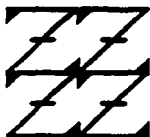
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Análisis de la diversidad genética de levaduras aisladas del mesenterón del tracto digestivo y de excremento de diferentes especies del género *Dendroctonus* Erichson

(Coleoptera: Scolytidae) por medio de RAPD-PCR.

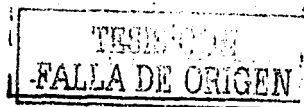
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
María Angélica Valencia Acevedo



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

Director de Tesis.
M. en C. Gerardo Zúñiga Bermúdez.

MEXICO, D. F.



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.

PAGINACION DISCONTINUA

Agradecimientos:

A mis sinodales:

Dr. Arcadio Monroy Ata

Dr. Alberto Monroy Garcia

M. en C. Gerardo Zúñiga Bermúdez

Biól. Magdalena Ordóñez Resendíz

Dr Mario Altamirano Lozano

Por sus valiosas sugerencias y recomendaciones.

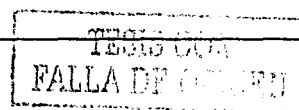
Ala Dra. Lourdes Villa Tanaca y al Dr. Cesar H. Hernández Rodríguez por permitirme realizar el trabajo experimental en su laboratorio.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Índice	i
Figuras	ii
Cuadros	iii
Resumen	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1 Taxonomía y distribución de <i>Dendroctonus spp.</i>	1
I. 2 Diagnósis	1
I. 3 Ecología y biología	3
I. 4 Comunicación en Insectos descortezadores	5
I. 5 Producción de feromonas en <i>Dendroctonus spp.</i>	6
I. 6 Asociación microorganismos-Insectos descortezadores	8
I. 7 Genética evolutiva	11
II. JUSTIFICACIÓN	14
III. OBJETIVOS	15
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	16
IV. 1 Origen de las muestras	16
IV. 2 Aislamiento de las levaduras del mesenterón	16
IV. 3 Aislamiento de las levaduras del excremento	19

IV. 4 Purificación y conservación de levaduras	19
IV. 5 Determinación taxonómica de las levaduras	20
IV. 5.1 Sistema de identificación API 32 C	20
IV. 5.2 Pruebas morfológicas	20
IV.5.2.1 Tubo germinal	20
IV.5.2.2 Formación de clamidoconidias	20
IV.5.2.3 Crecimiento en placas Dalmau	21
IV.5.2.4 Crecimiento en agar extracto de malta al 5%.....	21
IV.5.2.5 Crecimiento a presión osmótica alta	21
IV.5.2.6 Crecimiento en medio libre de vitaminas	21
IV.5.2.7 Crecimiento a diferentes temperaturas	22
IV.5.2.7 Formación de almidón	22
IV.5.3 Pruebas bioquímicas	22
IV.5.3.1 Fermentación de azúcares	22
IV.5.3.2 Asimilación de azúcares	22
IV. 6. Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)	23
IV. 6. 1 Extracción de DNA	23
IV. 6. 2 Cuantificación de DNA	23

IV. 6. 3 Calidad de DNA	24
IV. 6. 4 Amplificación de DNA	24
IV. 6. 5 Electroforesis de los productos de amplificación.....	25
IV. 7 Análisis de los datos	25
V. RESULTADOS	28
V. 1 Determinación taxonómica de los aislados	28
V. 1. 1 Pruebas morfológicas y bioquímicas	28
V. 1. 2 Análisis de datos morfológicos y bioquímicos	29
V. 2 Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)	38
V. 2. 1 Determinación de la concentración de DNA	38
V. 2. 2 Patrones de bandas	38
V. 2. 3 Análisis de datos RAPD	38
V. 2. 4 Diversidad genética	48
V. 2. 5 Divergencia nucleotídica	49
V. 2. 6 Diversidad nucleotídica	50
VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS	54
VI. 1 Determinación taxonómica	54
VI. 2 Diversidad genética	56



VI. 3 Regionalización	60
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. SUGERENCIAS	63
IX. LITERATURA CITADA	64
X. APÉNDICE	73
X. 1 Matriz de presencia (1) ausencia (0) de datos bioquímicos	73
X. 2 Matriz de presencia (1) ausencia (0) de datos RAPD-PCR.....	75
X. 3 Matriz de similitud de datos bioquímicos	79
X. 4 Matriz de similitud de datos RAPD-PCR	81

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURAS

1. Nomenclatura del aspecto dorsal de <i>Dendroctonus spp.</i>	2
2. Galerías construidas por algunos géneros de <i>Dendroctonus spp.</i>	17
3. Tracto digestivo de <i>Dendroctonus spp.</i>	17
4. Dendrograma construido a partir de datos bioquímicos	37
5. Patrones RAPD-PCR con el iniciador OPE-18	41
6. Patrones RAPD-PCR con el iniciador OPE-18	42
7. Patrones RAPD-PCR con el iniciador OPE-18	43
8. Patrones RAPD-PCR con el iniciador OPE-18	44
9. Dendrograma construido a partir de datos RAPD-PCR.....	46
10. Dendrograma construido a partir de la combinación de datos bioquímicos y RAPD-PCR.	47

CUADROS

1. Origen de las cepas de trabajo	18
2. Determinación taxonómica de los aislados por el sistema API ..	31
3. Pruebas morfológicas de los aislados	33
4. Pruebas bioquímicas de los aislados	35
5. Concentración de DNA en los aislados	40
6. Bandas desplegadas por cada iniciador	45
7. Diversidad genética de cepas empleadas	51
8. Diversidad genética por iniciador	52
9. Divergencia nucleotídica	53
10. Diversidad nucleotídica	53

Los escarabajos descortezadores de la familia Scolytidae mantienen una simbiosis estrecha con microorganismos que habitan en el tubo digestivo, los cuales favorecen el proceso de degradación de la celulosa y participan en la producción de feromonas.

A partir del mesenterón y excremento de *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens* provenientes de México y los Estados Unidos de América, se aislaron 59 cepas de levaduras. La determinación taxonómica de los aislados se basó en pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares. Los datos fenotípicos y los derivados de la técnica molecular (RAPD-PCR) fueron codificados independientemente como datos binarios de presencia/ausencia. Con estos datos se construyó una matriz de similitud genética pareada basada en el coeficiente de Jaccard. Con la matriz de similitud se construyó un dendrograma utilizando el método de agrupación UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages). Los árboles fueron valorados estadísticamente a través del coeficiente de correlación cofenético y la prueba del mejor corte de Strauss. Asimismo con los datos RAPD-PCR se analizó la diversidad genética mediante el índice de Shannon

El mejor punto de corte de los árboles originó tres grupos con las pruebas bioquímica (0.78) y cinco con los datos RAPD (0.25). El coeficiente de correlación cofenético, fue más alto con datos RAPD ($r = 0.99907$, $P = 0.0004$) que con datos bioquímicos ($r = 0.87384$, $P = 0.0004$). En el dendrograma construido con la combinación de datos RAPD y bioquímicos se observaron 5 grupos, distribuidos de la misma manera que en el dendrograma construido a partir solamente de datos RAPD, con un valor de r y P semejantes, lo que sugiere que la relación genética de las cepas es consistente, es decir, que los aislados del mesenterón y del excremento se asocian entre ellos y forman grupos diferentes.

La combinación de pruebas fisiológicas y moleculares en este estudio no resolvieron de una manera clara las especies de levaduras con que se trabajó ya que el perfil de los aislados fue diferente al de las especies ya descritas en la literatura; además estos microorganismos no están reportados en la literatura taxonómica por lo que no se cuenta con cepas de referencia con quien comparar.

Los valores de diversidad genética promedio para los cinco grupos del dendrograma oscilaron entre 0.1965 y 0.3447. Los aislados de este estudio presentan valores de diversidad más bajos que las cepas de levaduras de interés clínico.

Los grupos de levaduras que se forman en este estudio muestran, aparentemente, una relación con su origen biológico y geográfico, es decir, las cepas que provienen del mesenterón y excremento del mismo insecto y de insectos de la misma localidad se agrupan entre ellos

TESIS CON
SALA DE OFICIN

1. INTRODUCCIÓN

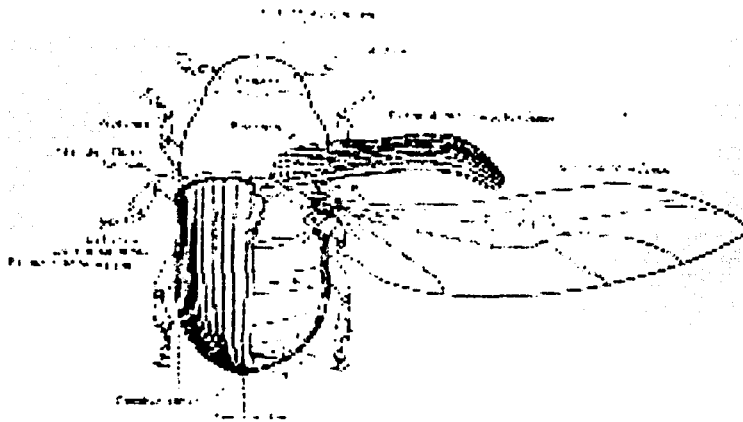
1.1 Taxonomía y distribución de *Dendroctonus* spp.

Los coleópteros son uno de los grupos más exitosos de la clase Insecta por su antigüedad, abundancia y diversidad de especies. En este orden están contenidos los escolítidos una de las 40 familias más importantes del mundo debido a que incluyen a insectos que se alimentan de la región subcortical de los árboles y pueden ser descortezadores, "ambrosiales" o del "timber" (Perusquía 1978; Stark 1982; Cibrián-Tovar y col. 1995). Los insectos descortezadores se han diversificado asociados a los bosques de coníferas (Fam. Pinaceae), dentro de ellos destacan las especies del género *Dendroctonus* cuya enorme importancia radica en las pérdidas económicas que ocasionan al sector forestal y el impacto ecológico que conlleva su control.

El género *Dendroctonus* incluye 19 especies, 17 localizadas en Norte y Centroamérica y sólo dos se encuentran en Europa y Asia (Wood 1982). En México se han registrado 12 especies, de las cuales *D. mexicanus*, *D. frontalis*, *D. rhizophagus* y *D. adjunctus* son las más importantes por los daños que causan a los bosques de pino (Perusquía 1978; Cibrián-Tovar y col. 1995).

1.2 Diagnósis

Las especies de este género se caracterizan porque el tamaño de su cuerpo es variable, ya que su longitud varía de los 2.5 hasta 9.0 mm. El color del cuerpo va desde un tono café rojizo hasta negro. La frente es convexa y en algunas especies puede llevar ornamentaciones o tubérculos. Los ojos son ovales y enteros. Las antenas son geniculadas (acodadas) y tienen un segmento basal alargado (escapo), conectado a una serie de segmentos cortos (funículo) que se adhiere a una estructura muy peculiar en forma de mazo. La cabeza es visible desde la



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1 Nomenclatura del aspecto dorsal de *Dendroctonus spp.*

vista dorsal. Los élitros son el primer par de alas modificadas y cubren el abdomen, en algunos organismos el extremo distal de los élitros denominado declive elitral es convexo y en otros es cóncavo con varias espinas peculiares que representan características útiles para separarlos a nivel de especie (Figura 1) (Coulson 1980; Wood 1982; Cibrian-Tovar y col.1995).

1.3 Ecología y biología

El ciclo de vida de las especies del género *Dendroctonus* se lleva a cabo, a excepción de un periodo corto de vuelo, debajo de la corteza de árboles vivos en vías de morir o en tocones de especies de los géneros *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga* y *Larix* (Wood 1963; Atkinson y Martínez 1985; Cibrián-Tovar y col. 1995).

Para localizar a sus huéspedes, las especies se guían en primera instancia a través de estímulos químicos y visuales (Borden 1982). Inicialmente las hembras son las que seleccionan al huésped, en el cual practican orificios de entrada en la corteza hasta llegar al floema. Si el árbol es vigoroso puede rechazar a los insectos e incluso ahogarlos en la resina que expulsa como resultado de la horadación del insecto, por el contrario, si no hay una defensa apropiada por parte del árbol, las hembras inician la emisión de feromonas de agregación para atraer a los machos y a otras hembras al árbol escogido, dando como resultado un ataque en masa (Atkinson y Martínez 1985; Cibrián-Tovar y col. 1995). Al arribar los machos y alcanzar a las hembras en el interior de las galerías, se produce la cópula y poco después la hembra inicia la oviposición, para lo cual la pareja avanza entre el cambium y el floema construyendo las galerías hacia arriba o hacia abajo a lo largo del fuste del árbol. Los huevos permanecen en los nichos de oviposición entre 5 y 19 días. Después de este lapso eclosionan las larvas, las cuales se desplazan por túneles que ellas mismas realizan. Todo el estado larval requiere de 30 a 55

días para su desarrollo completo. El estado de pupa puede durar entre 10 y 14 días, después de este tiempo se alcanza el estado adulto, el cual en un principio son de color café claro y conforme pasan los días se tornan más oscuros, a estos adultos se les denomina preimagos. Una vez que los adultos alcanzan la madurez están en condiciones de salir del huésped, sin embargo, deben esperar condiciones ambientales favorables para volar en busca de otros árboles.

Los factores ambientales que afectan el ciclo de vida de estos insectos son la temperatura, latitud, altitud, luz, humedad y presión atmosférica (Flores y Enkerlin 1978; Cibrián-Tovar y col. 1995). Así por ejemplo, una humedad relativa baja (50 y 60%) y temperatura templada del ambiente 20 a 22°C favorecen el desarrollo de los insectos. (Alatorre 1978; Flores y Enkerlin 1978).

Un aspecto importante del ciclo de vida de estos insectos es la asociación que establecen con hongos que transportan en una estructura llamada micangio, los cuales participan en la degradación de la madera. En este sentido, las esporas del hongo son introducidas al árbol cuando los insectos penetran al mismo, ahí las esporas encuentran un ambiente propicio para la germinación y crecimiento de sus hifas. El hongo destruye a las células del cambium que rodea a las galerías, impidiendo el flujo de resina que mataría al insecto, además produce alteraciones bioquímicas en la madera que la hace propicia para la alimentación de estos insectos (Barras 1967; Whitney 1982; Liuter y col. 1989; Cibrián-Tovar y col. 1995; Moser y col. 1995). Además de transmitir a este tipo de hongos, estos escolítidos poseen en su tracto digestivo microorganismos simbiotes tales como levaduras y bacterias que coexisten en asociaciones muy complejas con ellos y al parecer juegan un papel importante en la

degradación de la celulosa y en la síntesis de feromonas (Callaham y Shifrine 1960).

1.4 Comunicación de los Insectos descortezadores

Las feromonas son elementos fundamentales en la comunicación química de estos insectos y son producidas por los individuos colonizadores a partir de compuestos volátiles (procursores) emitidos por los árboles.

Los compuestos volátiles que producen los huéspedes son conocidos como alomonas o kairomonas (Brown y col. 1970), las cuales son mensajeros interespecíficos entre los huéspedes y los insectos; su acción en condiciones naturales resulta en un beneficio adaptativo para ambos ya que los insectos reconocen y parasitan los árboles maduros y susceptibles los cuales al morir dan paso al establecimiento de organismos jóvenes. Entre las kairomonas descritas se encuentran el α -pineno, el mirceno, la terpinolina, mezclas de terpenos, el camfeno y el etanol (Coster 1970; Brand y col. 1976; Borden 1982).

Las feromonas son compuestos químicos que inducen respuestas fisiológicas en miembros de la misma especie (Borden 1982). La importancia de la comunicación mediada por feromonas se ve reflejada cuando un árbol sano y vigoroso es vencido por el ataque coordinado de los escarabajos. Las feromonas son compuestos volátiles formados por alcoholes secundarios o acetales bicíclicos. Muchos alcoholes secundarios parecen derivarse de monoterpenos producidos por el propio árbol, mientras que los cetales y acetales son de origen biosintético desconocido en un gran número de especies (Varnderwel y Oehlschlager 1989).

Entre las especies del género *Dendroctonus*, las feromonas de agregación permiten que individuos de ambos sexos se concentren en el huésped, mientras que las de antiagregación

regulan la densidad de la población en el árbol seleccionado; las feromonas de esparcimiento inducen la perforación sincronizada en el mismo (Varnderwel y Oehlschlager 1989). En este sentido, las feromonas más conocidas para el género son: la frontalina, la exo y endobrevicomina, la cis y trans-verbenol, la vervenona, el mirtenol, 1-heptanol, 2-heptanol, seudenol, trans-pentanol, 3, 2 MCH, metil heptanona y el 1-feniletanol (Coster 1970; Brand y col. 1976; Borden 1982).

