



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“OBTENCION DE MARCADORES DE REGIONES AMPLIFICADAS DE SECUENCIAS CARACTERIZADAS, PARA LA IDENTIFICACION DEL HONGO *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ERIKA ARROYO VAZQUEZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA DEL ROCIO REYES MONTES

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m341634



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recopional.  
NOMBRE: Erika Arroyo Vázquez

FECHA: 03. MARZO. 2005

FIRMA: 

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

“Obtención de marcadores de regiones amplificadas de secuencias caracterizadas, para la identificación del hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*”.

realizado por Erika Arroyo Vázquez

con número de cuenta 09726953-5, quién cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis

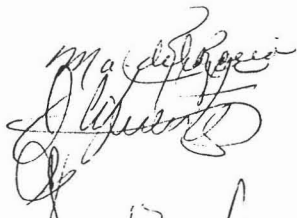


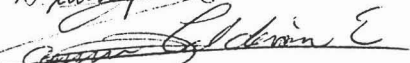
Propietario Dra. María del Rocío Reyes Montes.

Propietario Dr. Joaquín Cifuentes Blanco.

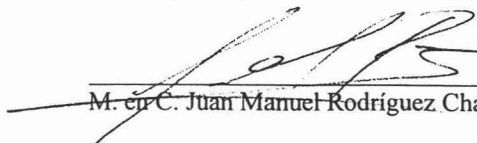
Propietario Dra. Concepción Toriello Nájera.

Suplente Dra. Hermelinda Margarita Villegas Rios.

Suplente Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro.

Consejo Departamental de Biología

  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología Molecular del Departamento de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina. UNAM, bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Reyes Montes y en colaboración con la Dra. Concepción Toriello Nájera.**

**Con la supervisión técnica de la M. en C. Gabina Arenas López**

**Este trabajo fue financiado gracias al “Proyecto Extraordinario” concedido por DGAPA IN206504.**

**La autora fue becaria de la DGAPA en el proyecto IN213303**

## DEDICATORIAS

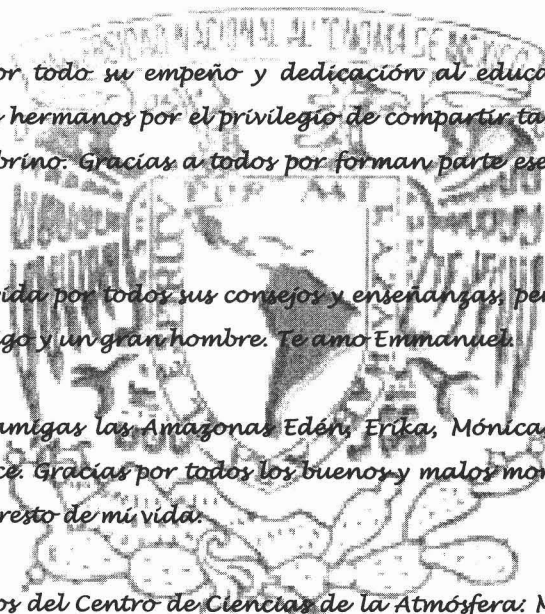
*A Dios por haberme creado.*

*A mis padres por todo su empeño y dedicación al educarme, guiarme y apoyarme. A mis hermanos por el privilegio de compartir tantos recuerdos, a mi cuñada y sobrino. Gracias a todos por formar parte esencial y medular en mi vida.*

*Al amor de mi vida por todos sus consejos y enseñanzas, pero sobre todo por ser mi mejor amigo y un gran hombre. Te amo Emanuel.*

*A mis grandes amigas las Amazonas: Edén, Erika, Mónica, Rocío, Fabiola, Valentina y Dulce. Gracias por todos los buenos y malos momentos los cuales recordaré por el resto de mi vida.*

*A mis compañeros del Centro de Ciencias de la Atmósfera: Martha, Rodrigo, Concepción, Rocío, Selene, Antonio, Alejandro, Carolina e Ivonn, gracias por todas las convivencias.*



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María del Rocío Reyes Montes por la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Micología Molecular en la Facultad de Medicina, por su apoyo siempre constante y por el gran ser humano que es.

A la Dra. Concepción Toriello Nájera jefa del Laboratorio de Micología Básica por proporcionarme los cultivos monospóricos del hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, esenciales para la realización de todo el trabajo y por sus sabios consejos en la revisión de la presente.

A mis sinodales el Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, la Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro y la Dra. Margarita Villegas Ríos por sus observaciones tan valiosas en la escritura de la presente tesis.

Agradezco a la QFB. María Guadalupe Frías de León por todas las recomendaciones, asesorías y por su tan importante apoyo en la realización de todo el trabajo, pero sobre todo por su amistad.

A la M. en C. Gabina Arenas López por toda su asesoría en las técnicas y por su amistad. A la QFB. Aurora Hernández Ramírez por su amistad y recomendaciones. A la M. en C. Esperanza Duarte Escalante por las correcciones y sugerencias echas en la presente.

## ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
PLANTEAMIENTO	10
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS PARTICULARES	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA	26
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	52

## RESUMEN

La búsqueda de estrategias y seguimiento del control de plagas agrícolas es de suma importancia, debido a las grandes pérdidas económicas a nivel mundial. En la actualidad, la estrategia más difundida es el control químico sin embargo, su uso presenta el inconveniente de causar daño a la salud y deterioro ambiental, por lo que se ha tratado de eliminar y sustituir por el control biológico, el cual emplea organismos que regulan naturalmente estas poblaciones. Dentro de los organismos utilizados para el biocontrol se encuentran los hongos patógenos de insectos, uno de éstos es *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* que es un hongo mitosporico aislado de la langosta *Schistocerca piceifrons* sp. *piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) y en México se ha utilizado como agente microbiano para esta especie de plaga.

Para el seguimiento e identificación de *M. anisopliae* se cuenta con numerosas pruebas fenotípicas de laboratorio aunque éstas presentan limitaciones. Por tal razón, resulta útil contar con métodos de identificación específicos y de alta sensibilidad, tales como marcadores moleculares tipo SCAR (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada). Trabajos previos de genotipificación de aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* de *S. piceifrons* sp. *piceifrons*, de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima, por medio de RAPD-PCR, utilizando los oligonucleótidos arbitrarios OPA-04 (5'-AATCGGGCTG-3') y OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3'), revelaron que todos los aislamientos de México estudiados, comparten una banda de 289 bp y otra de 526 bp, respectivamente. Éstas, fueron consideradas idóneas para la identificación del hongo. En el presente trabajo, estos marcadores RAPD se emplearon como blanco para la generación de marcadores SCARs.

Se obtuvo DNA del micelio de 16 cultivos monospóricos y 6 cepas de referencia del género *Metarhizium* procedentes de las colecciones CNRCB, de la "Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi", (ARSEF) USA y de la "Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization", (CSIRO) Australia. De éstos, 17 fueron de *M. anisopliae* var. *acridum* (CNRCB y CSIRO), dos de *M. flavoviride* (ARSEF y CSIRO), uno de *M. anisopliae* var. *majus* (ARSEF), otro de *M. anisopliae* var. *lepidiotum* (CSIRO) y uno de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (CSIRO). Del patrón polimórfico generado por

RAPD-PCR, se seleccionaron las bandas, que fueron purificadas, clonadas y secuenciadas a través de los métodos moleculares tradicionales. Las secuencias obtenidas, se compararon con todas las pertenecientes a hongos, depositadas en el GenBank, con el objetivo de descartar cualquier homología con otros hongos. De las bandas clonadas, secuenciadas y comparadas en el GenBank, se eligió una secuencia a partir de la cual se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos por cada banda seleccionada del RAPD-PCR de *M. anisopliae* var. *acidum*. Estos oligonucleótidos específicos (Ma-160<sub>OPA-05-a</sub>, Ma-160<sub>OPA-05-b</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-a</sub>, Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>) amplificaron una banda de 160 y 151 bp, respectivamente. La especificidad de los mismos se determinó por PCR utilizando DNA de *M. anisopliae* var. *acidum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, cepas de referencia de las especies y variedades relacionadas, así como de los hongos *Paecilomyces fumosoroseus* y *Verticillium lecanii*.