1.5 Producción de feromonas en *Dendroctonus spp.*

A pesar de la enorme importancia que tienen las feromonas en la comunicación química de los escolítidos y en la interacción con sus huéspedes, no se ha podido establecer el sitio donde se producen las feromonas de estos escarabajos. En este sentido, se han propuesto varias teorías que intentan explicar su síntesis. La primera de ellas establece que es necesario que el insecto inhale los vapores monoterpénicos del huésped vía el sistema traqueal, los cuales viajan a través de la hemolinfa y se depositan en los túbulos de Malphigi, de donde pasan a la región del proctodeo para ser expulsados con el excremento (frass). La detección de alcoholes terpenoides en la hemolinfa de *D. valens* y *D. ponderosae* después de haber sido expuestos a vapores de monoterpenos sustenta esta hipótesis y conduce a pensar que los vapores son convertidos a feromonas en la hemolinfa o en alguna región del tracto digestivo (Zethner-Moller y Rudisky 1967; Brand y col. 1977; Borden 1982).

La segunda teoría sostiene que la alimentación es un prerequisite para la producción de feromonas y que el tubo digestivo es el sitio donde se sintetizan (Borden 1982). Esta teoría asume que la ingestión de los precursores a través de la alimentación del insecto, estimula la

actividad secretora de células especializadas y la síntesis de feromonas por medio de rutas metabólicas específicas (Zethner-Moller y Rudisky 1967; Brand y col 1977; Borden 1982; Varnderwel y Oehlschlager 1989; Moser y col. 1995).

La tercer teoría se refiere al hecho de que no es necesario que el escarabajo adquiera los precursores a través de la inhalación o alimentación, es decir, postula que la biosíntesis de feromonas ocurre *de novo* como resultado de la degradación de los músculos de las alas. La evidencia de esta teoría se sustenta en estudios llevados a cabo con especies del género *Ips*, a través de la incorporación de acetato marcado con carbono catorce (^{14}C) en la ruta del maleonato, la presencia de compuestos feromonales como el ipsdienol en la región del tórax del insecto sugieren este tipo de síntesis (Seybold y col. 1995).

La cuarta teoría establece que algunos de los microorganismos simbios, fundamentalmente levaduras y bacterias, están involucrados en la producción o degradación de compuestos químicos, los cuales aparentemente pueden estar relacionados o integrados al sistema de comunicación química de estos insectos. En este sentido, se ha observado que estos microorganismos pueden participar en la producción de feromonas. Por ejemplo, se ha demostrado que la bacteria *Bacillus cereus* aislada del descortezador *Ips paraconfusus* convierte α -pineno a trans-verbenol o cis-verbenol (Brand y col. 1975), algunas levaduras aisladas del excremento del descortezador *I. typographus* convierten cis y trans-verbenol a verbenona (Leufvén y col. 1988), y el hongo del micangio de *Dendroctonus frontalis*, *Ceratocystis sp*, transforma trans-verbenol a verbenona (Brand y col. 1976).

Asimismo, también se ha demostrado por medio de bioensayos en el laboratorio, que las levaduras *Pichia pinus* y *Hansenula holstii* aisladas de *D. fontalis* son capaces de producir

compuestos volátiles como el alcohol isoamílico, acetato isoamílico, 2-feniletanol y 2-feniletilacetato (Brand y col. 1977), así como *Candida molischiana* y *H. capsulata* aisladas a partir de un macerado del tubo digestivo de individuos colonizadores de la especie *I. typographus* convierten el cis-verbenol a verbenona y que *C. nitrotophila* convierte el cis-verbenol a trans-verbenol (Leufvén y col. 1984).

Otros autores han descrito el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de la especie *D. terebrans*, así como poblaciones importantes de *Enterobacter agglomerans* y *E. spp.* (Bridges 1981), cuyo papel en la degradación de celulosa o síntesis de feromonas es incierto.

1.6 Asociación microorganismos – Insectos descortezadores.

Los trabajos anteriores resaltan la importancia de la relación simbiótica entre microorganismos e insectos descortezadores como degradadores de celulosa y en la síntesis de feromonas. Esta relación se ha manifestado en numerosos trabajos, ya que sólo para escolítidos se han reportado en Norteamérica más de 100 especies de microorganismos asociados, los cuales pueden cumplir diversas funciones en las distintas etapas de desarrollo de estos insectos (Lu y col. 1957; Callaham y Shifrine 1960; Whitney 1982; Bridges y col. 1984; Kurtzman 2000).

De manera particular, en los géneros *Ips*, *Scolytus* y *Dendroctonus* se ha documentado la presencia de especies de levaduras de los géneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Pichia* (Shifrine y Phaff 1956; Lu y col. 1957; Callaham y Shifrine 1960; Burges y col. 1979), así como de las bacterias *Bacillus cereus* (Brand y col. 1975), *Enterobacter agglomerans* y otras de este género no determinadas (Bridges 1981).

Un caso que ilustra la diversidad de microorganismos que pueden estar asociados con una especie es el realizado con *D. frontalis*, donde de sus galerías se aislaron 8 especies de bacterias y 23 tipos de levaduras entre las que se encuentran *Candida tenuis*, *C. silvanorum*, *C. rugosa*, *C. valida*, *C. quercuum*, *C. terebra*, *C. humicola*, *C. lusitaniae*, *Pichia pinus*, *P. toletana*, *P. bovis*, *P. nonfermentans*, *Hansenula capsulata*, *H. polymorpha*, *H. philodendra*, *H. holstii*, *H. henricii* y *Saccharomyces bisporus* y *S. rouxii* (Bridges y col. 1984).

Sin embargo, dos problemas fundamentales de tipo metodológico están asociados con los estudios anteriores. El primero de ellos tiene que ver con los métodos de aislamiento de los microorganismos, ya que con respecto a los aislados obtenidos del intestino no se describen si se obtuvieron del intestino completo o de alguna región en particular de éste, y en relación a los obtenidos del excremento, éste es tomado directamente de los árboles donde comunidades completas de insectos, levaduras, hongos y bacterias coexisten. Además, no se aclara si el huésped es maduro o juvenil, lo cual es importante porque una galería reciente sólo es construida por organismos de una sola especie y a medida que el árbol muere es ocupado por otras especies.

En otros trabajos, los aislados han sido obtenidos del macerado total de un insecto, lo cual tampoco es adecuado ya que éste puede acarrear exosimbiontes u otros microorganismos que estén adheridos a su cuerpo.

Por lo anterior, no se puede garantizar que todos los microorganismos aislados sean simbioses intestinales; por ello es importante en primera instancia, contar con metodologías que garanticen el aislamiento de estos microorganismos de regiones específicas del tracto

digestivo. En la actualidad, el desarrollo de técnicas para el cultivo primario de células del intestino de estos insectos permiten aislar con cierto margen de seguridad, sin contaminación, a las levaduras alojadas en partes específicas del tracto digestivo de los insectos.

El segundo problema involucra a los métodos de caracterización y determinación taxonómica de los microorganismos, ya que estos trabajos se basan en caracteres fenotípicos, como son las características morfológicas de los estados vegetativos y sexuales, así como en pruebas bioquímicas; sin embargo, estas arrojan frecuentemente resultados variables que hacen difícil su determinación.

El hecho de que muchas especies de esta microflora sean desconocidas para la ciencia, ha conducido a diferentes investigadores a utilizar pruebas moleculares con la intención de contar con nuevos caracteres que ayuden a su determinación (Peterson y Kurtzman 1991; Kurtzman y Robnett 1991, 1995, 1997, 1998). Así por ejemplo, el género *Pichia* incluye a más de 100 especies determinadas por pruebas fisiológicas (Kurtzman y Robnett 1998), las cuales hoy en día a través del análisis de secuencias parciales del 18s y 26s del rRNA las han segregado a otros géneros, tales como el género *Ogataea* (Yamada y col. 1995). Estos resultados sugieren que las técnicas moleculares aparentemente son más precisas en la determinación de las especies, sin embargo, resultados distintos se han presentado cuando se analizaron otros marcadores moleculares como los dominios 1 y 2 del 26s del rDNA (Kurtzman 2000). La razón de esto es que los marcadores moleculares tienen diferentes tasas de cambio, algunos son neutrales a la acción de la selección natural y otros tienen presiones de selección fuertes cuya expresión depende del ambiente donde se desarrollan las levaduras.

No obstante, una vez cumplidos los dos requerimientos anteriores, es posible llevar a cabo diferentes estudios con estas especies de microorganismos, los que pueden ir desde analizar su papel en la producción de feromonas hasta llevar a cabo estudios de genética evolutiva, como es el caso del presente estudio.

1.7 Genética evolutiva

La genética evolutiva en este sentido se ha constituido en el cuerpo teórico fundamental y más importante de la biología evolutiva, ya que a partir de ella se han generado diferentes modelos que permiten explicar y poner a prueba muchas de las hipótesis producidas en esta disciplina. Asimismo, la genética evolutiva a través de sus modelos teóricos y sus diferentes metodologías incide fuertemente en el campo de la taxonomía, ya que permite coadyuvar al esclarecimiento del estado taxonómico de diferentes grupos, mediante la utilización de marcadores moleculares que se constituyen en descriptores taxonómicos sumamente importantes, en particular para los taxónomos de microorganismos.

Uno de los fenómenos más importantes para la biología evolutiva es la variabilidad genética, la cual es definida como el conjunto de diferentes formas alélicas presentes en una población o especie (Kotzé y Muller 1994), ya que sobre esta variabilidad inciden las diferentes fuerzas que promueven el cambio evolutivo.

Las levaduras, en general, exhiben considerable diversidad genética y es razonable, por consiguiente, esperar que esta variabilidad genética tenga un profundo impacto sobre sus propiedades biológicas. Además estos microorganismos poseen atributos que las hacen ser un excelente modelo de estudio, ya que crecen fácilmente, alcanzan tamaños poblacionales

grandes en tiempos relativamente cortos y poseen sistemas genéticos simples de fácil manipulación. Sin embargo, el estudio de su diversidad genética tradicionalmente se ha llevado a cabo por medio de pruebas denominadas de comportamiento al azar. En estas pruebas todos los factores ambientales son controlados, de tal forma que las diferencias bioquímicas fisiológicas o morfológicas observadas son adjudicadas únicamente a las diferencias en el material genético entre las cepas o especies en estudio.

Actualmente, con la incorporación de las técnicas de biología molecular a los estudios de genética evolutiva es posible evaluar de manera específica y directa esta diversidad (Awise 1994, Parker y col. 1998). La diversidad genética puede caracterizarse jerárquicamente en tres niveles: a nivel de un alelo, a nivel de un grupo de alelos que tienden a variar en conjunto y a nivel del genoma completo de las especies (Ledig 1988). El desarrollo de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki y col. 1985; Mullis y Faloona 1987), aunado al descubrimiento de enzimas termoestables (Saiki y col. 1985; Erlich y col. 1991), han ampliado el espectro de posibilidades de este tipo de estudios genéticos (Erlich y Arnheim 1992).

Una de las técnicas de aplicación directa es conocida como reacción en cadena de la polimerasa de segmentos aleatorios polimórficos (RAPD-PCR), la cual permite definir patrones específicos y de variabilidad entre especies y cepas. Esta técnica es una variante de la PCR y se caracteriza por utilizar un sólo fragmento iniciador y temperaturas de alineamiento bajas para promover la unión en varios sitios del DNA molde. El resultado es la generación de una gran cantidad de marcadores, fundamentalmente neutros (Welsh y McClelland 1990;

Williams y col. 1990; Caetano-Anollés y col. 1991; Williams y col. 1993).

El RAPD tiene las ventajas, en comparación con otras técnicas, de revelar un mayor grado de variabilidad del genoma, no requerir de conocimiento previo de una secuencia de DNA ni la construcción o el mantenimiento de una biblioteca genómica, analizar un número ilimitado de loci, no utiliza pruebas radiactivas y el ser un método relativamente fácil y económico (Hadrys y Schierwater 1992; Szmidh y col. 1996).

II. JUSTIFICACIÓN

Una de las hipótesis acerca de la producción de feromonas en escolítidos establece que el tubo digestivo podría ser el sitio donde se lleva a cabo esta función. Esta hipótesis surge del hecho de que en este género no se ha encontrado un órgano secretor asociado con la producción de feromonas.

En un intento por esclarecer el papel que juega el tracto digestivo en la síntesis de feromonas, en el laboratorio de Variación Biológica y Evolución de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional se inició un proyecto de investigación encaminado a determinar la participación del mesenterón, en estos procesos. Así, a partir de evidencias histológicas y morfológicas previas, aportadas por el grupo de investigación, se decidió abordar este problema desde tres perspectivas diferentes: desde un punto de vista ultraestructural se analiza la morfología interna de las células del tubo digestivo; con base en análisis histoquímicos y moleculares se pretende conocer los procesos y rutas metabólicas más generales, involucrados en la síntesis y mediante el establecimiento de cultivos primarios de células del epitelio intestinal se tratará de demostrar *in vivo*, a través de bioensayos, la participación de este órgano en la síntesis de feromonas.

La presencia de microorganismos en los cultivos de células del mesenterón y la coexistencia con los diferentes linajes celulares mantenidos *in vitro*, sugiere que estos microorganismos y las células tienen una relación simbiótica estrecha. Por ello, el presente estudio tiene como propósito aislar y caracterizar a las levaduras de esta región del tracto digestivo, así como las del excremento de los insectos colonizadores, tomado directamente de las galerías, y estimar la diversidad genética de los aislados mediante marcadores RAPD para determinar la relación genética y la estructura poblacional de las levaduras del mesenterón y del excremento, aisladas de tres especies del género *Dendroctonus*.

III. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Aislar e identificar levaduras del mesenterón y del excremento de las especies de *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens* por medio de caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares.

- Analizar la diversidad genética y la estructura poblacional de las levaduras del mesenterón y del excremento mediante la técnica RAPD-PCR.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. 1 Origen de las muestras de trabajo

Las levaduras se aislaron del excremento depositado en las galerías construidas por insectos de las especies *Dendroctonus valens* y *D. mexicanus*, así como del intestino de organismos adultos de las especies *D. brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens* (Figura 2 y 3).

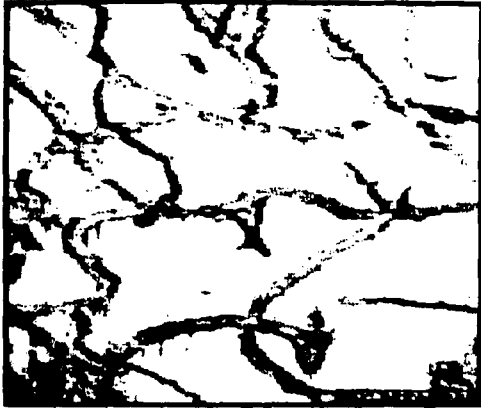
Los escarabajos adultos se recolectaron en tres localidades geográficas diferentes: San Miguel Totoltepec (Ajusco), Delegación Cuajimalpa D.F. México (19° 15' N, 99° 14' O), Centro Interdisciplinario en Ciencias de la salud (CICS) Edo. de México, México (19° 4' N, 98° 58' O) y del condado Spring Creek Oregón, USA (45° 19' N, 118° 19' O) (Cuadro 1). Los insectos se transportaron vivos al laboratorio donde se almacenaron a 4°C hasta su disección.

Las muestras del excremento se tomaron de árboles recién infestados por *D. mexicanus* y *D. valens* en el Centro Interdisciplinario en Ciencias de la salud (CICS) Edo. de México, México y se colocaron en tubos de ensayo limpios y estériles para su traslado al laboratorio.

IV.2 Aislamiento de levaduras del mesenterón

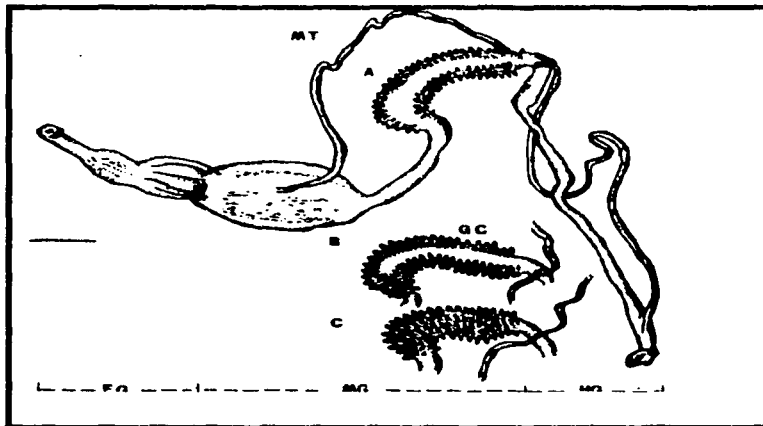
Los insectos vivos fueron desinfectados superficialmente con etanol al 96%, se colocaron en frascos estériles con papel filtro impregnado con una mezcla de penicilina (10,000 U/ml), estreptomycin (10 mg/ml) y anfotericina B (25 mg/ml) durante 7 días a 4°C. Antes de iniciar la disección, el insecto fue sumergido en repetidas ocasiones en una solución reguladora de fosfatos (PBS estéril, 1ml de PES, 1ml de sulfato de gentamicina, 600 µl de anfotericina B) con el objeto de eliminar, hasta donde fuera posible, la presencia de bacterias presentes en los mismos. Por último, los escarabajos se colocaron en una caja Petri estéril (60 x 15mm) con la misma solución de fosfatos y se realizó su disección bajo condiciones de esterilidad, con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Figura 2. Galerías construidas por algunos géneros de *Dendroctonus* spp.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Tracto digestivo de *Dendroctonus* spp.



Cuadro 1. Origen de las cepas de trabajo.

AIS- LA- DOS	SITIO DE AISLAMIENTO	ORIGEN BIOLOGICO	ORIGEN GEOGRAFICO
1	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón, USA
2	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón, USA
3	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón, USA
10	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón, USA
11	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón, USA
14	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón, USA
21	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón, USA
23	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón USA
28	Mesenterón	<i>D. brevicomis</i>	Oregón, USA
8	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
9	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
15	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
18	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
19	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
29	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
30	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
31	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
32	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
33	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
34	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
35	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
36	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
37	Mesenterón	<i>D. mexicanus</i>	Ajusco
12	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Ajusco
13	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Ajusco
16	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Ajusco
22	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Ajusco
24	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Ajusco
26	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Ajusco
4	Mesenterón	<i>D. valens</i>	CICS

AIS- LA- DOS	SITIO DE AISLAMIENTO	ORIGEN BIOLOGICO	ORIGEN GEOGRAFICO
5	Mesenterón	<i>D. valens</i>	CICS
6	Mesenterón	<i>D. valens</i>	CICS
7	Mesenterón	<i>D. valens</i>	CICS
25	Mesenterón	<i>D. valens</i>	CICS
17	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Oregón, USA
20	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Oregón, USA
27	Mesenterón	<i>D. valens</i>	Oregón, USA
38	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
39	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
40	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
41	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
23	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
46	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
51	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
52	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
56	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
58	Excremento	<i>D. mexicanus</i>	CICS
42	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
44	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
45	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
47	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
48	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
49	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
50	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
53	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
54	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
55	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
57	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS
59	Excremento	<i>D. valens</i>	CICS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La disección del insecto consistió en retirar las alas y los élitros para dejar expuesta la zona dorsal, luego a través de cortes finos se eliminaron los terguitos hasta dejar expuesta la zona abdominal. Una vez localizado el tracto digestivo, éste se aisló del resto de los órganos para facilitar la localización de la región del mesenterón, la cual se separó del estomodeo y del proctodeo. El mesenterón fue colocado en otra caja petri en donde se realizó un último lavado con solución reguladora de fosfatos y posteriormente fue colocado en medio de cultivo para células RPMI-1640. Se tomó un inóculo directamente del cultivo primario de células del mesenterón, el cual fue sembrado en tubos con caldo Sabouraud, los tubos se incubaron a 25, 28 y 37°C en agitación. Del sobrenadante se tomó una asada, la cual fue inoculada en agar Sabouraud, agar YPD (Yeast Potato Dextrose), agar Nickerson y agar Biggy, los cultivos se incubaron a tres diferentes temperaturas, 25, 28 y 37°C y el crecimiento de estos vario entre 24 y 72 horas.

IV.3 Aislamiento de levaduras del excremento

A los tubos que contenían las muestras de excremento se les agregó 10 ml de los siguientes medios de cultivo: caldo TBS, caldo BHI, caldo nutritivo, caldo Sabouroud y caldo tioglicolato. Las muestras se incubaron a 25, 28 y 37°C. Una vez que se observó el crecimiento de los microorganismos, se tomó una asada y se inoculó en agar TBS, agar MCC, agar BHI, agar nutritivo, agar saboraud y agar papa dextrosa. Estos medios se incubaron a 25, 28 y 37°C y el crecimiento de estos oscilo entre 24 y 72 horas.

IV.4 Purificación y conservación de levaduras obtenidas del mesenterón y excremento

Se realizaron resiembras para obtener cultivos puros, para ello se seleccionaron colonias con morfología característica y se comprobó mediante un examen en fresco y tinción de

gramm el origen levaduriforme. Se conservó el cultivo puro y las colonias aisladas de cada cepa en agua desionizada estéril a 4°C, en glicerol al 50% a -20°C y en glicerol al 50% a -70 °C para estudios posteriores.

IV.5 Determinación taxonómica de las levaduras

IV.5.1 Sistema de identificación API 32 C

Actualmente, se dispone de sistemas de identificación semi-automatizados que permiten obtener resultados entre 48 y 72 horas. Dentro de los sistemas más importantes, por el número de especies que se pueden identificar, se encuentran: a) el panel de Identificación de Levaduras MicroScan (Baxter-MicroScan), b) el API ZYM (Analytab products), c) el API para Identificación de levaduras (Analytab), d) el VITEK y e) API 32 C (BioMérieux).

En el presente estudio se utilizó el sistema API 32 C, el cual se compone de 32 pozos que contienen un substrato carbonado deshidratado. Las cepas a probar se colocan en suspensión en un medio sintético semisólido, después de 24 a 48 horas de incubación se observó el crecimiento de las levaduras en cada pozo. La determinación taxonómica se obtuvo con la ayuda del software APILAB (BioMérieux).

VI.5.2 Pruebas morfológicas .

VI.5.2.1 Tubo germinal. En un tubo de ensaye con suero fetal de bovino se inocularon las cepas de lavaduras y se incubaron en agitación continua a 37°C durante 2 hrs. Se observó al microscopio la presencia o no del tubo germinativo en las diferentes cepas.

VI.5.2.2 Formación de clamidoconidias. En agar se hicieron tres estrías cortas y paralelas con un inóculo liviano de la cepa de levadura a probar. Las estrías cortas y paralelas se cruzaron con una estría ondulada a todo lo largo y se colocó sin ejercer presión un

cubreobjetos estéril sobre el estriado. El inóculo se incubó a 25 °C durante 48 hrs. para su observación al microscopio. La prueba se valoró a través de la presencia de estructuras circulares (conidias) de 10 a 12 μm de diámetro, de doble pared y cuya localización fue terminal, lateral o intercalar.

VI.5.2.3 Crecimiento en placas Dalmou. En este caso se realizaron tres estrías cortas y paralelas con un inóculo liviano de la colonia a probar. Las estrías cortas y paralelas se cruzaron con una estría ondulada a todo lo largo. Un cubreobjetos estéril se colocó sobre el estriado sin ejercer presión y se incubó de 4 a 7 días a 25°C para su observación directamente al microscopio. La prueba permitió distinguir el tipo de hifa o pseudohifa característica de las levaduras.

VI.5.2.4 Crecimiento en agar extracto de malta al 5%. Las cepas de levaduras se inocularon en agar extracto de malta al 5% y se incubaron por 3 días a 25°C para observar su crecimiento directamente al microscopio. La forma, tamaño y arreglo de las células es indicativo de ciertos grupos de levaduras.

VI.5.2.5 Crecimiento en un medio con presión osmótica alta. Las cepas se colocaron en tubos de vidrio (180 x16mm) con 5 ml de medio líquido estéril de cloruro de sodio al 10% y glucosa al 5%. Los tubos con las cepas y medio se incubaron por 2 días a 25°C en agitación, para posteriormente observar el tipo de crecimiento de las mismas, el cual es indicativo de los grupos de levaduras.

VI.5.2.6 Crecimiento en medio libre de vitaminas. Las cepas se colocaron en tubos de vidrio (180 x16mm) estériles con un medio 10X de glucosa mineral sin vitaminas y se incubaron durante dos o tres días en agitación a 25°C para observar su crecimiento. El

crecimiento o no de las cepas es indicativo de ciertos tipos de levaduras.

VI.5.2.7 Crecimiento en agar de dextrosa-sabouraud a diferentes temperaturas. Las cepas se inocularon en este medio a 25, 28 y 37°C para observar su crecimiento directamente en la placa. El crecimiento de las cepas en este medio y a estas temperaturas permite discernir entre distintas especies de levaduras.

VI.5.2.8 Formación de almidón. Las cepas se inocularon en placas con medio para inducir la formación del almidón. Posteriormente se agregó a la placa una solución de lodina-lugol y se incubaron durante 1 ó 2 semanas a 28°C. La formación de un color azul o verde es indicativo de la presencia de almidón producido por algunas especies de levaduras.

IV.5.3 Pruebas Bioquímicas

VI.5.3.1 Fermentación. En tubos Durham conteniendo un medio base para fermentación 10X, se inocularon las cepas problema. En cada uno de los tubos se adicionaron diferentes azúcares (galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, rafinosa, sucrosa y trealosa) con la finalidad de observar la producción de dióxido de carbono durante 28 días a 25°C. La producción o no de dióxido de carbono es la respuesta que se documentó en estas pruebas.

VI.5.3.2 Asimilación de compuestos de carbón en medio líquido. Estas pruebas se llevaron a cabo para documentar el crecimiento aeróbico de levaduras. Las pruebas se realizaron en tubos de vidrio estériles que contenían agua destilada, un medio base de nitrógeno 10X y la fuente de carbono correspondiente. Los tubos se inocularon con una suspensión de levaduras preparada previamente y se incubaron a 28°C de 3 a 4 semanas. El registro de crecimiento o no fue indicativo del comportamiento de ciertos tipos de levaduras.

VI.6 Ampliación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR)

VI.6.1 Extracción de DNA. Las cepas se sembraron en agar Sabouraud y se incubaron a 28°C durante 48 hrs. Una colonia elegida al azar se transfirió a una solución de caldo Sabouraud para su crecimiento hasta la fase estacionaria. Las levaduras se cosecharon por centrifugación a 14000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y se le agregó 200µl de una solución de lisis (Tritón X-100 al 2%; SDS al 1%; NaCl 100 mM; Tris 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM) y 200µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La solución se agitó en un vortex y se incubó a 65°C durante 45 min. Posteriormente, a esta solución se adicionaron 200 µl de agua desionizada estéril y se centrifugó durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, en donde se agregó 1 ml de etanol absoluto para su mezcla por inversión. Estos tubos se colocaron en el congelador durante 10 min, para su posterior centrifugación durante otros 10 min. El sobrenadante de estos tubos (etanol) se eliminó, se dejó secar el botón de las levaduras para posteriormente resuspenderlo en 400 µl de agua desionizada y 30 µg de RNAsa 10 µg/ml (Gibco BRL). Los tubos con la levaduras resuspendidas se incubaron a 37°C durante 15 min, para después agregarles 10 µl de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol absoluto. Todos estos componentes se mezclaron por inversión, se congelaron durante 15 min y se centrifugaron durante 10 min. Finalmente se secó el paquete de DNA y se resuspendió en 30 µl de agua para su almacenamiento a -20 °C.

VI.6.2 Cuantificación del DNA. La cuantificación del DNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin Elmer 1000. Las lecturas de las absorbancias se realizaron a 260 y 280 nm usando como blanco agua. La concentración de DNA en µg/ml se estimó a partir de

la siguiente relación:

$$\frac{\text{Absorbancia a 260 nm} \times \text{Factor 50} \times \text{Factor dilución}}{1000}$$

1000

donde 1 unidad de absorbancia = 50 µg/ml de DNA de doble cadena

VI.6.3 Calidad del DNA. La calidad del DNA se observó por medio de su integridad en geles de agarosa al 0.7% y a partir de la relación UA a 260/ UA280 nm, donde un cociente mayor de 1.8 es indicativo de una buena calidad del DNA.

VI.6.4 Amplificación del DNA. Para las amplificaciones de cada una de las cepas, mediante la técnica PCR-RAPD, se utilizaron los siguientes iniciadores: OPE-18 (GGACTGCAGA), OPE-04 (GTGACATGCC), OPA-18 (AGGTGACCCT), R9 (GTTGCCAGCC), EDP-3 (GTAGACCCCT), ED-P4 (AAGAGCCCTT), EDP-12 (CAGCGAACTA), EDP-15 (TCCCTTCTC), EDP-18 (CACCCCCTTG) y EDP-20 (CCAAGCTGCC). La mezcla de reacción se preparó en un tubo Eppendorf de 0.5 ml, agregando: 1 µL de DNA (10 ng /µL), 2.5 µL de regulador 10x, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 0.5 µL de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 1µL de cloruro de magnesio, 1µL de los oligonucleótidos o iniciadores y agua desionizada suficiente para alcanzar un volumen final de 25µl. La mezcla se cubrió con una gota de aceite mineral y se realizó la amplificación siguiendo la rutina de Lockhart, (1997): 38 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, una fase de alineamiento a 36 °C durante 2 min y una fase de amplificación a 73°C durante 2 min. Los productos de amplificación se almacenaron a -20 °C hasta su corrimiento por electroforesis.

VI.6.5 Electroforesis de los productos de amplificación. La electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.3% en TAE 1X (0.04M Tris-acetato, 0.001M EDTA pH 8.0). Los amplificados (8 µl) se mezclaron con 1 µl de regulador de corrimiento y se colocaron en los pozos del gel, la separación de los productos de RAPD-PCR se realizó a 70 volts. Las bandas de DNA fueron reveladas en una solución de bromuro de etidio y observadas en un transiluminador de luz U.V. Las imágenes de los geles teñidos se digitalizaron con el programa TV Turner en formato Gif. El tamaño de los fragmentos en pares de bases se calculó por comparación con el DNA de λ digerido EcoRI/Hynd III y λ PST1, con ayuda del programa Sigma Gel Versión 1.0 (Jandel Scientific Co., 1999).

IV. 7 Análisis de los datos

Los datos bioquímicos y los datos RAPD de los aislados del mesenterón y del excremento fueron codificados como datos binarios (1,0). Las pruebas bioquímicas positivas se codificaron como (1) y las negativas como (0), la presencia de bandas RAPD entre las cepas se codificó como (1) y la ausencia de éstas como (0) (apéndice 1 y 2).

De cada una de las matrices de datos binarios se construyó una matriz de similitud por el índice de Jaccard: (apéndice 3 y 4).

$$J = a / a + b + c$$

Donde **a** es la banda presente en ambas cepas; **b** es la banda presente en la primera pero ausente en la segunda; y **c** es la banda presente en la segunda pero ausente en la primera.

El índice de Jaccard no considera la combinación (0, 0) entre las cepas, y su utilización en el análisis de los datos RAPD obedece a que este no se distorsiona por el número de

bandas, individuos o poblaciones analizadas (Real y Vargas, 1996).

La relación entre las cepas se visualizó de manera independiente a partir de datos bioquímicos y datos RAPD, por medio de un dendrograma. El árbol fue construido por el método de agrupamiento de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA) a partir de la matriz de similitud de Jaccard. La distorsión de estos árboles se valoró por medio del coeficiente cofenético de correlación (r) a través de la prueba aleatorizada no paramétrica de Mantel (Manly, 1997).

Alternativamente, con el propósito de establecer la robustez estadística de los grupos que se forman dentro de cada uno de los dendrogramas, se realizó la prueba del mejor corte (Strauss, 1982). Para ello, la matriz de distancias 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 ordenados de manera ascendente, eliminando los ceros 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 cepas u OTU's, 100 es el número de veces que la matriz de

distancias es aleatorizada y 0.05 el nivel de significancia), se interpoló en la distribución de diferencias acumulativas para obtener el punto de corte que determina la significancia o robustez estadística de los grupos en el dendrograma.

La diversidad genética promedio de las cepas se calculó para cada grupo formado en el dendrograma de datos RAPD, mediante el índice de Shannon (Lewontin, 1972) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$H_o = \sum - p_i \log_2 p_i$$

Donde p_i es la frecuencia del marcador, presente (1) o ausente (0), considerando a cada marcador como un loci.

Asimismo, se estimó la divergencia nucleotídica (d) mediante la ecuación de Clark y Lanigan (1993),

$$d = -(2/r) \ln P$$

Donde r es el número de bases que presenta el oligo empleado y $\ln P$ es el log natural de la probabilidad.

La diversidad nucleotídica (π) entre los cepas de cada grupo formado en el dendrograma de datos RAPD se calculó de acuerdo con la fórmula de Nei y Li (1979).

$$\pi = \sum_{i,j} X_i X_j d_{ij}$$

Donde q es el número total de alelos, x_i es la frecuencia de la población del alelo i y d_{ij} es la divergencia nucleotídica entre las diferencias nucleotídicas o sustituciones por sitio entre los alelos i y j.