De igual manera se evaluó la sensibilidad de los marcadores SCARs resultando de 25 pg de DNA. También se realizó la hibridación con las sondas obtenidas (Ma-160<sub>OPA-05</sub> y Ma-151<sub>OPA-04</sub>), confirmándose la especificidad de los marcadores hacia *M. anisopliae* var. *acidum*. De los resultados obtenidos, consideramos que esta herramienta molecular es muy importante para la identificación del hongo en los campos agrícolas donde se usa como bioinsecticida, ya que a la fecha no se cuenta con este tipo de marcadores para la identificación de *M. anisopliae* var. *acidum*.



## INTRODUCCIÓN

La langosta *Schistocerca piceifrons* sp. *piceifrons* (Walker) es una de las plagas agrícolas más relevantes en el sureste del territorio mexicano y es considerada como plaga potencial para otros estados de la vertiente del Golfo de México y del Pacífico. Debido a la capacidad reproductiva de este organismo, se ha convertido en una plaga devastadora (SAGAR, 2000). El control químico contra esta plaga ha afectado a la salud humana, fauna silvestre y doméstica, además ha propiciado el desarrollo de resistencia en los insectos. Como control alternativo y de manera preventiva e integral surge el hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Metsch.) Sorokin, inocuo para el hombre y el ambiente, biorregulador natural de la langosta (SAGARPA, 2001). Actualmente, *M. anisopliae* var. *acridum* (antes *M. flavoviride*), es considerado como un buen agente microbiano en el control de acrididos plaga, ya que en condiciones climáticas adversas de alta temperatura y humedad relativa baja, puede producir infección en estos insectos (Goettel *et al.* 1995; Douglas *et al.* 1999). *M. anisopliae* var. *acridum* es un hongo haploide, mitospórico (Bidochka *et al.* 2001) que presenta fiálides estrechas y cadenas largas de conidios elipsoidales que van de un color verde claro a verde amarillo. Este hongo fue inicialmente encontrado en escarabajos, saltamontes y suelos agrícolas de Alemania (Rombach *et al.* 1986). Recientemente se ha aislado de varias especies de acrididos como *Schistocerca gregaria* Forskol (Prior *et al.* 1992) y *S. piceifrons* sp. *piceifrons* (Hernández *et al.* 1997).

Para valorar el impacto de los micoinsecticidas liberados en el campo, es necesario un seguimiento, para observar su persistencia en el ambiente. Con este fin se han utilizado varias técnicas fenotípicas como son: la identificación morfológica (macro y micromorfología), análisis de isoenzimas y serología, desafortunadamente estas herramientas no distinguen al hongo introducido de los aislamientos autóctonos, por tal motivo se ha implementado el uso de técnicas de biología molecular, como es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Hegedus y Khachatourians (1996) diseñaron oligonucleótidos específicos para la identificación y diferenciación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, por medio de PCR y SSCP (Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla). Ward, E (1995), modificó las

condiciones de la PCR para la identificación específica de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Sacc.) Arx y Oliver, con el propósito de evitar el reconocimiento de las variedades *tritici* y *avenae*.

Posteriormente, otros autores implementaron el uso de marcadores moleculares, los cuales son altamente específicos y sensibles en ensayos de PCR para la identificación y detección de muchos hongos patógenos, entre estos marcadores están los SCARs (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada), que se obtienen a partir de patrones polimórficos con diferentes técnicas, como RAPD (Polimorfismo del DNA Amplificado al Azar) y AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), en los que se elige un marcador y a partir de su secuencia se diseñan oligonucleótidos específicos para la amplificación específica del DNA del organismo a estudiar (Abbasi *et al.* 1999). Además, permiten la identificación de aislamientos ambientales sin la necesidad de generar cultivos monospóricos y facilitan el manejo de una gran cantidad de muestras (Castrillo *et al.* 2003). Los marcadores SCARs resultan útiles en la construcción de bibliotecas genómicas, en el control biológico para estudiar la persistencia de cepas en el campo y en la identificación de híbridos en plantas. Además, permiten detectar el nivel de inóculo que persiste en el ambiente después de su aplicación (Castrillo *et al.* 2003). Estos marcadores difieren de los RAPD (Williams *et al.* 1990) en que sus oligonucleótidos están diseñados con base en la secuencia conocida del organismo por lo tanto, son una herramienta importante para el desarrollo de ensayos sensibles y diagnósticos en la amplificación específica del DNA en mezclas de hongos (Abbasi *et al.* 1999). En diferentes áreas de la investigación se han utilizado este tipo de marcadores, entre los que destacan los trabajos de Li *et al.* (1999), quienes obtuvieron un marcador SCAR de *Verticillium dahliae* (Kleb), con el objetivo de diseñar oligonucleótidos específicos para un ensayo competitivo y cuantitativo en la detección de este hongo por PCR. Abbasi *et al.* (1999), eligieron tres marcadores RAPD-PCR del hongo *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain aggr., utilizado en control biológico, con el propósito de convertirlos en marcadores SCARs para la identificación y monitoreo de este organismo directamente de compostas adicionadas con dicho agente, sin necesidad de aislar previamente al hongo. Estos marcadores también pueden identificar genes de resistencia, como lo reportan Chelkowski y Stepień (2001), llevaron a cabo una revisión

bibliográfica de los genes que confieren resistencia a los hongos *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *P. striiformis* y *P. graminis* f. sp. *tritici* encontrados originalmente en *Triticum aestivum* (trigo). Dedryver *et al.* (1996), utilizando STS (Sitios de Secuencias Marcadas) encontraron genes de resistencia, a partir de éstos y generaron un marcador SCAR para la identificación del gen *Lr24* en *Agropyrum elongatum*; de igual manera Robert *et al.* (1999), obtuvieron un marcador SCAR del gen de resistencia *Lr37* de *Aegilops ventricosa*.

Por otra parte, Weber *et al.* (2002), también generaron este tipo de marcadores para utilizarlos en la identificación y evaluación de la progenie de la cepa *Laccaria bicolor* (Maire) P. D., en micorrizas establecidas en plántos de abetos, así como en la tipificación de cepas americanas y europeas. Lewin *et al.* (2002), desarrollaron marcadores alélicos a nivel de DNA, a partir de marcadores SCARs y observaron el SSCP de siete aislamientos de *Leishmania donovani*, lo que permitió la detección de las variaciones intraespecíficas del parásito, además de relacionándolas con el origen geográfico de los aislamientos. Stankiewicz *et al.* (2002), obtuvieron marcadores SCARs para identificar la progenie de manzanas resistentes a la roña, observando que ésta característica se expresa tanto en homocigotos dominantes como en heterocigotos. Castrillo *et al.* (2003), desarrollaron marcadores SCARs a partir de marcadores RAPD-PCR para detectar y estimar la densidad de propágulos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (micoinsecticida comercial), valoraron la eficacia y persistencia de este hongo en el control de la plaga utilizando los marcadores SCARs y el método de dilución en placa para estimar la densidad de los propágulos del hongo por UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Los marcadores SCARs resultaron ser altamente específicos en la identificación del hongo y ambos métodos resultaron recomendables para identificar al agente etiológico y valorar su persistencia en el ambiente. Autores como, Dauch *et al.* (2003) seleccionaron marcadores moleculares SCARs de patrones polimórficos generados por RAPD-PCR para la identificación y detección específica de la cepa *Colletotrichum coccodes* 183088 utilizada como agente de biocontrol para *Abutilon theophrasti* (mala hierba). Este marcador se puede utilizar para el monitoreo del herbicida en el campo. Fernández *et al.* (2003), obtuvieron marcadores SCARs para identificar especies del género *Eimeria* (protozoario unicelular de aves domésticas que produce la enfermedad coccidiosis). Para esto realizaron un extenso