V. RESULTADOS

Se obtuvieron 37 aislados del mesenterón de *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens* que crecieron en medio RPMI-1640 y 22 aislados del excremento de *D. mexicanus* y *D. valens* que crecieron en Sabouraud. Los medios sólidos donde se obtuvo un mejor crecimiento de los aislados y que por lo mismo fueron seleccionados para la resiembra y purificación fueron: Agar dextrosa Sabouraud, Agar YEPD (Yeast Potato Dextrose), Agar Nickerson y Agar Biggy.

V.1 Determinación taxonómica de los aislados

V.1.1 Pruebas morfológicas y bioquímicas

Para cinco aislados (17, 20, 31, 33 y 34) del mesenterón no fue posible determinar las pruebas morfológicas y bioquímicas porque se perdieron durante el desarrollo del estudio. La determinación taxonómica de las especies de levaduras por medio del sistema API 32C (BioMérieux) no fue confiable debido a que mostró perfiles inaceptables para la mayoría de las cepas, en algunos casos el perfil fue dudoso, en otros bueno pero sin mostrar un 100% de confiabilidad. De acuerdo con los resultados mostrados por este sistema, son siete las especies que destacaron por su frecuencia de aparición en los aislados del mesenterón y excremento: *Pichia guilliermondii*, *Candida utilis*, *C. silvícola*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *Rhodotorula glutinis*, y *Zygosaccharomyces spp.* (Cuadro 2).

A pesar de la baja resolución mostrada por este sistema, para las pruebas morfológicas y bioquímicas se tomaron como especies de referencia *Pichia guilliermondii*, *P. ohmerii*, *P. holstii*, *P. xestobii* y *C. boidinii* debido a que algunas de estas aparecieron en el sistema API 32-C.

Las pruebas de tubo germinativo para todos los aislados fueron negativas, ya que no

hubo formación de hifas. También fue negativa la presencia de clamidoconidias.

El tamaño promedio de las levaduras aisladas del mesenterón fue de $3.09 \times 1.86 \mu\text{m}$, y el de las cepas aisladas del excremento fue de $3.14 \times 1.4 \mu\text{m}$. La morfología levaduriforme que predominó fue la ovoide con agrupamiento de cadenas cortas.

De los 54 aislados el 38, 46, 57 y 58 formaron hifas, pero ninguno de ellos formó almidón, licuó la gelatina ó creció a presión osmótica alta (Cuadro 3).

Los aislados de mesenterón desplegaron reacciones de fermentación de carbohidratos (glucosa, sucrosa, maltosa, lactosa, galactosa y rafinosa), y de asimilación (glucosa, galactosa, sucrosa, maltosa, celobiosa, melibiosa, D-xilosa, D-arabinosa, D-ribosa, D-glucosamina, N-acetil, salicin, metanol, etanol, glicerol, inulina, lactosa, rafinosa, hexadecano, inositol, manitol, L-sorbosa, melezitosa, eritritol) similares a *P. guilliermondii* y *P. ohmerii* a diferencia de los aislados de excremento quienes asimilaron y fermentaron los azúcares de forma similar a *C. boidinii* y *C. hostii* (Cuadro 4).

V.1.2 Análisis de datos morfológicos y bioquímicos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El punto de corte del dendrograma construido con los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas fue de 0.78 (Figura 4). A partir de él, se definen tres grandes grupos (A, B, C) que presentan una similitud por arriba de 0.79 y tres aislados independientes.

El primer grupo, está formado por los aislados de mesenterón y reúne a 30 de los 32 aislados con *Pichia guilliermondii*. El aislado 16 del mesenterón se asocia con *P. ohmeri*, el aislado 30 presenta una bioquímica diferente. Los aislados del excremento forman dos

grupos. El primero está integrado por 11 de los 22 aislados y se asocia con *P. Holstii*. El segundo por 10 de los aislados, y solo el aislado 57 presentó una bioquímica semejante a *C. boidinii*.

El coeficiente de correlación cofenética ($r = 0.87384$, $P = 0.0004$); indica que el dendrograma es una buena representación de la matriz de datos original y que la asociación de los aislados, es resultado de su relación biológica y no por productos del azar.

Cuadro 2. Determinación taxonómica de los aislados del mesenterón y excremento de *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens* por el sistema API 32 C.

AISLADOS	BIOTIPO	API 32C	AISLADOS	BIOTIPO	API 32C
<i>D. brevicomis</i> Oregón (Mesenterón)			<i>D. mexicanus</i> Ajusco (Mesenterón)		
1	7555770317	<i>Candida silvícola</i> (BI)	18	5577773135	<i>C. famata</i> (BI)
2	7577372117	<i>C. guilliermondii</i> (BI)		5575771135	<i>C. famata</i> (PI)
3	7555770317	<i>C. silvícola</i> (BI)		5575773335	<i>C. famata</i> (PI)
10	4255370131	<i>C. lusitaniae</i> (PI)			<i>C. laurentii</i> (PI)
11	5575773135	<i>C. famata</i> (PI)			<i>C. membranafaciens</i> (PI)
	5575773335	<i>C. laurentii</i> (PI)	19	5575773115	<i>C. famata</i> (PI)
		<i>C. membranafaciens</i> (PI)	29	5575773115	<i>C. famata</i> (PI)
	5575773337	<i>C. famata</i> (PI)	30	4057134031	ND
		<i>C. membranafaciens</i> (PI)		4000100000	
		<i>C. laurentii</i> (PI)		4000130001	
		<i>Debaryo polymorphus</i> (PI)	31	4000130001	ND
14	5575773115	<i>C. famata</i> (PI)	32	4057310001	ND
21	4255370311	<i>C. utilis</i> (PI)	33	5053134021	ND
		<i>C. lusitaniae</i> (PI)		5057134021	
	4255370111	<i>C. pelliculosa</i> (PI)		4053136021	
	4051370111	<i>C. lusitaniae</i> (PI)	34	4050130001	ND
		<i>C. utilis</i> (PI)	35	5056134021	ND
		<i>Rhodotorula glutinis</i> (PI)		4053136021	
	4251370311	<i>C. utilis</i> (PI)	36	5577177115	<i>C. famata</i> (PI)
		<i>C. silvícola</i> (PI)		5545177135	
		<i>C. lusitaniae</i> (PI)		5574177115	
		<i>Hansenula saturnus</i> (PI)		5575177135	
23	5575773115	<i>C. famata</i> (PI)	37	5575177135	<i>C. famata</i> (PI)
	5575773335	<i>C. famata</i> (PI)		5575177135	
		<i>C. laurentii</i> (PI)		5577377135	
		<i>C. membranafaciens</i> (PI)	<i>D. valens</i> Ajusco (Mesenterón)		
	5570773315	<i>C. membranafaciens</i> (PI)	12	5255370311	<i>C. lusitaniae</i> (BI)
28	4255370311	<i>C. utilis</i> (PI)		4255370111	<i>C. utilis</i> (PI)
	4255370111	<i>C. lusitaniae</i> (PI)			<i>C. lusitaniae</i> (PI)
<i>D. mexicanus</i> Ajusco (Mesenterón)				5255370111	<i>C. lusitaniae</i> (PI)
8	5577771315	<i>C. famata</i> (BI)			<i>C. pelliculosa</i> (PI)
9	5577773735	<i>C. famata</i> (BI)	13	4255370311	<i>Candida utilis</i> (PI)
		<i>Cryptococcus humicolus</i> (PI)			<i>C. lusitaniae</i> (PI)
	5577573735	<i>C. membranafaciens</i> (PD)		4255370111	<i>C. pelliculosa</i> (PI)
		<i>C. laurentii</i> (PD)			<i>C. lusitaniae</i> (PI)
		<i>C. famata</i> (PD)			<i>C. utilis</i> (PI)
15	5575773115	<i>C. famata</i> (PI)	16	4255370311	<i>C. pelliculosa</i> (PI)
	5575773335	<i>C. famata</i> (PI)			<i>C. lusitaniae</i> (PI)
		<i>Cryptococcus laurentii</i> (PI)			<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>Candida membranafaciens</i> (PI)			

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Continuación Determinación taxonómica de los aislados del mesenterón y excremento

AISLADO S	BIOTIPO	API 32C
D. valens Ajusco (Mesenterón)		
22	4255370311	<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>C. lusitanae</i> (PI)
	4255370111	<i>C. pelliculosa</i> (PI)
		<i>C. lusitanae</i> (PI)
		<i>C. utilis</i> (PI)
24	4255370311	<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>C. lusitanae</i> (PI)
	4255370111	<i>C. pelliculosa</i> (PI)
		<i>C. lusitanae</i> (PI)
		<i>C. utilis</i> (PI)
26	4255370211	<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>C. lusitanae</i> (PI)
D. valens CICS (Mesenterón)		
4	7577372117	<i>C. guilliermondii</i> (BI)
5	7577372117	<i>C. guilliermondii</i> (BI)
6	5577352117	<i>C. guilliermondii</i> (BI)
7	7577372117	<i>C. guilliermondii</i> (BI)
25	7577372117	<i>C. guilliermondii</i> (BI)
D. valens Oregón (Mesenterón)		
17	2411210011	<i>Rhodotorula glutinis</i> (PI)
20	2411210011	<i>R. glutinis</i> (PI)
27	2411310111	<i>R. glutinis</i> (PI)
D. mexicanus CICS (Excremento)		
38	7755771113 7555770111	<i>C. silvicola</i> (PI)
39	7755770117 7755770115	<i>C. silvicola</i> (PI)
40	6577770115 7577770115	<i>C. silvicola</i> (PI)
41	7777771715 6777770115	<i>C. silvicola</i> (PI)
43	7755770117 7555770115	<i>C. silvicola</i> (PI)
46	7777770115 6355770115	<i>C. silvicola</i> (PI)
51	5777771176 6155770115	<i>C. silvicola</i> (BI)

AISLADO S	BIOTIPO	API 32C
D. mexicanus CICS (Excremento)		
52	7777771116 6777770111	<i>C. silvicola</i> (BI)
56	7777771117 7777770111	<i>C. silvicola</i> (BI)
58	6757771115 6155770115	<i>C. silvicola</i> (BI)
D. valens CICS (Excremento)		
42	4275370311 4251370111	<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>C. silvicola</i> (PI)
		<i>H. saturnus</i> (PI)
44	4255370711 4255370111	<i>Rhodotorula glutinis</i> (PI)
45	4255370111 4251370111	<i>R. glutinis</i> (PI)
47	4255370111 4251370111	<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>C. silvicola</i> (PI)
		<i>H. saturnus</i> (PI)
48	4255370111 4251370701	<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>C. silvicola</i> (PI)
		<i>H. saturnus</i>
49	4777770711 4251370711	<i>C. lusitanae</i> (PI)
		<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>H. saturnus</i>
50	4266370111 4251370111	<i>C. utilis</i>
		<i>C. silvicola</i> (PI)
		<i>H. saturnus</i> (PI)
53	6757771115 6777770115	<i>C. silvicola</i> (BI)
54	4275370711 7753707111	<i>R. glutinis</i> (PI)
		<i>C. colliculosa</i> (PI)
55	4255370111 4251370111	<i>C. utilis</i> (PI)
		<i>C. silvicola</i> (PI)
		<i>H. saturnus</i>
57	0000777771 4110000011	<i>Zygosaccharo spp</i> (PI)
		<i>C. glabrata</i> (PI)
59	4275370111	<i>R. glutinis</i> (PI)

ND=No determinada
 BI= Buena identificación
 PI= Perfil Inaceptable
 PD= Perfil dudoso

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Pruebas morfológicas realizadas a los aislados del mesenterón y de excremento de *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens*

Aislados	Tamaño levaduras	Morfología levaduras	Tubo geminal	Formación de clamidoconidias	Formación pseudohifas	Formación almidón	Crecimiento a presión osmótica alta	Licuefacción gelatina
<i>Dendroctonus brevicomis</i> Oregón (Mesenterón)								
1	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
2	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
3	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
10	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
11	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
14	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
21	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
23	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
28	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
<i>D. mexicanus</i> Ajusco (Mesenterón)								
8	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
9	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
15	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
18	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
19	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
29	3.72/2.2	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
30	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
32	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
35	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
36	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
37	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
<i>Dendroctonus valens</i> Ajusco (Mesenterón)								
12	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
13	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
16	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
22	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
24	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
26	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
<i>Dendroctonus valens</i> Oregón (Mesenterón)								
27	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-

Cuadro 3. Continuación Pruebas morfológicas realizadas a los aislados del mesenterón y de excremento.

Aislados	Tamaño levaduras	Morfología levaduras	Tubo germinal	Formación de clamidoconidias	Formación pseudohifas	Formación almidón	Crecimiento a presión osmótica alta	Licuefacción gelatina
<i>Dendroctonus valens</i> (CICS) (Mesenterón)								
4	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
5	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
6	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
7	2.79/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
25	3.72/1.86	ovoide/elongada	-	-	+	-	-	-
<i>Dendroctonus mexicanus</i> CICS (Excremento)								
38	3.2/1.7	elipse	-	-	-	-	-	-
39	3.1/1.7	elipse	-	-	+	-	-	-
40	3.2/1.7	elipse	-	-	+	-	-	-
41	3.5/1.8	elipse	-	-	+	-	-	-
43	3.0/1.8	ovalada	-	-	+	-	-	-
46	3.6/1.8	elipse	-	-	-	-	-	-
51	3.4/1.8	elipse	-	-	+	-	-	-
52	3.6/1.9	elipse	-	-	+	-	-	-
56	3.7/1.8	elipse	-	-	+	-	-	-
58	3.6/1.7	elipse	-	-	-	-	-	-
<i>Dendroctonus valens</i> CICS (Excremento)								
42	3.4/1	ovalada	-	-	+	-	-	-
44	3 1	ovalada	-	-	+	-	-	-
45	3 1	ovalada	-	-	+	-	-	-
47	2.5/1.5	ovalada	-	-	+	-	-	-
48	3 1	ovalada	-	-	+	-	-	-
49	2.4/0.8	ovalada	-	-	+	-	-	-
50	3 1	ovalada	-	-	+	-	-	-
53	3.5/1.9	elipse	-	-	+	-	-	-
54	3 1	ovalada	-	-	+	-	-	-
55	3/1.1	ovalada	-	-	+	-	-	-
57	3 1	ovalada	-	-	-	-	-	-
59	2.5/0.8	ovalada	-	-	+	-	-	-

Cuadro 4. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados del mesenterón y excremento de *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens*.

	<i>Dendroctonus brevicomis</i> Oregón (Mesenterón)										<i>D. mexicanus</i> Ajusco (Mesenterón)										<i>D. valens</i> Ajusco (Mesenterón)						<i>D. valens</i> CICS (Mesenterón)						<i>D. valens</i> Oregón (Mesenterón)	Cepas de referencia	
	1	2	3	10	11	14	21	23	28	8	9	15	18	19	29	30	32	35	36	37	12	13	16	22	24	26	4	5	6	7	25	27	<i>P. guilhermondii</i>	<i>P. ohmeri</i>	
ASIMILACION																																			
glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
sucrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
melibiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
D-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
D-ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-glucosamina	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N-acetil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
hexadecano	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L-sorbosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
melezitosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
FERMENTACION																																			
glucosa(fer)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
galactosa(fer)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
sucrosa(fer)	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
maltosa(fer)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
lactosa(fer)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
rafinosa(fer)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
trealosa(fer)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

Cuadro 4. Continuación Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados del mesenterón y excremento.