escrutinio con aislamientos de *E. acervulina*, *E. tenella* y *E. maxima* por RAPD, con el objetivo de obtener marcadores SCARs inter e intraspecíficos para la identificación de *Eimeria* spp. Con base en los resultados del RAPD, obtuvieron 25 marcadores SCARs que permiten la identificación de las siguientes especies: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. tenella*. De igual manera, Klinbunga *et al.* (2004), usaron RAPD-PCR para obtener marcadores SCARs con el propósito de identificar especies de abulones; *Haliotis asinima*, *H. ovina* y *H. varia* en aguas tailandesas. Los investigadores obtuvieron siete pares de oligonucleótidos que identificaron a *H. asinima*, un par de oligonucleótidos que identificó a *H. ovina* y un par de oligonucleótidos específicos para *H. varia*.

Lee *et al.* (2004), generaron marcadores SCARs a partir de marcadores RAPD-PCR y de una secuencia conservada de la región 18S rDNA para clasificar e identificar cultivos de *Pyrus pyrifolia* y *P. communis*. Zhang *et al.* (2004), translocaron el gen *Bdv2* de *Thinopyrum intermedium*, que confiere resistencia al virus enano de la cebada amarilla (BYDV), generando diferentes líneas celulares con dicha característica, de estas mutantes se generó un marcador RGAP (Polimorfismo de Genes de Resistencia Análogo) y otro RAPD, ambos marcadores se convirtieron a SCARs, permitiendo la selección de progenie resistente al virus lo cual es una importante alternativa en programas de selección en plantaciones de trigo.

Por otra parte, Gygax *et al.* (2004), obtuvieron marcadores RAPD-PCR en híbridos de manzana *Malus baccata jackii* (uno de los progenitores contenía el gen *Vbj* que confiere resistencia al hongo *Venturia inaequalis*). Del polimorfismo obtenido de estos marcadores, se eligió una banda segregante en el gen *Vbj*, la cual convirtieron en marcadores SCARs, para la detección de cepas resistentes a la roña causada por *V. inaequalis* (Cooke) G. Winter. Tanaka *et al.* (2004), llevaron a cabo RAPD con aislamientos obtenidos de cruza de *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler (shiitake), donde los progenitores tenían el factor de cruce A y B, a partir de los cuales seleccionaron un patrón RAPD que contenía el factor A y otro que contenía el factor B, de éstos se produjeron marcadores SCARs correspondientes a ambos factores, que les permitirá mejorar la producción de shiitake. Wu *et al.* (2004),

obtuvieron tres marcadores SCARs a partir de patrones RAPD de híbridos del olivo *Olea europaea*, estos marcadores tienen la característica de localizar el gen que confiere resistencia a la enfermedad “peacock”.

Frías (2004), empleó la banda de 1.2 Kb generada por RAPD-PCR con aislamientos y cepas de referencia de *Histoplasma capsulatum* (Darling) procedentes de México, Guatemala, Colombia, Panamá, Argentina y Estados Unidos de América, para la generación de marcadores SCARs. Se obtuvieron dos marcadores SCARs a partir de los cuales se diseñaron oligonucleótidos específicos para el hongo. La especificidad de los marcadores se determinó por PCR utilizando DNA de *H. capsulatum* y de otros microorganismos relacionados. Asimismo se evaluó la sensibilidad de los marcadores SCARs resultando altamente específicos.

Otros autores han utilizado la técnica de AFLP (Vos *et al.* 1995) para la obtención de estos marcadores, ésta combina PCR y análisis de fragmentos de restricción para detectar polimorfismos debidos a cambios en o cerca de sitios de enzimas de restricción. Xu *et al.* (2001, 2002), obtuvieron marcadores SCARs a partir de marcadores AFLP, estrechamente ligados al gen *Vf* de la manzana, el cual le confiere resistencia a la roña causada por el hongo *Venturia inaequalis*. De todos los marcadores que generaron, tres fueron inseparables al gen *Vf*, uno se localizó corriente abajo y siete permanecieron corriente arriba del gen *Vf*, lo que les permitió construir un mapa basado en la clonación y secuenciación de dichos marcadores, además de seleccionar cultivos de manzana resistentes a la roña. Jain *et al.* (2004), a partir de marcadores AFLP y RAPD generaron el mapa del gen *Gm8* del arroz, que confiere resistencia a la mosca enana del arroz (*Orseolia oryzae*), del cual se obtuvieron marcadores SCARs que detectan poblaciones resistentes a dicho insecto. Stehlik y Blattner (2004), obtuvieron un marcador SCAR a partir de un patrón AFLP, sólo presente en individuos machos de *Rumex nivalis*, este marcador permite excluir los ejemplares hembras de dicha especie. Linde *et al.* (2004), a partir de marcadores AFLP de rosas híbridas, resistentes al ascomiceto *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr) de Bary (por la presencia del gen *Rpp1*), obtuvieron un marcador SCAR que identifica poblaciones resistentes a dicho hongo.

Los trabajos anteriores muestran que estos marcadores son una herramienta útil en la identificación y tipificación de microorganismos, por lo que en este trabajo se desarrollaron marcadores SCARs, a partir de la elección de patrones polimórficos generados por RAPD-PCR de cultivos monospóricos de México y cepas de referencia de distinto origen geográfico, para seleccionar sondas específicas de *M. anisopliae* var. *acridum*, útiles para identificar aislamientos autóctonos.

## PLANTEAMIENTO

Cano *et al.* 2005 llevaron a cabo la genotipificación de cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* de México (MX) con el objetivo de caracterizar genótipo y fenotípicamente estos cultivos, para ser utilizados como agentes microbianos para el control biológico de la langosta *S. piceifrons* sp. *piceifrons* y que permitieran un menor costo ecológico en los agroecosistemas. La caracterización genotípica de los cultivos monospóricos de México se llevó a cabo utilizando el método RAPD-PCR con 14 oligonucleótidos arbitrarios y el fenograma obtenido mostró que los cultivos de *M. anisopliae* var. *acidum* de México formaron un grupo separado de los 10 clados taxonómicos reconocidos por Driver *et al.* (2000), para el género *Metarhizium*. También reveló que los cultivos de México comparten una banda de 289 y 526 bp obtenidas con los oligonucleótidos OPA-05 y OPA-04, respectivamente. Estas bandas por su especificidad, resultaron idóneas para la obtención de marcadores SCARs, con el propósito de obtener sondas específicas, para identificar aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum*, particularmente los aislamientos de MX, ya que se ha observado una gran variabilidad genotípica entre aislamientos de diferentes regiones geográficas del mundo (Cobb y Clarkson, 1993; Leal *et al.* 1994; Bidochka *et al.* 1994, 2001; Driver *et al.* 2000; Pantou *et al.* 2003; Cano *et al.* 2005).

## JUSTIFICACIÓN

No obstante que se cuenta con numerosas pruebas de laboratorio para monitorear hongos entomopatógenos en el campo, éstas presentan limitaciones, por lo que resulta necesario contar con métodos de identificación específicos, como los marcadores moleculares tipo SCARs que son una herramienta importante para el desarrollo de ensayos sensibles y diagnósticos en la amplificación específica de DNA en mezclas de hongos. Asimismo, es de gran importancia contar con esta herramienta biológica en México, ya que a la fecha, no hay métodos que permitan confirmar la identificación rápida y certera del hongo.

## HIPÓTESIS

Las sondas obtenidas de los marcadores de 289 bp y 526 bp generadas por RAPD-PCR de *M. anisopliae* var. *acidum* son específicas para la identificación de dicho hongo.

## OBJETIVO GENERAL

1. Obtener marcadores SCARs a partir de marcadores RAPD-PCR de cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* procedentes de México.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar las bandas de 289 y 526 bp, a partir del patrón RAPD-PCR de cultivos de *M. anisopliae* var. *acidum* procedente de México.
2. Secuenciar las bandas clonadas y diseñar oligonucleótidos específicos para *M. anisopliae* var. *acidum* procedente de México.
3. Determinar la especificidad y sensibilidad de los marcadores SCARs con DNA de *M. anisopliae* var. *acidum* de México, cepas de referencia y de otros hongos.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislamientos fúngicos

El origen de los 16 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* analizados en este trabajo, se muestran en la Tabla 1. Los originales fueron aislados de la langosta (*S. piceifrons* sp. *piceifrons*) y pertenecen a la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima, México. Paralelamente, se analizaron 11 cepas de referencia del género *Metarhizium* (Tabla 2) de las colecciones ARSEF (Estados Unidos de América –USA-) y CSIRO (Australia –AU-); cada una de las cepas representa uno de los diez grupos (clados) taxonómicos de *Metarhizium* propuestos por Driver *et al.* (2000). Todos los aislamientos y cepas están conservadas en el Laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM y se mantienen en suspensiones celulares en agua destilada estéril y aceite mineral (Droguería Cosmopolita, MX), a 4 °C y en glicerol al 10 % en nitrógeno líquido a -196 °C.

**Tabla 1.** Hospedero y origen de los cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

Clave UNAM	Clave CNRCB*	Hospedero	Cultivo	Origen
EH-483/8	<b>MaPL5</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-484/6	<b>MaPL8</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-486/7	<b>MaPL13</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-487/4	<b>MaPL14</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-4887	<b>MaPL15</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-489/1	<b>MaPL16</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-490/1	<b>MaPL18</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-491/8	<b>MaPL20</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-493/1	<b>MaPL22</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-494/4	<b>MaPL26</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-497/7	<b>MaPL29</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-498/8	<b>MaPL31</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima
EH-499/10	<b>MaPL37</b>	<i>S.piceifrons</i>	----	Isla Socorro
EH-500/2	<b>MaPL38</b>	<i>S.piceifrons</i>	----	Isla Socorro
EH-502/8	<b>MaPL40</b>	<i>S.piceifrons</i>	----	Isla Socorro
EH-531/8	<b>MaPL32</b>	<i>S.piceifrons</i>	Pastos	Colima

\*Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

**Tabla 2.** Características de las cepas tipo de referencia del género *Metarhizium* de acuerdo a Driver *et al.* (2000).

Clave UNAM	Clave ARSEF* CSIRO**	Nombre original	Hospedero	Origen	Clado*** (grupo)	Nombre actual
EH-525	1941*	-	<i>Nephotettix virescens</i> (Homoptera)	Filipinas	1	<i>M. album</i>
EH-529	2948*	<i>M. f.<sup>1</sup> var. minus</i>	Homoptera	Brasil	2	<i>M. flavoviride</i> Tipo E
EH-534	FI-698**	<i>M. a.<sup>2</sup> var. anisopliae</i>	Lepidoptera	Nueva Zelanda	3	<i>M. f.<sup>1</sup> var. novazealandicum</i>
EH-573	FI-72**	<i>M. a.<sup>2</sup> var. anisopliae</i>	<i>Pemphigus trehemi</i> (Homoptera)	Inglaterra	4	<i>M. f.<sup>1</sup> var. pemphigus</i>
EH-528	2037*	-	<i>Niliparvata lugens</i> (Homoptera)	Filipinas	5	<i>M. f.<sup>1</sup> var. minus</i>
EH-527	1184*	-	<i>Otiorhynchus sulcatus</i> (Coleoptera)	Francia	6	<i>M. f.<sup>1</sup> var. flavoviride</i>
EH-530	FI-985**	<i>M. a.<sup>2</sup> var. anisopliae</i>	<i>Austracris guttulosa</i> (Orthoptera)	Australia	7	<i>M. a.<sup>2</sup> var. acridum</i>
EH-535	FI-987**	<i>M. f.<sup>1</sup> var. minus</i>	<i>Ornithacris cavroisi</i> (Orthoptera)	Nigeria	7	<i>M. a.<sup>2</sup> var. acridum</i>
EH-532	FI-147**	<i>M. a.<sup>2</sup> var. anisopliae</i>	<i>Lepidiota consobrina</i> (Coleoptera)	Australia	8	<i>M. a.<sup>2</sup> var. lepidiotum</i>
EH-526	1914*	-	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	Filipinas	10	<i>M. a.<sup>2</sup> var. majus</i>

\*Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, USA.

\*\*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia.

\*\*\*Clados de *Metarhizium* caracterizados genó y fenotípicamente por Driver *et al.* (2000).

*M. f.<sup>1</sup>* = *Metarhizium flavoviride*

*M. a.<sup>2</sup>* = *Metarhizium anisopliae*

### **Medio de cultivo y condiciones de crecimiento**

A partir de cada cultivo monospóricico de *M. anisopliae* var. *acridum* y de las cepas de referencia, se obtuvo el crecimiento micelial en medio de Sabouraud (glucosa 40 %, peptona de caseína 10 %) adicionado con extracto de levadura al 10 % en agitación a 28 °C, durante 1 semana. La biomasa micelial se separó por filtración en papel filtro.

### **Extracción del DNA genómico**

El rompimiento celular de toda la masa micelial obtenida por filtración se realizó en presencia de nitrógeno líquido en un mortero hasta la obtención de un polvo fino, el cual fue colocado en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron 600 µl de amortiguador de lisis (Tris-HCl pH 7.1, 50 mM; EDTA pH 8, 50 mM; SDS 3 % y 2-mercaptoetanol 1 %), a cada tubo y se agitaron por unos minutos. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm, 4 °C, por 5 min y al sobrenadante se le adicionaron 2 µL de proteinasa K 200 µg/mL (GIBCO Laboratorios, Grand Island, NY, USA) por cada 100 µL de sobrenadante y se incubaron 90 min a 55 °C. Posteriormente, se agregaron 2 µL de RNAsa A 50 µg/mL (Qiagen GmbH Hilden, Germany) por cada 100 µL de sobrenadante y se incubaron 2 horas a 37 °C. Los ácidos nucleicos se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 8, a -20 °C hasta el día siguiente. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) centrifugando a 14 000 rpm, 4 °C, por 5 min, para obtener el botón de DNA, el cual se lavó con etanol al 70 % y centrifugó a 14 000 rpm, 4 °C, por 5 min. Finalmente, se resuspendió el DNA en 50 µL de agua grado MilliQ estéril. La concentración del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, comparando con concentraciones conocidas del fago λ (GIBCO) de 50,100 y 150 ng.