	<i>Dendroctonus mexicanus</i> CICS (Excremento)										<i>D. valens</i> CICS (Excremento)										Cepas de referencia				
	38	39	40	41	43	46	51	52	56	58	42	44	45	47	48	49	50	53	54	55	57	59	<i>P.holstii</i>	<i>C.boidinii</i>	<i>C.xestobii</i>
ASIMILACION																									
glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
sucrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
D-ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
D-glucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
N-acetil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
hexadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
L-sorbosa	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
melezitosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
FERMENTACION																									
glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sucrosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trealosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-

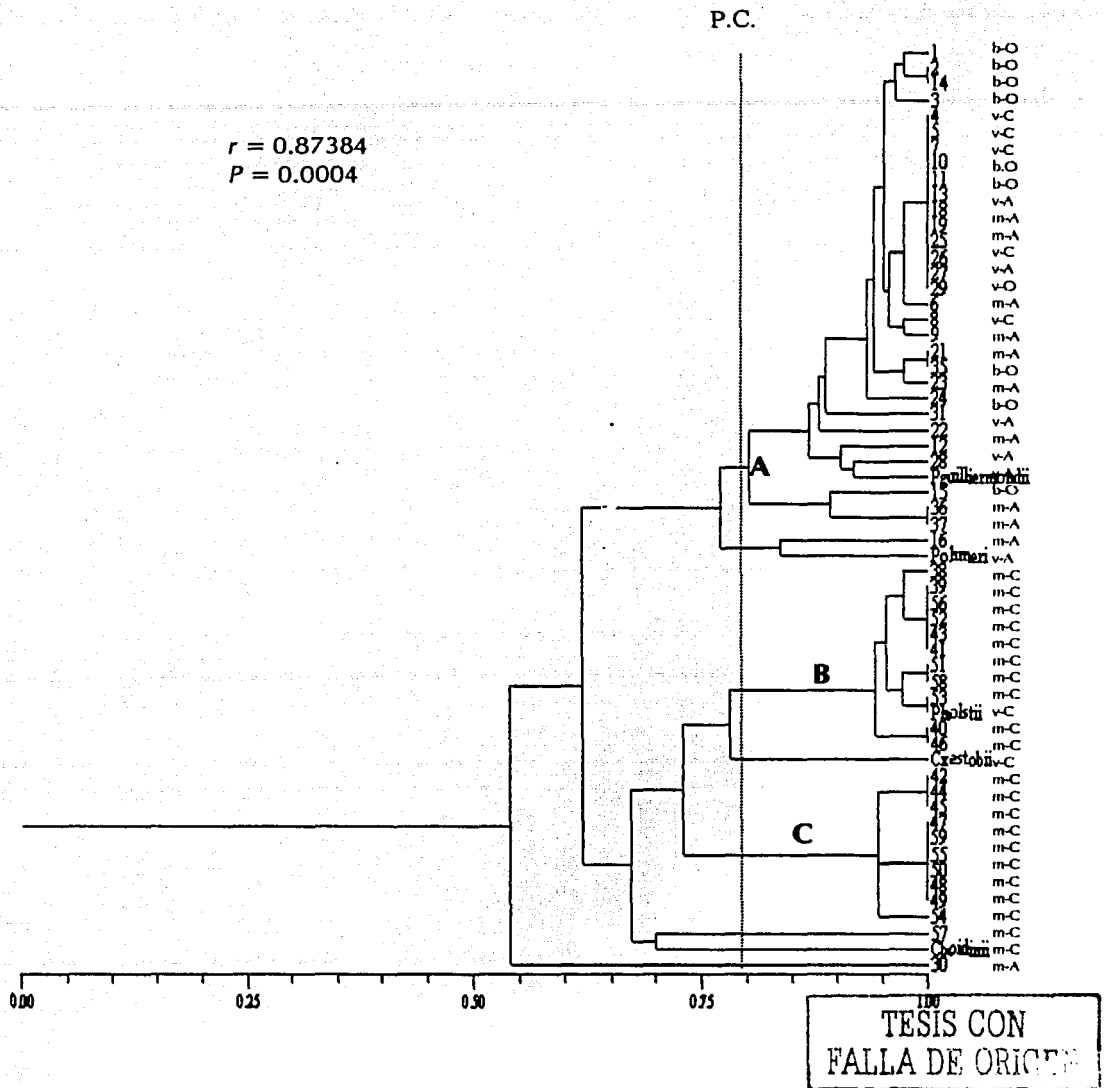


Figura 4. Dendrograma construido a partir de datos bioquímicos de las cepas aisladas del mesenterón y excremento de las especies *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens*.

P.C. punto de corte. A, B, C grupos que conforman al dendrograma con base en el punto de corte.

(A= Ajusco; C=CICS y Oregón) origen geográfico de los aislados. (b= *Dendroctonus brevicomis*, m= *D. mexicanus*, v= *D. valens*) origen biológico de los aislados.

V. 2 Análisis de los datos de amplificación aleatoria del DNA polimórfico (RAPD)

V.2.1 Determinación de la concentración de ADN

La extracción y cuantificación del ADN de las treinta y siete cepas de levaduras del mesenterón del tracto digestivo y de las veintidós cepas de levaduras aisladas del excremento fue abundante y de excelente calidad en todos los casos (Cuadro 5).

V.2.2 Patrones de bandas

Las cepas del mesenterón desplegaron tres patrones de bandas diferentes el primero de ellos lo presentaron los aislados 30 a 35, el segundo las cepas 1, 2 y 3, y el tercero los aislados 4 a 29, 36 y 37. Las cepas del excremento también mostraron tres patrones. Uno formado por las cepas 38 a 41, 43, 46, 51- 53, 56 y 58, el segundo las cepas 42, 44, 45, 47a 50, 54, 55 y 59, y el tercer patrón sólo por la cepa 57. Al compararse estos patrones de bandas con aquellos desplegados por las cepas de referencia *Candida colliculosa*, *C. kefir*, *C. lusitanae*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa* y *Pichia guilliermondii*, se encontró que el patrón 3 de los aislados del mesenterón fue semejante al de *P. guilliermondii*, el resto de los patrones no coincidieron con ninguno de los desplegados por las cepas de referencia (Figuras 5 a 8).

V.2.3 Análisis de datos RAPD

El número de bandas generado por iniciador fue variable (Cuadro 6). En total se generaron 410 marcadores RAPD para todas las cepas con los 10 iniciadores utilizados (apéndice 2). El punto de corte del dendrograma construido con los datos RAPD-PCR fue de 0.25 (Figura 9). A partir del cual se establecieron cinco grandes grupos (A, B, C, D, F) que presentan una similitud por arriba de 0.80 y un aislado independiente.

El primer grupo (A) lo integran las cepas 1, 2 y 3 del mesenterón, el segundo (B) lo constituyen las cepas 30-35 del mesenterón, el tercer grupo (C) lo integraron el resto de las cepas del mesenterón, el cuarto grupo (D) esta formado por 11 de las 22 cepas del excremento, el quinto (E) por 10 cepas más del excremento y la cepa 57 tiene un comportamiento independiente.

Las cepas que integran cada uno de los grupos aparentemente se asociaron de acuerdo a su origen biológico y geográfico, es decir los aislados del grupo A son de *D. brevicomis* de Oregon, el grupo B fueron aislados de *D. mexicanus* del Ajusco, el grupo C es un grupo más variable, sin embargo, al interior del grupo se observan subgrupos que presentan asociaciones con respecto a su origen biológico y geográfico (Figura 9). El grupo D se integro con aislados de *D. mexicanus* del CICS y el grupo E fueron aislados de *D. valens* del CICS.

El coeficiente de correlación cofenética ($r = 0.99907$ $P = 0.0004$), indica que el dendrograma es una representación adecuada de la matriz de datos original y que la asociación de los aislados es resultado de su relación biológica y no producto del azar.

Al combinar los datos RAPD y bioquímicos se obtuvo un dendrograma en donde se observó nuevamente la formación de 5 grupos, distribuidos de la misma manera que en el dendrograma construido a partir solamente de datos RAPD, con un valor de r y P semejantes, lo que sugiere que la relación genética de las cepas es consistente y que existe una similitud fenotípica muy cercana entre los aislados (Figura 10).

Cuadro 5. Concentración de DNA en los aislados de mesenterón y excremento de *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens*.

Aislados	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>Dendroctonus brevicomis</i> Oregón Mesenterón		
1	0.463	5788
2	0.201	2513
3	0.29	3625
10	0.321	4013
11	0.098	1225
14	0.037	463
21	0.31	3875
23	0.141	1763
28	0.086	1075
<i>D. mexicanus</i> Ajusco Mesenterón		
8	0.157	1963
9	0.203	2538
15	0.15	1875
18	0.163	2038
19	0.149	1863
29	0.152	1900
30	0.545	6813
31	0.572	7150
32	0.05	625
33	1.039	12988
34	0.532	6650
35	0.272	3400
36	0.055	687.5
37	0.126	1575
<i>D. valens</i> Ajusco Mesenterón		
12	0.175	2188
13	0.166	2075
16	0.215	2688
22	0.132	1650
24	0.242	3025
26	0.137	1713
<i>D. valens</i> CICS Mesenterón		
4	0.239	2988
5	0.153	1913
6	0.131	1638
7	0.162	2025
25	0.176	2200
<i>D. valens</i> Oregón Mesenterón		
17	0.132	1650
20	0.23	2875
27	0.222	2775

Aislados	Absorbancia a 260nm	Concentración ng/ml
<i>D. mexicanus</i> CICS Excremento		
38	0.038	190
39	0.024	120
40	0.034	170
41	0.023	115
43	0.028	140
46	0.02	100
51	0.059	295
52	0.039	195
56	0.028	140
<i>D. valens</i> CICS Excremento		
58	0.049	220
42	0.144	720
44	0.254	1270
45	0.135	675
47	0.477	2390
48	0.86	4300
49	0.274	1370
50	0.303	1520
53	0.043	215
54	0.331	1650
55	0.127	635
57	0.304	1520
59	0.295	1470
Cepas de Referencia		
<i>C. guilliem</i>		6628
<i>C. lusitanea</i>		7436
<i>C. tropicalis</i>		9765
<i>C. peliculosa</i>		5478
<i>C. coliculosa</i>		5289
<i>C. rugosa</i>		6789

b-O b-O b-O
 MP 1 2 3
 v-C v-C v-C
 v-C v-C v-C
 m-A m-A m-A
 m-A m-A m-A
 b-O b-O b-O
 v-A v-A v-A
 b-O b-O b-O
 m-A m-A m-A
 v-A v-A v-A
 v-O v-O v-O
 m-A m-A m-A



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Patrones de amplificación por RAPD-PCR con el iniciador OPE-18; Carril 1 MP, marcador de peso molecular 1 EcoRI-Hind III; carriles 1-18 aislados de mesenterón de *Dendroctonus brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens*.

(A= Ajusco; C=CICS y Oregón) origen geográfico de los aislados. (b= *Dendroctonus brevicomis*, m= *D. mexicanus*, v= *D. valens*) origen biológico de los aislados.

m-A v-O b-O v-A b-O v-A v-C v-A v-O b-O v-C m-A m-A m-A m-A m-A m-A m-A m-A
 MP19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 Cg Cl MP 36 37 Cg1 Cg2

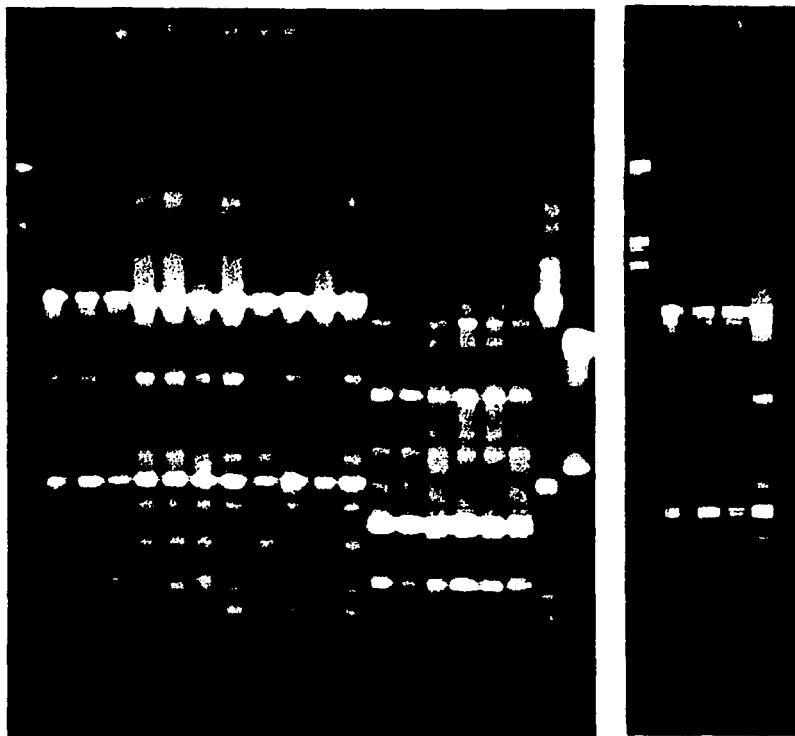


Figura 6. Patrones de amplificación por RAPD-PCR con el iniciador OPE-18, Carril 1 MP, marcador de peso molecular 1 EcoRI-Hind III; carriles 19-37 aislados de mesenterón de *Dendroctones brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens*; carril Cg, *C guilliermondii*; carril Cl, *C. lusitaniae*; Carril Cg1, *C guilliermondii*; Carril Cg2, *C guilliermondii*.

(A= Ajusco; C=CICS y Oregón) origen geográfico de los aislados. (b= *Dendroctonus brevicomis*, m= *D. mexicanus*, v= *D. valens*) origen biológico de los aislados.

MP 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 CN

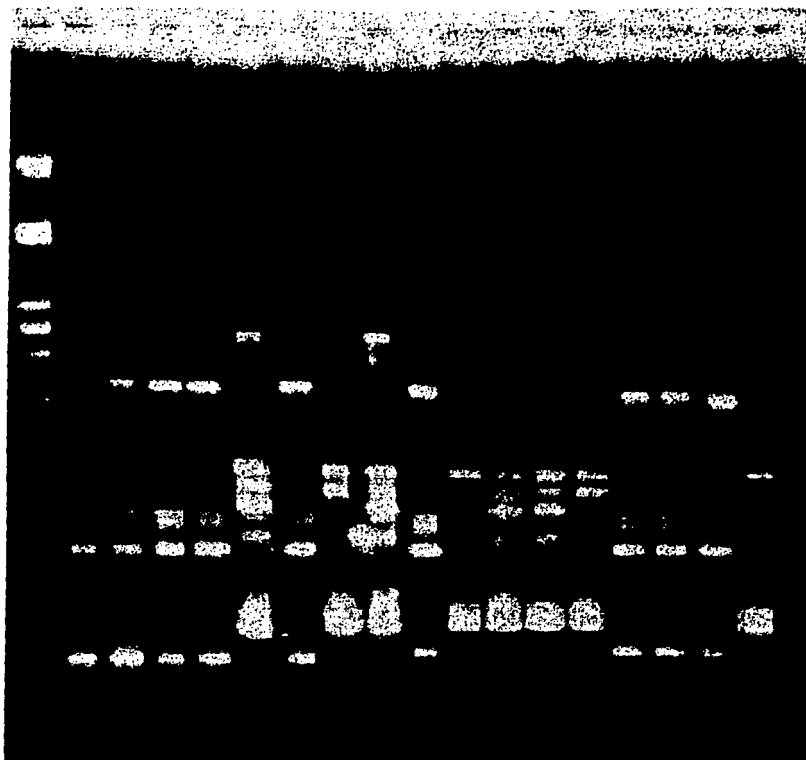


Figura 7. Patrones de amplificación por RAPD-PCR con el iniciador OPE-18, Carril 1 MP, marcador de peso molecular 1 PST1; carriles 38-54 aislados de excremento de *D. mexicanus* y *D. valens*; carril CN, control negativo.

(A= Ajusco; C=CICS y Oregón) origen geográfico de los aislados. (b= *Dendroctonus brevicomis*; m= *D. mexicanus*, v= *D. valens*) origen biológico de los aislados.

CN	MP	v-C	m-C	v-C	m-C	v-C	Cg1	Cg2	Cc	Ck	Cr	Cp	Cl	Ct
----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----	----	----	----	----	----



TESIS CNM
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
 EN CIENCIAS QUÍMICAS

Figura 8. Patrones de amplificación por RAPD-PCR con el iniciador OPE-18, Carril CN control negativo; Carril MP, marcador de peso molecular 1 PST1; carriles 55 a 59 aislados de excremento de *D. mexicanus* y *D. valens*; Cg1 y Cg2, *C. guilliremondii*; Cc, *Candida colliculosa*; Ck, *C. kefyri*; Cr, *C. rugosa*; Cp, *C. pelliculosa*; Cl, *C. lusitaniae*; Ct, *C. tropicalis*.

(A= Ajusco; C=CICS y Oregón) origen geográfico de los aislados. (b= *Dendroctonus brevicomis*; m= *D. mexicanus*, v= *D. valens*) origen biológico de los aislados.

Tabla 6. Número de bandas desplegadas por cada iniciador para las 59 cepas de levaduras aisladas del mesenterón y excremento en la técnica de RAPD-PCR.

Iniciador	No. de bandas	Iniciador	No. de bandas
OPE-04(5'-GTGACATGCC-3')*	35	EDP-4(5'-AAGAGCCCTT-3')**	47
OPE-18(5'-GGACTGCAGA-3')*	51	EDP-12(5'-CAGCGAACTA-3')**	40
OPA-18(5'-AGCTGACCGT-3')*	47	EDP-15(5'-TCCCTTCCTC-3')**	33
R9(5'-GTTGCCAGCC-3')**	39	EDP-18(5'-CACCCCCTTG-3')**	42
EDP-3(5'-GTAGACCCGT-3')**	31	EDP-20(5'-CCAAGCTGCC-3')**	45

*Sintetizados por Gibco BRL.

** Sintetizados por Lakesi5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

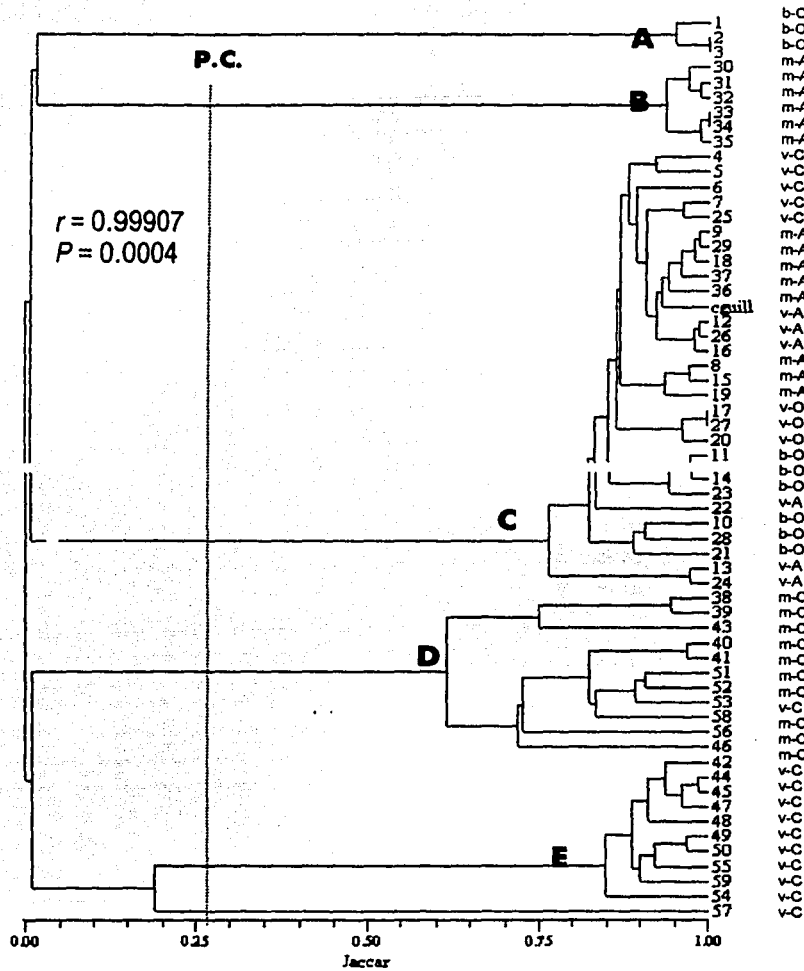


Figura 9. Dendrograma construido a partir de datos RAPD-PCR de las cepas aisladas del mesenterón y excremento de las especies *Dendroctonus brevicornis*, *D. mexicanus* y *D. valens*.

P.C. punto de corte. (A, B, C, D y E) grupos que conforman al dendrograma con base en el punto de corte.

(A=Ajusco; C=Cics y O=Oregon) origen geográfico de los aislados. (b= *D. brevicornis*; m= *D. mexicanus*; v= *D. valens*) origen biológico de los aislados.

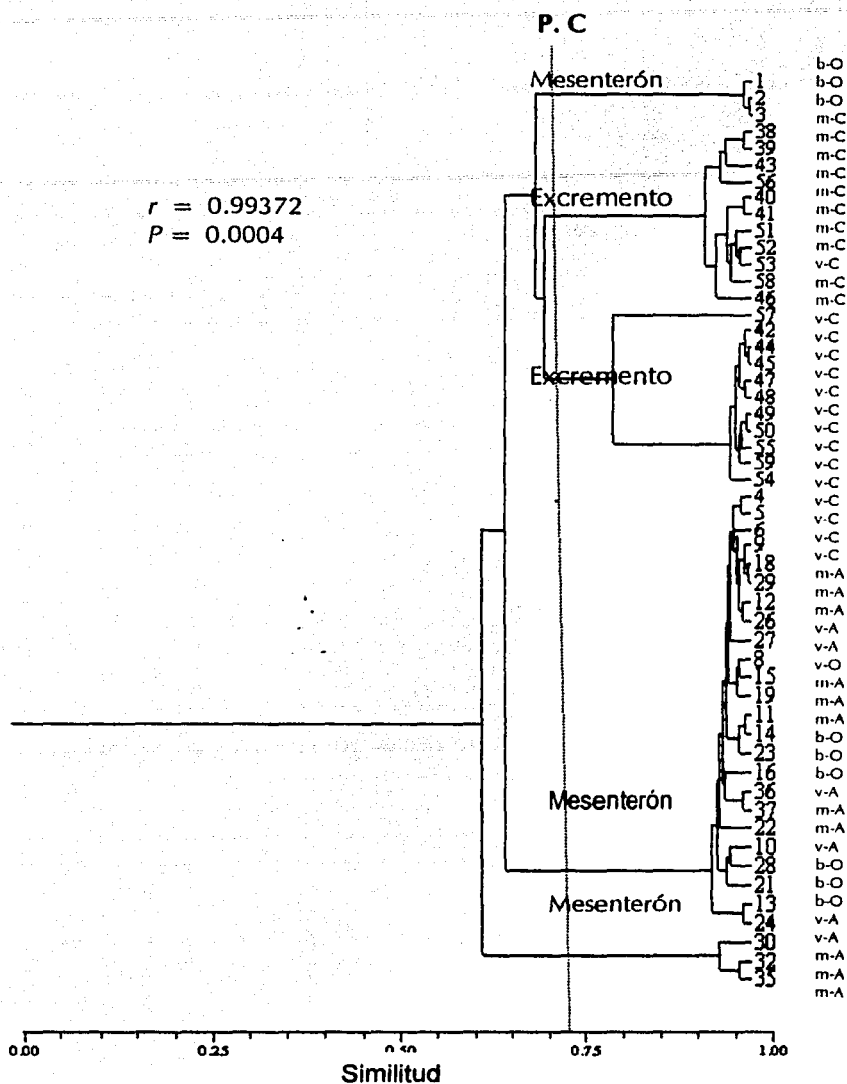


Figura 10. Dendrograma construido a partir de la combinación de los datos bioquímicos y RAPD-PCR de las cepas aisladas del mesenterón y excremento de las especies *D. brevicomis*, *D. mexicanus* y *D. valens*. P.C. punto de corte. (A= Ajusco; C=CICS y Oregón) origen geográfico de los aislados. (b= *Dendroctonus brevicomis*, m= *D. mexicanus*, v= *D. valens*) origen biológico de los aislados.

V. 2.4 Diversidad genética

Los valores de la diversidad genética de los aislados tanto del excremento como del mesenterón se muestran en los cuadros 7 y 8. De acuerdo con el dendrograma y los grupos definidos en él en función del punto de corte, se asume que cada uno de éstos corresponde a una especie de levadura diferente. Así, la diversidad promedio para los grupos observados en el dendrograma varió de 0.1965 (grupo A) a 0.3417 (grupo C). La diversidad promedio para todos los aislados fue de 0.2479.

El grupo A integrado por aislados de *D. brevicomis*, de la región de Oregón, presentó valores de diversidad genética inferiores al promedio. El grupo B con cepas de *D. mexicanus* del Ajusco y el grupo C integrado por cepas de diversos aislados (*D. brevicomis*, de la región de Oregón, *D. mexicanus* del Ajusco, *D. valens* del CICS, *D. valens* del Ajusco y *D. valens* de Oregón) presentaron valores de diversidad genética superiores al promedio. El grupo D integrado por un aislado de *D. valens* del CICS y el resto de *D. mexicanus* del CICS y el grupo el grupo E con aislados de *D. valens* del CICS presentaron valores de diversidad genética similares a éste.

Los 22 aislados del excremento muestran valores de diversidad genética similares al promedio, mientras que las 37 cepas del mesenterón muestran valores superiores a éste promedio.

En los aislados de la región del CICS y de la región de Oregón se encontraron valores de diversidad genética muy amplias entre sus cepas que va de 0.187 a 0.416 en la primera y de 0.183 a 0.355 en la segunda región, es decir sus cepas presentan valores inferiores y superiores al promedio. Los aislados de Ajusco presentaron valores más estrechos de

diversidad entre sus cepas (0.283-0.489).

Los aislados de *D. valens* tuvieron valores de diversidad más amplios entre sus cepas (0.1-0.466) con respecto a los aislados de *D. mexicanus* (0.187-0.489) y de *D. brevicomis* (0.183-0.395).

Analizando de manera conjunta el origen biológico y la región de donde fueron tomados los aislados, se encontró lo siguiente. Las 17 cepas de levaduras aisladas de *Dendroctonus valens* (CICS) se distribuyeron en los grupos C, D y E presentando una menor diversidad genética, que las extraídas del excremento y mayor que las del mesenterón. De las 14 cepas de mesenterón de *D. mexicanus* (Ajusco) las pertenecientes al grupo B presentaron menor diversidad genética que las del grupo C. De las 9 cepas extraídas de intestino de *D. brevicomis* (Oregón) las ubicadas en el grupo C presentaron mayor diversidad genética que las del grupo A. Los 6 aislados del mesenterón de *D. valens* (Ajusco) se localizaron en el grupo C de éstos tres cepas tuvieron valores superiores y tres valores inferiores al promedio del grupo. Los 3 aislados de *D. valens* de Oregón se concentraron en el grupo C obteniendo valores similares al promedio del grupo. Las 10 cepas aisladas del excremento de *D. mexicanus* (CICS), se ubicaron en el grupo D presentando valores de diversidad genética mayores, menores y similares al promedio.

V. 2. 5 Divergencia nucleotídica

La divergencia nucleotídica estimada para cada uno de los 5 grupos arrojados en el dendrograma de datos RAPDs varió desde 0.00018 para el grupo B a 0.00316 para el grupo D (Cuadro 9).

V.2.6 Diversidad nucleotídica

El valor promedio de diversidad nucleotídica varió desde 0.01024 para el grupo B a 0.04931 para el grupo D (Cuadro 10).

Cuadro 7. Valores de diversidad genética por iniciador y promedio de los 5 grupos arrojados en el Dendrograma de RAPDS.

INICIADOR	GRUPO A			GRUPO B					GRUPO C															
	1	2	3	30	31	32	33	34	35	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
OPE-18	0.1	0.166	0.166	0.166	0.166	0.1	0.219	0.219	0.219	0.529	0.529	0.529	0.529	0.166	0.529	0.529	0.529	0.529	0.219	0.529	0.166	0.166	0.529	0.529
OPE-04	0.219	0.219	0.219	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.511	0.511	0.511	0.263	0.511	0.511	0.219	0.219	0.511	0.166	0.219	0.511	0.511	0.511	0.511
OPA-18	0.1	0.166	0.166	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.531	0.531	0.531	0.531	0.219	0.531	0.531	0.531	0.531	0.531	0.1	0.219	0.531	0.531	0.531
EDP-20	0.219	0.219	0.219	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.166	0.166	0.481	0.166	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.1	0.481	0.263	0.263	0.481	0.263
EDP-15	0.219	0.219	0.219	0.1	0.302	0.302	0.302	0.302	0.302	0.434	0.434	0.365	0.365	0.219	0.434	0.1	0.365	0.434	0.365	0.365	0.219	0.434	0.166	0.434
ED-P4	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.1	0.219	0.166	0.452	0.452	0.452	0.219	0.452	0.219	0.166	0.166	0.452	0.219	0.219	0.452
R9	0.219	0.219	0.219	0.1	0.302	0.302	0.302	0.302	0.302	0.531	0.531	0.531	0.166	0.531	0.531	0.531	0.531	0.531	0.166	0.531	0.531	0.531	0.531	0.531
EDP-3	0.219	0.219	0.219	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.1	0.1	0.302	0.434	0.219	0.434	0.166	0.166	0.434	0.166	0.166	0.219	0.434	0.302	0.434
EDP-18	0.1	0.166	0.166	0.302	0.302	0.302	0.302	0.302	0.1	0.511	0.263	0.263	0.511	0.263	0.511	0.511	0.511	0.511	0.166	0.511	0.263	0.511	0.263	0.511
EDP-12	0.219	0.219	0.219	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.1	0.481	0.481	0.481	0.219	0.481	0.263	0.166	0.481	0.481	0.166	0.219	0.263	0.219	0.263
Div. Gen. Crpa	0.183	0.203	0.203	0.256	0.297	0.29	0.302	0.302	0.282	0.351	0.377	0.416	0.39	0.328	0.49	0.355	0.395	0.466	0.253	0.323	0.306	0.386	0.375	0.446
Varianza	0.003	7E-04	7E-04	0.01	0.003	0.006	0.002	0.002	0.006	0.042	0.029	0.018	0.021	0.021	0.002	0.031	0.024	0.009	0.023	0.031	0.019	0.02	0.024	0.011
Div. Gen. Prom.	0.1965			0.28805						0.35177														
Varianza	0.00153			0.00496						0.0184														

Iniciador	GRUPO C													GRUPO D										
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	36	37	38	39	40	41	43	46	51	52	53	56	58
OPE-18	0.529	0.529	0.166	0.529	0.1	0.219	0.166	0.529	0.529	0.529	0.529	0.219	0.529	0.166	0.166	0.166	0.166	0.1	0.263	0.1	0.263	0.1	0.263	0.263
OPE-04	0.511	0.511	0.219	0.511	0.219	0.166	0.263	0.511	0.511	0.219	0.511	0.263	0.263	0.219	0.219	0.335	0.335	0.219	0.335	0.335	0.335	0.335	0.166	0.166
OPA-18	0.219	0.531	0.531	0.1	0.531	0.531	0.1	0.531	0.531	0.531	0.531	0.531	0.531	0.166	0.166	0.414	0.414	0.414	0.414	0.414	0.414	0.414	0.414	0.414
EDP-20	0.263	0.481	0.263	0.1	0.481	0.1	0.166	0.263	0.481	0.263	0.263	0.481	0.481	0.219	0.219	0.166	0.166	0.219	0.263	0.263	0.263	0.1	0.1	0.263
EDP-15	0.219	0.1	0.219	0.1	0.365	0.219	0.365	0.434	0.166	0.219	0.434	0.434	0.434	0.219	0.1	0.166	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.219	0.219
ED-P4	0.219	0.219	0.219	0.219	0.452	0.166	0.452	0.219	0.219	0.219	0.452	0.452	0.452	0.391	0.1	0.391	0.391	0.1	0.1	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391
R9	0.531	0.531	0.1	0.531	0.1	0.166	0.166	0.531	0.531	0.531	0.531	0.531	0.531	0.219	0.219	0.302	0.302	0.219	0.1	0.302	0.302	0.1	0.1	0.302
EDP-3	0.219	0.302	0.1	0.1	0.166	0.166	0.434	0.434	0.302	0.302	0.434	0.434	0.434	0.302	0.302	0.166	0.166	0.263	0.302	0.263	0.263	0.302	0.302	0.263
EDP-18	0.263	0.1	0.511	0.1	0.511	0.166	0.511	0.511	0.263	0.263	0.511	0.511	0.511	0.166	0.166	0.263	0.263	0.1	0.1	0.1	0.263	0.263	0.1	0.1
EDP-12	0.219	0.219	0.166	0.263	0.166	0.481	0.481	0.481	0.219	0.481	0.481	0.481	0.481	0.219	0.219	0.166	0.166	0.219	0.1	0.219	0.219	0.219	0.1	0.1
Div. Gen. Crpa	0.319	0.352	0.249	0.255	0.309	0.238	0.31	0.444	0.375	0.356	0.468	0.434	0.465	0.229	0.188	0.254	0.247	0.195	0.208	0.249	0.281	0.232	0.216	0.248
Varianza	0.02	0.034	0.023	0.038	0.031	0.021	0.024	0.013	0.024	0.02	0.007	0.012	0.006	0.005	0.004	0.01	0.012	0.01	0.015	0.014	0.008	0.016	0.015	0.011
Div. Gen. Prom.														0.25353										
Varianza														0.01116										

Cuadro 7. Continuación Valores de diversidad genética por iniciador y promedio

Iniciador	GRUPO E									
	42	44	45	47	48	49	50	54	55	59
OPE-18	0.335	0.335	0.335	0.335	0.263	0.335	0.335	0.263	0.263	0.263
OPE-04	0.365	0.365	0.365	0.365	0.365	0.365	0.365	0.1	0.166	0.166
OPA-1E	0.263	0.263	0.263	0.263	0.1	0.1	0.263	0.263	0.263	0.263
EDP-20	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.1	0.1	0.1	0.1	0.335
EDP-15	0.1	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.335	0.166	0.166	0.1
ED-P4	0.1	0.414	0.414	0.414	0.141	0.141	0.141	0.414	0.414	0.414
R9	0.391	0.391	0.391	0.166	0.166	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391
EDP-3	0.434	0.434	0.434	0.434	0.434	0.434	0.434	0.434	0.434	0.434
EDP-18	0.219	0.219	0.219	0.166	0.166	0.166	0.166	0.1	0.1	0.1
EDP-12	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391	0.391	0.1
DCC	0.293	0.348	0.348	0.32	0.27	0.276	0.292	0.262	0.269	0.257
VAR	0.014	0.004	0.004	0.009	0.014	0.018	0.014	0.019	0.017	0.018
Div. Gen. Prom.	0.25912									
Varianza	0.01231									

Div. Gen.Prom. Para el total de cepas	0.29982
varianza	0.1488

Cuadro 8. Diversidad genética por iniciador para los 5 grupos arrojados en el dendrograma.