### **Polimorfismo del DNA amplificado al azar por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR)**

Se trabajó con dos iniciadores de 10 nt, OPA 04 (5'-AATCGGGCTG-3') y OPA 05 (5'-AGGGGTCTTG-3') (Operon Technologies Inc. Alameda, CA), previamente probados con excelentes resultados para *M. anisopliae* var. *acridum* por Cobb y Clarkson (1993) y Cano *et al.* (2005). El método de RAPD-PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: en

tubos para PCR de 200  $\mu\text{L}$  en un volumen final de reacción de 25  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción contenía amortiguador de PCR (1X);  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM; deoxinucleótido trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) 200  $\mu\text{M}$ ; oligonucleótido (Operon Technologies) 100 pmoles; DNA10 ng; AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Roche) 1 U, ajustando el volumen con agua de grado MilliQ.

### **Programa de amplificación**

Se utilizó un termociclador iCycler™ (BioRad, Hercules, CA) y el siguiente programa de amplificación: un ciclo de 5 min a 94 °C; seguido por 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 1 min a 32 °C y 2 min 72 °C; 45 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 35 °C y 2 min a 72 °C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5X a un pH de 8-8.2 (Tris-Base 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM). El estándar de tamaño molecular usado fue el 123 bp DNA Ladder (Invitrogen TECH-LINE<sup>SM</sup> USA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para visualizar las bandas. El gel se corrió usando el mismo amortiguador a 85 V/42  $\text{cm}^2$ . La documentación de imágenes de los geles se realizó con un Fotodocumentador Synoptics (Syngene, Cambridge, UK) y se imprimieron en una impresora térmica Sony 650 (Sony Electronics Inc.; Park Ridge, N. J). El tamaño de los fragmentos se calculó con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distancia de la migración del fragmento amplificado (cm)}}{\text{distancia del centro del pozo hasta la mitad de la primera banda de la escala de 123 bp (cm)}}$$

Con estos datos se graficó el valor de Rf (abscisas) contra los pesos moleculares del marcador de peso molecular de 123 pb (ordenadas), y a partir de esta curva calibrada se estimó el peso molecular de los fragmentos seleccionados.

### **Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por RAPD-PCR**

Los fragmentos seleccionados se cortaron y purificaron usando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), tales fragmentos se pesaron de forma que no excedieran los 400 mg/tubo, se les adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de amortiguador QG y se incubaron a 50 °C, 10 min hasta que se disolvió la agarosa. Se transfirieron 800  $\mu\text{L}$  a la columna y se centrifugó a 10 000 rpm,

1 min. Este paso se repitió hasta utilizar todo el volumen, a continuación se lavó con 750  $\mu\text{L}$  de amortiguador PE y se centrifugó a 10 000 rpm, 2 min. La columna se transfirió a un tubo eppendorf para coleccionar los fragmentos de DNA eluyéndolos con 30  $\mu\text{L}$  de agua grado MilliQ. La pureza de los fragmentos se verificó por electroforesis en agarosa al 1.5 %.

Los fragmentos amplificados (amplicones) purificados se reamplificaron con el propósito de obtener un mayor número de copias y adicionarles en el extremo 3' una cola de adeninas utilizando la TaqDNA polymerase recombinant (Invitrogen TECH-LINE<sup>SM</sup> BRASIL) y con las condiciones de amplificación que generaron el fragmento. El producto de la segunda amplificación se purificó usando el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany). A 100  $\mu\text{L}$  de reacción de PCR se le adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de enlace, ésta mezcla se transfirió a una columna y se centrifugó a 14 000 rpm, 1 min. Se decantó el sobrenadante, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado y se centrifugó a 14 000 rpm, 1 min. Se realizó otro lavado con 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado y se centrifugó, por último se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL donde se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de agua grado MilliQ y centrifugó para obtener los amplicones purificado de la PCR.

### **Clonación de los fragmentos purificados**

Los amplicones finales recuperados se concentraron al vacío (Instrumental Speed Vac System AES1010) durante 2 h y se resuspendieron en 5  $\mu\text{L}$  de agua grado MilliQ estéril. Para determinar la pureza del producto purificado, se analizaron 2  $\mu\text{L}$  en agarosa al 1.5 %. La ligación se realizó con 2  $\mu\text{L}$  de los amplicones purificados, 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 2X, 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA Ligasa, 1  $\mu\text{L}$  del vector pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) (Fig.1) y se ajustó a 10  $\mu\text{L}$  de volumen final con agua grado MilliQ. La mezcla se mantuvo a 4 °C toda la noche y se inactivó la enzima a 75 °C, 7 min. Los productos de la ligación, que incluyen los fragmentos amplificados en el vector pGEM®-T Easy Vector (plásmidos), se transformaron en células competentes *E. coli* JM109 (método descrito posteriormente). Las colonias bacterianas resistentes a ampicilina (marcador de selección) se sembraron en medio Luria líquido con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a 37 °C

con agitación durante toda la noche. A partir de estos cultivos, los plásmidos se purificaron por el método alcalino y enzimático descrito mas adelante.

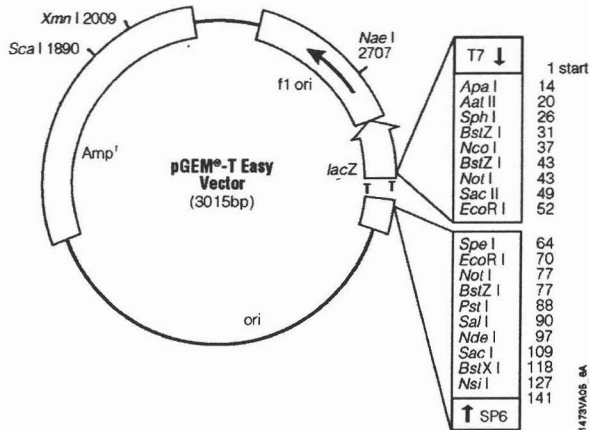


Figura 1. Vector de clonación pGEM®-T Easy.

### Preparación de células competentes

La cepa de *E. coli* JM-109 se sembró en un tubo de 5 mL con medio Luria (triptona 3 %, extracto de levadura 3 % y cloruro de sodio 1 %) sin antibiótico y se incubó toda la noche a 37 °C en agitación vigorosa. Se transfirió 400 µL del cultivo anterior a 100 mL de medio Luria fresco y se incubó a 37 °C en agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 550 nm. Los cultivos se centrifugaron en tubos de 50 mL a 2 500 rpm, durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 30 mL de TfbI pH 5.8 (KOAc 0.29 %; MnCl<sub>2</sub> 0.99 %; KCl 0.75 %; CaCl<sub>2</sub> 0.15 % y glicerina 12 %) y la suspensión celular se incubó en hielo durante 90 min. Después de la incubación, las células de *E. coli* se centrifugaron a 2 000 rpm por 5 min a 4° C, el paquete celular se resuspendió en 3 mL de TfbII pH 7.0 (MOPS, 2.1 %; CaCl<sub>2</sub> 1.1 %; KCl 0.07 % y glicerina 12 %). Finalmente, se colocaron alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf de 1.5 mL y se conservaron a -70 °C hasta su uso.

### **Transformación de *E. coli***

Las células competentes JM-109 se descongelaron sobre hielo, y a la suspensión de células se adicionó 1  $\mu\text{L}$  del producto de ligación. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 min e inmediatamente se dio un choque térmico a 42 °C por 90 s, y se regresaron las células al hielo por 2 min. Se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de medio Luria a las células competentes y se incubaron a 37 °C en agitación por 2 h. Después se centrifugaron a 3 000 rpm 5 min y se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$ , se inocularon 100  $\mu\text{L}$  del cultivo en cajas Petri con medio de selección (Luria/ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ /IPTG-Isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido 0.1M/X-Gal-5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido 20 mg/mL) a 37 °C por 24 h. Finalmente, se seleccionaron las posibles clonas recombinantes (colonias blancas).

### **Purificación de plásmidos en minipreparaciones por método alcalino**

Las clonas seleccionadas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio Luria con el antibiótico de selección a 37 °C por 24 h. El cultivo se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 3 000 rpm por 1 min. Se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de solución I estéril (Glucosa 50mM; Tris-HCl pH 8.0, 25 mM y EDTA pH 8.0, 10 mM) y se homogenizó en vórtex. Posteriormente, se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de solución II (NaOH 0.2N y SDS 1 %) y se mezcló por inversión hasta observar la aparición de hebras de DNA, los tubos se mantuvieron en hielo durante 5 min. Se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de solución III (acetato de potasio 5M 60 % v/v, ácido acético glacial 11.5 % v/v, agua grado MilliQ 28.5 % v/v) manteniéndolos en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 15 000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con un volumen igual de isopropanol a -20 °C por 20 min. Se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, se lavó el botón con etanol al 70 % se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 min, se secaron por vacío durante 2 h, y finalmente se resuspendió el material seco en 20  $\mu\text{L}$  de agua grado MilliQ. La presencia del plásmido se comprobó por electroforesis en agarosa al 1.5 %. Los plásmidos se conservaron a -20 °C.

### **Liberación del fragmento ligado por digestión con *EcoRI***

La liberación de los fragmentos ligados se llevó a cabo en tubos de 0.2 mL, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de plásmido, 2  $\mu\text{L}$  de regulador *EcoRI* 10X (Roche), 1  $\mu\text{L}$  de *EcoRI* (Roche), 1  $\mu\text{L}$  de



RNAse 10 mg/μL (Qiagen) y 6 μL de agua grado MilliQ. Se incubaron a 37 °C 12 horas y se almacenó a 4 °C. Para verificar la liberación de los fragmentos se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5 % en TBE teñida con bromuro de etidio (10 μg/mL), se colocó en cada carril 2 μL de muestra más 2 μL del regulador de cargas y se condujo la electroforesis a 85 V/42cm<sup>2</sup>, 40 min., se utilizó el marcador de tamaño molecular de 123 bp DNA Ladder (Invitrogen) y el marcador de tamaño molecular λHindIII (Roche)/EcoRI (Roche). El marcador de peso molecular se obtuvo digiriendo 10 μL de λHindIII con 2 μL de EcoRI en el amortiguador adecuado a 37 °C durante 24 h. Las bandas se visualizaron con luz UV.

### **Secuenciación y diseño de oligonucleótidos**

Los fragmentos clonados en los plásmidos, se mandaron a secuenciar en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM en un aparato ABI (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA), utilizando los oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo (5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3') y pUC/M13 derecho (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Promega, Madison, WI. USA). Las secuencias obtenidas se editaron, alinearon y compararon con todas las pertenecientes a los hongos depositadas en el GenBank, mediante el programa BLAST 2.2.9 (Altschul *et al.*, 1997), con el objeto de descartar homologías con genes relacionados de hongos entomopatógenos. Posteriormente, se diseñaron los oligonucleótidos específicos de *M. anisopliae* var. *acidum* en el programa Primer3 Input.

### **Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos**

Los oligonucleótidos generados a partir de los fragmentos clonados, fueron utilizados en la amplificación por PCR del DNA plasmídico y el DNA genómico de *M. anisopliae* var. *acidum*. Para la estandarización se hicieron curvas de MgCl<sub>2</sub> (1-2.5mM), de dNTPs (100-200 μM), de DNA (1-5 ng/μL), oligonucleótidos (10-100 pmol/μL) y de igual manera se varió la temperatura de alineamiento entre 55-62 °C para ambos pares de oligonucleótidos. Los productos de amplificación se analizaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5 %. Con las condiciones óptimas de amplificación para *M. anisopliae* var. *acidum*, se evaluó la especificidad con *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Tabla 3a y b), *Paecilomyces fumosoroseus* (Tabla 4), *Verticillium lecanii* (Tabla 5) y las cepas de

referencia (Tabla 2), que representan los diez grupos (clados) taxonómicos de *Metarhizium* propuestos por Driver *et al.* (2000).

**Tabla 3a.** Origen de los cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus*.

Clave UNAM	Clave CNRCB*	Cultivo	Origen
503/3	<b>MBP</b>	<i>Cucumis sativus</i>	Yucatán
504/1	<b>MBP1</b>	<i>Cucumis sativus</i>	Yucatán
505/1	<b>MBCH</b>	<i>Capsicum annuum</i>	Yucatán
506/3	<b>PFCAM</b>	<i>Capsicum annuum</i>	Campeche
507/3	<b>MBPO1N</b>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Colima
508/3	<b>MBPO2N</b>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Colima
509/3	<b>MBPO3A</b>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Colima
510/1	<b>AMBAS1</b>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Colima
511/3	<b>AMBAS2</b>	<i>Citrullus vulgaris</i>	Colima
513/3	<b>AMBAS4</b>	<i>Citrullus vulgaris</i>	Colima
514/4	<b>AMBAS5</b>	<i>Citrullus vulgaris</i>	Colima
516/2	<b>MBPO4</b>	<i>Citrullus vulgaris</i>	Colima
517/6	<b>MBTH</b>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Sinaloa
518/6	<b>MBMAC</b>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Sinaloa
519/2	<b>MBBRT</b>	<i>Solanum melongena</i>	Colima
520/3	<b>PSMB1</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Nayarit

\*Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

**Tabla 3b.** Cepas tipo de referencia de *Paecilomyces fumosoroseus* descritas por Tirano *et al.* (1995).

Clave ARSEF**	CENARGEN/EMBRAPA*	Origen	Hospedero
<b>Grupo 1</b>			
<b>3480</b>	CG 35	Brasil	<i>Cyperus rotundus</i>
<b>Grupo 2</b>			
<b>2956</b>	CG 123	Brasil	<i>Spaethiella sp</i>
<b>3076</b>	CG 203	E. U. A	<i>Bemisia tabaci</i>
<b>Grupo 3</b>			
<b>989</b>	CG323	Japón	<i>Bombyx mori</i>
<b>1645</b>	CG 326	Francia	<i>Musca domestica</i>

\*Centro Nacional de Recursos Genéticos/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria.

\*\*Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, USA.

**Tabla 5.** Hospedero y origen de los cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Clave UNAM	Clave CNRCB*	Hospedero	Cultivo	Origen
EH-172/5	-	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Tuxtepec, Oaxaca
EH-346/4	-	<i>Trialeurodes</i> sp	Berenjena	Guatemala
EH-347/5	-	<i>Trialeurodes</i> sp	Berenjena	Guatemala
EH-465/8	<b>MaZC1A</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz
EH-466/2	<b>MaZC2N</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz
EH-467/6	<b>MaZC3A</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz
EH-468/1	<b>MaGB2A</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz
EH-469/7	<b>MaGB3A</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz
EH-470/6	<b>MaGB4</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz
EH-471/3	<b>MaNL18</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	S. L. Potosí
EH-472/6	<b>MaNP1</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	S. L. Potosí
EH-473/4	<b>MaNL1</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	S. L. Potosí
EH-474/6	<b>MaNL2</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	S. L. Potosí
EH-475/2	<b>MaNM1</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	S. L. Potosí
EH-476/3	<b>MaNM2</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	S. L. Potosí
EH-477/5	<b>MaOPS1</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Oaxaca
EH-478/1	<b>MaOPS2</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Oaxaca
EH-479/2	<b>MaMV</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz
EH-480/8	<b>MaZP</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz
EH-481/1	<b>MaBA</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Veracruz, Tuxtepec, Oaxaca
EH-482/8	<b>MaPA1</b>	<i>Aeneolamia</i> sp	Caña de azúcar	Oaxaca