Iniciador	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO E
OPE-18	0.45914792	0.45914792	0.33509631	0.47358697	0.4854753
OPE-04	0	0	0.36887031	0.29583639	0.42554605
OPA-1E	0.45914792	0	0.36777914	0.40563906	0.36096405
EDP-20	0	0	0.39150001	0.34469587	0.4854753
EDP-15	0	45914792	0.43339621	0.42126972	0.46838024
ED-P4	0	0	0.40243036	0.29583639	0.44440207
R9	0	0.45914792	0.36750552	0.43156028	0.36096405
EDP-3	0	0	0.39290534	0.48395546	0
EDP-18	0.45914792	0.45914792	0.41468246	0.49261407	0.39273765
EDP-12	0	0	0.38728724	0.50837697	0.2344978
Div. Gen. Prom.	0.13774438	0.13774438	0.38614735	0.37477321	0.36584425
Varianza	0.04919059	0.04919059	0.0007753	0.02362552	0.02230414

Cuadro 9. Divergencia nucleotídica por iniciador y diversidad nucleotídica promedio para los cinco grupos arrojados en el Dendrograma RAPDS.

Iniciador	Divergencia nucleotídica				
	GRUPO A 1,2,3.	GRUPO B 30, 31 , 32, 33, 34 , 35.	GRUPO C 4 - 29 , 36, 37.	GRUPO D 38, 39, 40, 41, 43, 46, 51, 52, 53, 56, 58.	GRUPO E 42, 44, 45, 47, 48 - 50, 54, 55, 59.
OPE-18	0.00054	0.00020	0.00085	0.00114	0.00054
OPE-04	0	0	0.00189	0.00337	0.00045
OPA-18	0.00039	0	0.00070	0.00029	0.00065
EDP-20	0.00067	0	0.00151	0.0049	0.00201
EDP-15	0	0.00034	0.00702	0.00442	0.00114
ED-P4	0	0.00734	0.00246	0.00069	0.00019
R9	0	0.00025	0.00122	0.00149	0.000558
EDP-3	0	0	0.00583	0.00336	0
EDP-18	0.00039	0.00028	0.00147	0.00683	0.00575
EDP-12	0	0	0.00134	0.00509	0.00030
Div. Gen	0.00020	0.00018	0.00243	0.00316	0.00116
Var.	7.358×10^{-8}	5.683×10^{-8}	4.758×10^{-6}	4.785×10^{-6}	2.925×10^{-6}
Des. est.	0.00027	0.00023	0.00218	0.00218	0.00171

Cuadro 10. Diversidad nucleotídica para los cinco grupos arrojados en el Dendrograma RAPDS.

Iniciador	Diversidad nucleotídica				
	GRUPO A 1, 2, 3.	GRUPO B 30, 31 , 32 33, 34 , 35.	GRUPO C 4 - 29 , 36, 37.	GRUPO D 38, 39, 40, 41, 43, 46, 51, 52, 53, 56, 58.	GRUPO E 42, 44, 45, 47, 48 - 50, 54, 55 59.
π	0.0732	0.01024	0.03073	0.04931	0.04691

VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

VI.1 Determinación taxonómica

En los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar la relación entre las levaduras e insectos escolítidos. Particularmente, la relación entre estos microorganismos y los insectos del género *Dendroctonus* a cobrado importancia por el papel que aparentemente juegan éstos en la síntesis o producción de feromonas.

Los datos morfológicos y bioquímicos clásicos han sido elementos sumamente útiles en la determinación taxonómica de levaduras cuyo polimorfismo y variabilidad genética es conocida. En este sentido, para especies de interés clínico se han desarrollado métodos automatizados, como el API 32C, los cuales permiten obtener resultados confiables, con poco margen de error y en tiempos relativamente cortos. Sin embargo, cuando se analiza por estos métodos a otras especies cuyo origen biológico, geográfico, y hábitat es diferente, los resultados suelen ser poco confiables con un margen de error alto; como fue el caso para las levaduras del presente estudio aisladas del mesenterón y excremento de las especies del género *Dendroctonus*.

En este contexto, la determinación taxonómica de las levaduras es fundamental, pero a su vez es una tarea compleja por el alto polimorfismo, variabilidad genética, especificidad y adaptabilidad a diferentes ambientes que presentan estos microorganismos. De tal forma, que ésto, aunado a la importancia que tienen como patógenos de humanos, animales y plantas, a su papel en la biotecnología y a su importancia en diversos aspectos ecológicos, ha obligado a diferentes autores a combinar caracteres tradicionales, ultraestructurales, bioquímicos y moleculares para tener una mejor caracterización de las especies. Un caso ilustrativo de este hecho es el género *Pichia*, que incluye a más de 100 especies determinadas por pruebas

fisiológicas (Kurzman, 1998) y que hoy en día a través del análisis de secuencias parciales del 18s y 26s del DNA, algunas de ellas han sido ubicadas en el género *Ogataea* (Yamada y col., 1995). Otro caso de estudio es el de Kurtzman y Robnett, (1997, 1998), quienes mediante la técnica RAPD-RFLP determinaron taxonómica y filogenéticamente a *Candida tenuis*, *C. silvanorum* y *C. rugosa* aisladas de insectos arborícolas.

La combinación de caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares en el presente estudio puede considerarse una estrategia confiable para caracterizar y determinar a las levaduras provenientes del excremento y mesenterón de las especies de *Dendroctonus*. No obstante, hasta el momento, los resultados del presente estudio son parciales, ya que a pesar de que se han distinguido presuntamente cinco especies diferentes no se tiene una determinación taxonómica definitiva de ellas, por el hecho de que su perfil bioquímico no está reportado en la literatura taxonómica; situación que hace difícil contar con cepas de referencia con quien comparar.

A pesar de ello, las topologías de los árboles construidas en el presente estudio tanto con datos morfológicos y bioquímicos como moleculares, sugieren que los grupos que las conforman son consistentes, es decir, que los aislados del mesenterón y del excremento se asocian entre ellos y forman grupos diferentes. De hecho, la topología que se deriva de la combinación de todos estos datos arroja un árbol más consistente (Figura 10). El estudio de regiones génicas, como el 26s y el 18s del rDNA o de las regiones intergénicas como el ITS1 y el ITS2, podrán en un futuro cercano coadyuvar a la determinación definitiva de las especies bajo el concepto de especie filogenética y establecer sus relaciones evolutivas a través de su comparación con las secuencias de levaduras depositadas en el banco de genes.

VI. 2 Diversidad genética

El nivel de variación genética es considerado el potencial evolutivo de una especie, su estimación es importante porque permite valorar lo extenso de la diversidad genética, no obstante, a pesar de que las levaduras han sido modelos de estudio ampliamente estudiados pocos son los trabajos en los que se ha estimado su diversidad genética. Las razones, aparentemente, por las cuales ésta no se ha estimado son porque existe confusión entre los conceptos de similitud y diversidad genética. Así, por ejemplo, Siilata y col. (1995) caracterizan genéticamente a 19 aislados clínicos del hongo dimórfico *Blastomyces dermatitidis* por medio de RFLP, construyen el dendrograma correspondiente, eligen a una cepa de cada uno de los grupos que se formaron en el árbol y los someten a un análisis de RAPD-PCR encontrando que los patrones de bandas son diferentes. Los autores no estiman la diversidad genética de estos aislados a pesar de poseer la información tanto de los marcadores RFLP y RAPD.

El trabajo de Clemons (1997) presenta la misma deficiencia, ya que utiliza tres técnicas (REA, RAPD y PFGE) para comparar la variabilidad genética de 86 cepas de Estados Unidos y Europa y 26 aislados de Singapore de *Candida albicans*. El autor menciona, a partir de los dendrogramas generados por medio de los marcadores de éstas técnicas, la presencia de 58 subtipos REA y 18 PFGE; desafortunadamente en este estudio, la diversidad genética no es cuantificada, sólo valorada cualitativamente en función del índice de similitud (S_{AB}), el cual sólo permite establecer que tanta similitud tiene un aislado con otro.

Asimismo, Caligiorne (1999) intenta analizar la diversidad genética de 30 cepas de hongos dematiaceos patógenos por medio del RAPD-PCR a través de 10 iniciadores. El autor

construye un dendrograma entre las cepas a partir de 114 marcadores moleculares, a partir del cual hace una estimación cualitativa de la diversidad de las cepas con base en la similitud genética que se presenta entre ellas.

Por su parte Saleena (2001) utiliza RAPD y PCR-RFLP dirigido al 16s rDNA como del gen *nif D*, e intenta analizar la diversidad para describir la estructura genética de cepas de *Bradyrhizobium* aisladas de la leguminosa *Arachis hypogaeae* de tres regiones de la costa del sureste de Tami, Nadu. En este trabajo, el autor sólo construye los dendrogramas correspondientes, sin embargo, no aporta datos de diversidad genética a pesar de contar con la información para estimarla.

Por último, otros trabajos donde explícitamente se señala el estudio de la variabilidad genética por medio del RAPD-PCR son aquellos realizados con el hongo *Paecilomyces fumosoroseus* (Tiganc Milani y col., 1995; Cantone y Vandenberg, 1998; Obornik y col., 2000; Cavallazzi-Vargas, 2002), sin embargo, tampoco en estos estudios se presentan estimaciones de la diversidad genética.

Recientemente, en algunos trabajos se ha empezado a estimar la diversidad genética a través de los marcadores RAPD-PCR. En este sentido, en un estudio llevado a cabo con aislados clínicos de *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, y *C. lusitaniae*, utilizando 3 iniciadores mediante la técnica de RAPD, Boldo-León (2000) estimó la diversidad genética promedio de estas cepas. Los valores de diversidad genética de *C. glabrata* (0.369), *C. Tropicalis* (0.351) y *C. lusitaniae* (0.433) estimados por el índice de Shannon, son más altos que los valores de diversidad promedio encontrados para los cinco grupos en la topología construida por medio de marcadores RAPD-PCR en este estudio (Tabla 7). Las diferencias pueden atribuirse a que

las levaduras de origen clínico han estado sometidas a diferentes presiones selectivas por antimicóticos, cosa que no ha sido así en las provenientes del tracto digestivo y excremento de las especies del género *Dendroctonus*.

En un estudio microevolutivo a través de 400 generaciones llevado a cabo con 24 cepas de *Pichia guilliermondii* aisladas del mesenterón de algunas especies de *Dendroctonus*, se encontró que la diversidad genética promedio estimada por medio del índice de Shannon a partir de marcadores RAPD-PCR osciló entre 0.2494 y 0.2857 (Orduña-Rivera, 2002). Estos valores son semejantes a los encontrados en el presente estudio.

Con base en estos antecedentes es difícil hacer una comparación de la diversidad interespecífica de levaduras a partir de marcadores RAPD-PCR, asimismo, también debe tomarse con precaución, por la falta de datos, el hecho de que los aislados de este estudio presenten valores de diversidad más bajos que las cepas de levaduras de interés clínico. Por otra parte, podría ser tentador comparar estas estimaciones con aquellas realizadas por medio de marcadores electroforéticos (isoenzimas), sin embargo, tal comparación no es posible ya que se trata de marcadores distintos, los cuales tienen tasas y forma de evolución diferentes. Además, al ser opuestos los principios de las técnicas, estas permiten cuantificar de manera diferencial la diversidad genética de las especies (Palumbi, 1996).

Independientemente de esto y si se confirma el que cada grupo representa una especie distinta, resulta interesante observar que la comparación de la diversidad genética entre los grupos del mesenterón y excremento fue semejante; de tal forma, que aparentemente la variabilidad genética de estas levaduras no está asociada con el tipo de hábitat del cual fueron

aisladas.

Por otra parte, puede pensarse que estas levaduras no han estado sometidas a manipulación y a factores estresantes de manera deliberada, que promuevan un proceso selectivo que favorezcan la expresión de diferentes campos de variabilidad.

Estos resultados también son interesantes si asumimos que las presiones selectivas naturales presentes en el intestino y en las galerías son diferentes y al transferir a las cepas de estas especies a un medio de cultivo constante en función del aporte de la fuente de carbono, aisladas de la competencia con otros microorganismos del tracto digestivo y del excremento, con tensiones de oxígeno bajas y concentraciones de agua disponible diferentes, las cepas deberían mostrar un campo de variabilidad distinto (Traviso, 2001).

La ausencia de datos de diversidad y divergencia nucleotídica a partir de marcadores RAPD en la literatura hace problemático comparar las estimaciones obtenidas en este trabajo. Sin embargo la comparación de los valores de estos estimadores de los 5 grupos presentes en la topología del RAPD-PCR (Tabla 9 y 10) con aquellos obtenidos a partir de 67 secuencias del 18s ($\pi = 0.06276$ y $\rho = 0.05126$) y 55 secuencias del 26s ($\pi = 0.98801$ y $\rho = 0.16375$) del rDNA depositadas en el banco de genes, sugiere que los valores más bajos de estos estimadores en el presente trabajo son porque los marcadores RAPD-PCR exploran alrededor del 95% del genoma mientras que la alineación de secuencias es específica para una región, y por tanto es más factible que se detecten cambios nucleotídicos que generan diversidad y divergencia dentro y entre las cepas.

VI. 3 Regionalización

Si bien es cierto que la diversidad genética es una estimación de los niveles de variabilidad de las especies, resulta ser en términos biológicos mucho más interesante como ésta se organiza en espacio y tiempo, ya que a partir de esta organización se pueden inferir diversos aspectos de la historia evolutiva de las especies. Así, la hipótesis de que la diversidad genética puede estar regionalizada puede ayudar a establecer la relación entre el origen biológico o geográfico. En este contexto, los grupos de levaduras que se forman en este estudio muestran, aparentemente, una relación con su origen biológico y geográfico, es decir, las cepas que provienen del mesenterón y excremento del mismo insecto y de insectos de la misma localidad se agrupan entre ellos (Fig. 9).

Otros estudios por medio de RAPD-PCR también han encontrado una asociación entre el origen biológico y geográfico y la relación genética de las levaduras. Por ejemplo, Obornik (1995) y Joshi y col., (1997) encuentran una correlación entre los grupos fenéticos del hongo patógeno de la mosquita blanca *Aschersonia sp.* y su origen geográfico. Reyes y col. (1999) encuentran que los patrones polimórficos de DNA de aislados de *Histoplasma capsulatum* provenientes del guano de murciélago se asocian entre ellos de acuerdo a su procedencia geográfica. Mesa (2000) claramente observa que los grupos que forman los aislados de *Sporothrix schenckii* reflejan su origen geográfico. Finalmente, Cavallazzi-Vargas (2002) caracteriza genéticamente aislados del hongo *Paecilomyces fumosoroseus* colectados de varios estados de México, y aislados provenientes de Estados Unidos, Francia y Japón y establece que hay una estrecha relación entre los patrones polimórficos de DNA observados y su procedencia geográfica.

Por otra parte, también existen trabajos donde se ha buscado establecer la misma relación, sin embargo, ésta no se ha encontrado. Por ejemplo, Cantone y Vandenberg (1998) después de analizar 38 aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* de diferentes orígenes geográficos por medio de compatibilidad vegetativa y RAPD-PCR, no encuentran correlación entre la relación genética de los aislados con su hospedero y origen geográfico. Resultados similares fueron obtenidos a través del RAPD-PCR con hongos entomopatógenos *Metarhizium sp.* (Driver y col. 2000) y *Beauveria bassiana* (Berreta y col, 1998; Castrillo y col. 1999). En este mismo contexto, estudios recientes realizados con levaduras de interés clínico como son *Candida albicans* y *C. glabrata* tampoco han encontrado relación entre el origen geográfico de la levadura, tipo de paciente, lugar donde fueron aislados o resistencia a antifúngicos (Boldo-León 2000).