\*Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

**Tabla 6.** Hospedero y origen de los cultivos monospóricos de *Verticillium lecanii*.

Colección	Clave	Clave UNAM	Hospedero	Plaga de cultivo	Origen
UAM-X*	Aislado C	<b>EH-348/2</b>	<i>Trialeurodes</i> sp.	Frijol	Morelos, MX
HERBARIO-X**	IE-363	<b>EH-457/5</b>	<i>Hemileia vastatrix</i>	Roya del café	Jalapa, Veracruz, MX
HERBARIO-X**	IE-397	<b>EH-458/2</b>	<i>Hemileia vastatrix</i>	Roya del café	Tizal, Veracruz, MX
HERBARIO-X**	IE-388	<b>EH-459/1</b>	<i>Hemileia vastatrix</i>	Roya del café	Nepopoalco, Edo. De México
HERBARIO-X**	IE-393	<b>EH-460/1</b>	<i>Hemileia vastatrix</i>	Roya del café	Ahuacatlán, Puebla, MX

\*Colección del Laboratorio de Microbiología. Depto. El hombre y su ambiente. UAM-Xochimilco.

\*\*Herbario de Xalapa, Ver.

### **Sensibilidad de los oligonucleótidos específicos para la PCR**

Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico detectada por PCR con los pares de oligonucleótidos específicos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>; Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>, la PCR se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas, utilizando DNA de un aislamiento de MX. Éste se cuantificó y posteriormente se hicieron diluciones que contenían las siguientes concentraciones: 5, 1, 0.1, 0.05, 0.025, 0.005 y 0.001 ng/ $\mu$ L.

### **Southern blot**

La transferencia de los patrones polimórficos generados por RAPD-PCR de los cultivos y de las cepas de *Metarhizium* se llevó a cabo de la siguiente manera: el RAPD-PCR se realizó como se mencionó anteriormente, el gel que contenía los patrones del DNA de los cultivos y cepas se tiñó con bromuro de etidio (10  $\mu$ g/ mL). Después se tomó la foto del gel y se expuso durante 5 min a luz UV. Posteriormente, se agregó al gel HCl 0.25 M durante 15 min en agitación, se eliminó el HCl y se agregó agua para eliminar el exceso de ácido. Se colocó el gel en NaOH 0.5 M y se mantuvo en agitación por 20 min, lavando nuevamente. La transferencia de los patrones de DNA contenidos en el gel, se llevó a cabo en un equipo Vacuum Blotter modelo 785 (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA), colocando inicialmente papel filtro Whatman No. 1, posteriormente se colocó la membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, England) y finalmente el gel de agarosa. Se adicionó NaOH y se conectó la bomba de vacío durante 45 min para llevar a cabo la transferencia. La bomba debe marcar en un intervalo de 40 a 50 mm Hg. Concluida la transferencia, la membrana se lavó con SSC 5X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M) y se le agregó 250 mL de la solución (125 mL de SSC 20X en 1 000 mL de agua) para cubrir la membrana, agitándola en un recipiente durante 5 min. La membrana se colocó sobre papel filtro para secarla y se guardó a -4 °C hasta que se realizó la hibridación.

### **Marcaje de la sonda de DNA**

Las sondas de DNA obtenidas por amplificación o por liberación y purificación de fragmentos a partir de los plásmidos recombinantes, fueron marcadas por el método no radioactivo de Random Primers Labeling of DNA Probes (Roche) de acuerdo con la siguiente reacción: a 200 ng/4  $\mu$ L de DNA se les adicionaron 12  $\mu$ L de agua grado MilliQ,

para tener un volumen final de 16  $\mu\text{L}$ . Éstas se calentaron durante 10 min y se colocaron inmediatamente en hielo por 5 min, transcurrido este tiempo se les adicionaron los siguientes reactivos: 2  $\mu\text{L}$  de DIG DNA labeling mix 10X, 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de hexanucleótidos 10X y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima Klenow (2U/ $\mu\text{L}$ ) y se incubó a 37 °C toda la noche. La reacción se detuvo, adicionando 2  $\mu\text{L}$  de EDTA pH 8.0, 0.2 M.

Los productos marcados se cuantificaron, haciendo las siguientes diluciones de los concentrados: 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000 y 1:100 000. Se colocó 1  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones y de los concentrados en una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham), una vez seca la membrana se expuso a luz UV (GS GENE LINKER™, BIO-RAD) y se fijaron las muestras a 50 mJoule. Por último se detectaron por método colorimétrico (se especificará más adelante).

### **Hibridación**

La sonda concentrada se aforó a 200  $\mu\text{L}$  con agua grado MilliQ y se le adicionó 2 mL de solución de prehibridación (Formamida 50 % v/v, SSC 20X 25 % v/v, SDS 0.02 % m/v, solución de bloqueo [Roche] 20 % v/v, N'-lauroylsarcosina 0.1 % m/v). Después se hirvió por 5 min y se colocó inmediatamente en hielo.

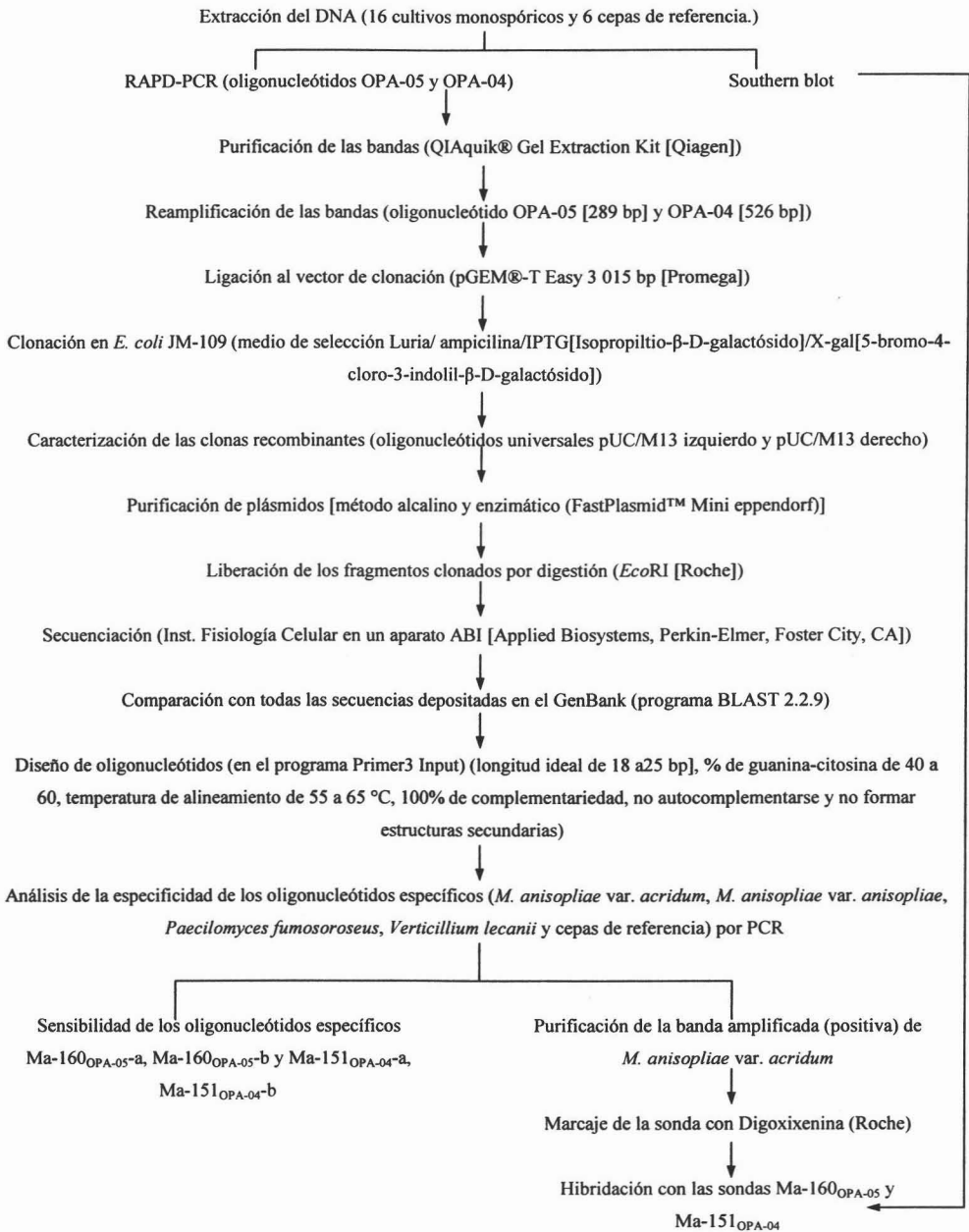
La membrana se colocó en un tubo de hibridación adherida a la pared, cuidando que el lado donde se transfirió el DNA quedara hacia el interior del tubo. Se adicionaron 3.5 mL de solución de prehibridación a la membrana de 100  $\text{cm}^2$  y se incubó toda la noche a 45 °C. Se desechó la solución de prehibridación y se colocó la solución de hibridación (solución de prehibridación con la sonda marcada) incubándose toda la noche a 38 °C. Se recuperó la solución de hibridación y guardó a -20 °C, la membrana se lavó dos veces con 10 mL de amortiguador de baja astringencia (SSC 2X y SDS 0.1 %) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se desechó la solución y posteriormente, se lavó dos veces con 10 mL de amortiguador de alta astringencia precalentado a 65 °C (SSC 0.5X y SDS 0.1 %) y se incubó a 45 °C por 15 min. Se lavó con 10 mL de SSC 2X por unos minutos, se adicionaron 10 mL de solución de bloqueo y se incubó por 30 min en agitación. Se retiró la solución de bloqueo y se agregó la solución del conjugado anti-digoxigenin-AP (Fosfatasa

Alcalina) diluida (1:5 000) en la solución de bloqueo por 30 min en agitación. Después se lavó la membrana dos veces con la solución de lavado durante 15 min en agitación y finalmente, se adicionaron 5 mL de regulador de detección para mantener húmeda la membrana, mientras se prosigue a la detección. La prehibridación e hibridación se llevó a cabo con DIG Wash and Block Buffer Set (Roche).

#### **Detección por método colorimétrico**

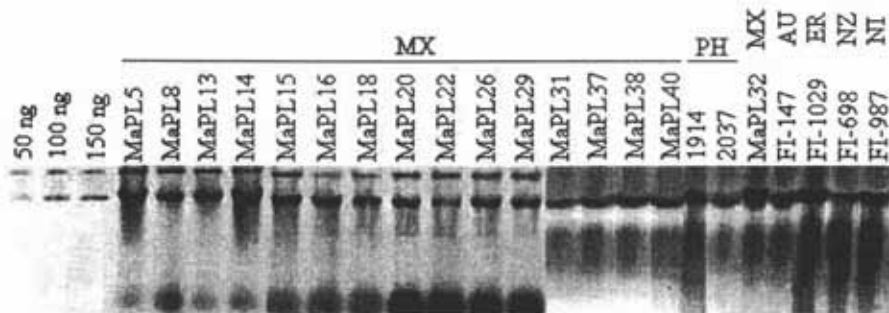
Se mezcló la solución del sustrato, que contenía 100  $\mu$ L de NBT/BCIP stock solution (Roche), en 5 mL de buffer de detección, con ésta solución se cubrió la membrana y se colocó en agitación hasta que aparecieron las bandas coloreadas. La reacción se detuvo colocando la membrana en buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM) por 5 min.

## ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA



## RESULTADOS

**Extracción de DNA genómico.** Se extrajo DNA de un total de 16 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* de México (MX) (Tabla 1) y seis cepas de referencia procedentes de Filipinas (PH), Australia (AU), Eritrea (ER), Nueva Zelanda (NZ) y Nigeria (NI) (Tabla 2), de acuerdo con el método descrito. Posteriormente, se determinó la concentración del mismo comparando 2  $\mu$ L de cada DNA con 50, 100 y 150 ng/ $\mu$ L del fago  $\lambda$  (Fig. 2). Una vez determinada la concentración, se realizaron las diluciones para ajustar cada DNA a 5 ng/ $\mu$ L, para la amplificación por RAPD-PCR. La figura 2 muestra un ejemplo de la determinación de las concentraciones obtenidas de los 16 cultivos de *M. anisopliae* var. *acidum* de MX y las seis cepas de referencia procedentes de PH, AU, ER, NZ y NI. De acuerdo con la concentración determinada se realizaron las diluciones, para ajustar la concentración deseada.



**Figura 2.** Cuantificación de DNA de los cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* procedentes de MX y de cepas de referencia procedentes de PH, AU, ER, NZ y NI. La cuantificación se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio, a 85 V/42 cm<sup>2</sup>. Los primeros tres carriles corresponden a diferentes concentraciones del fago  $\lambda$ .

**Polimorfismo del DNA amplificado al azar por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).** Fueron analizados los DNAs obtenidos de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* y cepas de referencia por RAPD-PCR (Tabla 1 y 2), utilizando los oligonucleótidos OPA-04 y OPA-05.



El perfil RAPD-PCR generado con el oligonucleótido OPA-04 mostró un polimorfismo comprendido entre 4182 y 123 bp (pares de bases) (Fig. 3), de igual manera que el perfil RAPD-PCR generado con el oligonucleótido OPA-05 (Fig. 4). Cada uno de los cultivos y cepas analizadas muestran un patrón polimórfico particular según la región geográfica de la que proceden, e incluso entre los cultivos de MX se encuentran polimorfismos particulares, pero tienen en común las bandas 526 y 289 bp generadas con los oligonucleótidos OPA-04 y OPA-05 respectivamente, que se eligieron como herramientas diagnósticas para la identificación del hongo *M. anisopliae* var. *acidum*.

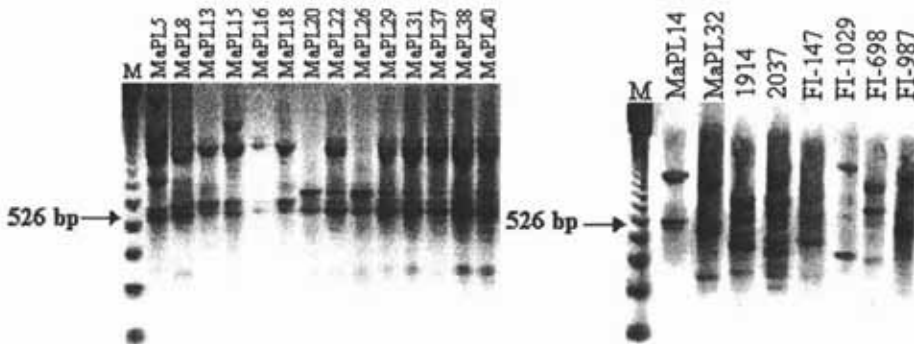


Figura 3. RAPD-PCR de los cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* procedentes de MX y cepas de referencia, generado con el oligonucleótido OPA-04 (5'-AATCGGGCTG-3'). Las flechas indican el amplicon diagnóstico de 526 bp. M: 123 bp DNA Ladder.