Finalmente intentando ser prudente en las conclusiones de este trabajo, se considera que es necesario, para dar una respuesta concluyente con respecto a la asociación entre grupos de levaduras y su origen geográfico y biológico, el analizar más muestras provenientes de otras especies de *Dendroctonus* y de otras regiones geográficas. Extender el muestreo permitiría llevar a cabo estudios más integrales e informativos de la estructura genética de estas levaduras.

VII. CONCLUSIONES

1.- Los caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares empleadas en este estudio no resolvieron de una manera clara las especies de levaduras aisladas en este trabajo.

2.- La combinación de los atributos morfológicos, bioquímicos y moleculares y el análisis estadístico llevado a cabo con ellos en el presente trabajo, permitió definir cinco grupos los cuales presuntamente corresponden a cinco especies diferentes.

3.- Las levaduras aisladas del mesenterón y del excremento recolectado de las galerías no son las mismas.

4.- los valores de diversidad genética de los 59 aislados son bajos en comparación con la de otros hongos, entre ellos algunas levaduras de interés clínico.

5.- La diversidad en los aislados del mesenterón y en el excremento fue similar.

6.- En general, los grupos de levaduras que se forman en el dendograma muestran una relación con su origen biológico y geográfico.

VIII. SUGERENCIAS

En base en los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere llevar a cabo los siguientes experimentos:

1.- Para caracterizar a las levaduras obtener la secuencia del gen 18S rDNA y del dominio D1/D2 del gen 26S rDNA para cada uno de los aislados del excremento y mesenterón.

2.- Realizar un estudio con una mayor cantidad de cepas de levaduras aisladas del mesenterón y excremento y de diferentes localizaciones geográficas, de diferentes países preferentemente para estudiar su estructura poblacional.

IX. LITERATURA CITADA

- Alatorre, R. R.**, 1978. Plan de acción contra el insecto descortezador de los pinos en México. *Ciencia Forestal* 3 : 25-31.
- Atkinson, T. H.**, and A. E. Martinez. 1985. Notes on biology and distribution of Mexican and Central American Scolytidae (Coleoptera), I. Hylesininae, Scolytinae except Cryphalini and Corthylini. *Coleopterists Bulletin* 39 : 227-238.
- Avise, J. C.**, 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman y Hall. New York, USA
- Barras, S. J.**, 1967. Thoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae) is synonymous with a secondary female character. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 6 :486 - 487.
- Berreta, M. F.**, R. E. Leucona, R. O. Zandomeni, O. Grau. 1998. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD-PCR with fluorescent labels. *J. Invertebr. Pathol.*, 71 :145 - 150.
- Borden, J. H.**, 1982. Aggregation pheromones. Pp. 74-139. *In : Bark beetles in North American conifers: a system for the study of evolutionary biology*. (J. B Mitton, and K. B Sturgeon, eds). University of Texas Press, Austin.
- Boldo-León, X.**, 2000. Estudio de la diversidad genética de cepas de *Candida glabrata* de origen clínico. Tesis de Maestría, ENCB-IPN, México. D. F.
- Brand, J. H.**, J.W. Bracke, A. J. Markovetz., D.L. Wood, and L. E. Browne. 1975. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. *Nature* 254 :136 - 137.

- Brand, J. M., J. W. Bracke, L. N. Britton, A. J. Markovetz, and S. J. Barras.** 1976. Bark beetle pheromones: production of verbenone by a mycangial fungus of *Dendroctonus frontalis*. J. Chem. Ecol., 2 : 195-199.
- Brand, J. M., J. Shultz, S. J. Barra, L. D. Edson, T. L. Payne, and R. L. Hedden.** 1977. Bark beetle pheromones: enhancement of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae) aggregation pheromone by yeast metabolites in laboratory bioassays. J. Chem. Ecol., 3 : 657 - 666.
- Bridges, J. R.,** 1981. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. Microb. Ecol., 7: 131- 137.
- Bridges, J. R., J. E. Marler, and B. H. McSparrin.** 1984. A quantitative study of the yeast and bacteria associated with laboratory-reared *Dendroctonus frontalis* Zimm. (Coleoptera: Scolytidae). Sonderdruck aus Bd. 97 : 261 - 267.
- Brown, W.L., T. E. Eisner, and R. H. Whittaker.** 1970. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. BioScience 20 : 21 - 22
- Burges, H. D., J. F. Grove, and M. Pople.** 1979. The internal microbial flora of the elm bark beetle, *Scolytus scolytus*, at all stages of its development. J. Invert. Pathol. 34: 21- 25.
- Caetano - Anollés, G., B. J. Bassam, and P. M. Gresshoff.** 1991. DNA amplification fingerprint using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology. 9 : 553-557.
- Caligorne, B. R., M. Resende, E. Paiva, and V. Azevedo.** 1999. Use of RAPD (random amplified polymorphic DNA) to analyse genetic diversity of dematiaceous fungal pathogens. Can. J. Microbiol. 45 : 408 - 412.

- Callaham, R. Z., and M. Shifrine.** 1960. The yeast associated with bark beetles. *For. Sci.* 6: 146 - 154.
- Cantone, F., and J. Vandenberg.** 1998. Intraespecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 102 : 209 - 215.
- Castrillo, L. A., M. W. Brian, M. B. Wayne.** 1999. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, *J. Invertebr. Pathol.* 73 : 269 - 275.
- Cavallazzi-Vargas, G.,** 2002. Caracterización genotípica de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wice) Brown y Smit aislado en México y análisis de su virulencia in vitro en la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Tesis de Maestría en ciencias UNAM, México D. F.
- Cibrían, T. D., J. T. M. Montiel, R. C. Bolaños, H. O. Yates III, and J. F. Lara.** 1995. *Forest insects of México*: Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Clark, A. G., and M. S. Lanigan.** 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* 10 : 1096 - 1111.
- Clemons, K. V., F. Feroze, K. Holmberg, and D. A. Stevens.** 1997. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic local by three genotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 1332 - 1336.
- Coster, J. E.,** 1970. Production of aggregating pheromones in re-emerged parent females of the southern pine beetle. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 63 : 1186 - 1187.
- Coulson, R. N.,** 1980. Population dynamics. Pp. 71-115. In: R. C. Thatcher, J. L. Searcy, J. E. Coster, and G. D. Hertel, (eds.). *The southern pine beetle*. USDA, For. Serv. Sci. and Educ. Admin. Tech. Bull. No. 1631
-

- Driver, F., R. Milner, and J. Trueman.** 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 plans.* Society for industrial and applied mathematics. Philadelphia, PA.
- Erlich, H. A., D. Gelfand, and J. J. Sninsky.** 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252 : 1643 - 1651.
- Erlich, H. A., and N. Arnheim.** 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.* 26 : 749 - 506.
- Flores, L. J., y D. Enkerlin.** 1978. Estudio de fluctuación de poblaciones de *Dendroctonus spp.* en el área de Chipinque, Nuevo León. *Fol. Entomol. Mex.*, 108: 39-40.
- Hadrys, H. B., and B. Schierwaeger.** 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55 - 63.
- Joshi, L. St., R. Leger, and D. Roberts.** 1997. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin like protease (Pr1B) from pathogenic fungus *Aschersonia sp.* Using differential display-RT-PCR. *Gene.* 197: 1- 8.
- Kotzé, A., and G. H. Muller** 1994. Genetic relationships in Southern African cattle breeds. 5 *TH World Congress Genetics Applied to Livestock production, Guelph* 21: 413 - 416.
- Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett.** 1991. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast* . 7: 61- 72.
- Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett.** 1995. Molecular relationships among hyphal ascomycetous yeast and yeaslike taxa. *Can. J. Bot.* 73 : S824 - S830.

- Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett.** 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeast based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 1216 - 1223.
- Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett.** 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit 26S, ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek.* 73 : 331 - 371.
- Kurtzman, C. P.,** 2000. Three new ascomycetous yeast from insect-associated arboreal habitats. *Can. J. Microbiol.* 46 : 50 - 58.
- Ledig, T. F.,** 1988. Conservation of genetic diversity: the road to a Trinidad. The Leslie L. Schaffer Lectureship on Forest Science. The University of British Columbia
- Leufvén, A., G. Bergström, and E. Falsen.** 1984 Interconversion of verbenols and by identified yeast isolated from the spruce bark beetle *Ips typographus*. *J. Chem. Ecol.* 10 : 1349 - 1361.
- Leufvén, A., G. Bergström, and E. Falsen.** 1988. Oxygenated monoterpenes produced by yeasts, isolated from *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and grown in *phloem medium*. *J. Chem. Ecol.* 14: 353 - 361.
- Lewontin, R. C.,** 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology.* 6 : 381-398.
- Liuter, F., C. Cheniclet, and J. García.** 1989. Comparison of the defense reactions of *Pinus oinaster* and *Pinus sylvestris* to attacks by two bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) and their associated fungi. *Environ. Entomol.* 18 : 228 - 234.
- Lu, K. C., D.G. Allen, and W. B. Bollen.** 1957. Association of yeast with the Douglas fir beetle. *For. Sci.* 3 : 336 - 343.

- Manly, J. F.**, 1997. *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. Chapman & Hall. London.
- Mesa, A.** 2000. Caracterización de aislados clínicos y de 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, UNAM.
- Moser, J. C., T. J. Perry, J. R. Bridges, and H. F. Yin.** 1995. Ascospore dispersal of *Ceratocystiopsis ranaculosus*, a mycangial fungus of the southern pine beetle. *Mycologia* 87: 84 - 86.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific sintesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155 . 335 - 351.
- Nei, M., and W. H. Li.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76 : 5269 - 5273
- Orduña-Rivera, F.** 2002. Análisis de diversidad genética y estudio microevolutivo de *pichia guilliermondii* aisladas del mesenterón de especies del género *Dendroctonus* (Coleoptera Scolytidae). Tesis de Maestría, ENCB-IPN, México. D. F.
- Obornik, M., K. Marek, and Z. Lukas.** 1995. Genetic variability and phylogeNew York inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategi if entomopathogenic fungi. *Can. J. Bot.* 78 : 1150 - 1155.
- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton, and P. A. Fuerst.** 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79 : 361 - 382.

- Palumbi, S. R.**, 1996. Nucleic acids II: the polymerase Chain reaction P.p. 205-247. In: *Molecular systematics*. (D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, eds.). Sinauer Associates, Massachusetts USA.
- Peterson, S. W.**, and C. P. Kurtzman 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 14 : 124 - 129.
- Perusquía, J.**, 1987. Descortezadores de los pinos *Dendroctonus* spp: Taxonomía y distribución. Boletín técnico No. 55. SARH. DIC. México.
- Real, R.**, and J. M. Vargas. 1996. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. *Syst. Biol.* 45 : 380 - 385
- Reyes, M. R.**, M. Bobadilla, M. A. Martínez, G. Rodríguez, E. Maravilla, J. Sifuentes and M. L. Taylor. 1999. Relatedness analices 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.
- Saleena, M. L.**, P. Loganathan, S. Rangarajan, and S. Nair. 2001. Genetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Arachis hypogaea* . *Can. J. Microbiol.* 47 : 118-122.
- Saiki, R. K.**, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis and G. Horn. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350 - 1354.
- Seybold, S. J.**, D. R. Quilici, J. A. Tillman, D. Vanderwel, D. L. Wood, and G. J. Blomquist. 1995. *De novo* biosynthesis of the aggregation pheromone components ipsenol and

- ipsdienol by the pine bark beetles *Ips paraconfusus* Lanier and *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). Proc. Natl. Acad. Sci. 92 : 8393 - 8397.
- Shidfrine, M., and J. H Phaff.** 1956. The association of yeasts with certain bark beetles. Mycologia 48 : 41- 55.
- Siilata, Y. K., D. Sander, and E. J. Keath.** 1995. Genetic diversity in clinical isolates of the dimorphic fungus *Blastomyces dermatitidis* detected by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. J. Clin. Microbiol. 33 : 2171- 2175.
- Stark, R. W.** 1982. Generalized ecology and life cycle of bark beetles. P.p. 21-45. In: *Bark beetles in North American conifers : a system for the study of evolutionary biology.* (J. B Mitton, and K. B. Sturgeon, eds). University of Texas Press, Austin.
- Strauss, R. E.** 1982, Statistical significance of species clusters in association analysis. Ecology. 63 : 634 - 369.
- Szmidt, A. E., X. R. Wang, and M. Z. Lu.** 1996. Empirical assesment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L) using haploid tissue analysis. Heredity 76: 12-420.
- Tigano-Milani, M; R. Honeycutt, L. Lacey, L. McClelland, M. B. Sobral.** 1995. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular makers. J. Invertebr Pathol. 65: 274 - 282.
- Traviso, M.** 2001. Experimental evolution studies yield insights into bacterial diversity. ASM., News. 67 : 403 - 409
- Varderwel, D. and A. C. Oehlschlager.** 1989. Pheromone biosintesis in Coleptera. *Chemica Scripta.* 29 : 401 - 406.
- Welsh, J. and M. McClelland.** 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. Nuc. Ac. Res. 18 : 7218 - 7218.

- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S.V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Ac. Res.* 18 : 6531- 6535
- Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S. V. Tinger.** 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzimology* 218 : 704-740.
- Whitney, S. H.** 1982. Relationships between *bark beetles* and siymbiotic organism. Pp. 65-73. In: *Bark beetles in North American conifers: a system for the study of evolutionary biology.* (J. B. Mitton, and K. B. Sturgeon, eds). University of Texas Press, Austin.
- Wood, S. L.** 1963. A revision of the bark beetle genus *Dendroctonus* Erichson (Coleptera: Scolytidae). *Great Basin Nat.* 23 : 1- 117.
- Wood, S. L.** 1982. The bark and ambrosia beetle of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae). A taxonomic monograph. *Great Basin Nat. Mem.* 6.
- Yamada, Y., M. Maedaand, and K. Mikata.** 1995. The phylogenetic relationships of metano-assimilating yeast based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: The proposal of *Komagataella* gen. Nov. *Biosci. Biot., Biochem.* 59 : 439 - 444.
- Yarrow, D.,** 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Pp. 77-100. In *The yeasts. A taxonomic study.* (C. P. Kurtzman and J. W. Fell eds.). Eisevier Science B. V., Amsterdam.
- Zethner-Moller, O., and J. A. Rudisky.** 1967. Studies of the site of sex phermonone productions in *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Scolytidae). *Ann Entomol. Soc Am.* 60 : 575 - 582.

X. APÉNDICE

Apéndice 1. Matriz de presencia(1)-ausencia(0) de los datos bioquímicos para todas las cepas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
asimilación																																							
glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
galactosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
sucrosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
melicosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
cellobiosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
malibiosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
D-xilosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
D-arabinosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
D-ribosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
D-glucosamina	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
N-acetil	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
salicil	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
melancid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
glucid	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
glucid	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
melancid	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
melancid	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
L-sorbitosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
melancid	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
melancid	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
melancid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L-arabinosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
fermentación																																							
glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
galactosa	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
sucrosa	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
melicosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
lactosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
melicosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
trehalosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Uq Gel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
simón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
crece 37°C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Apéndice 1. Continuación Matriz de presencia (1) ausencia (0) .

	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Ft6	Oroni	Pullman	Rhea	Oroni	
esterilización																								
glucosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
galactosa	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
sucrosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
malta	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
cebada	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
melaza	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
Dulces	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Dextrina	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
Dulzosa	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
Diglucomano	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
Neslé	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
salin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
melado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
elero	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
gluad	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
ulina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
lactosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
salina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
lactato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
melado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
melado	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
Lactosa	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
melado	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
elero	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
Lactosa	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
fermentación																								
glucosa	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
galactosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
sucrosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
malta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
lactosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
salina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
lactosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
Lact. Gl.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
almidón	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NIQ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
ovena3PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Apéndice 4. Continuación Matriz de similitud.

	31	32	33	34	35	36	37	C.G.	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59		
1																																
2																																
3																																
4																																
5																																
6																																
7																																
8																																
9																																
10																																
11																																
12																																
13																																
14																																
15																																
16																																
17																																
18																																
19																																
20																																
21																																
22																																
23																																
24																																
25																																
26																																
27																																
28																																
29																																
30																																
31	1																															
32	0 0002364	1																														
33	0 0631818	0 0645685	1																													
34	0 0631818	0 0645685	1	1																												
35	0 0318182	0 0431818	0 0000962	0 0000962	1																											
36	0 0124234	0 0123457	0 0120582	0 0120582	0 0127308	1																										
37	0 0081729	0 008135	0 0052083	0 0042083	0 0052201	0 0487170	1																									
C.G.	0 0081729	0 008135	0 0052083	0 0042083	0 0052201	0 0	0 0487170	1																								
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN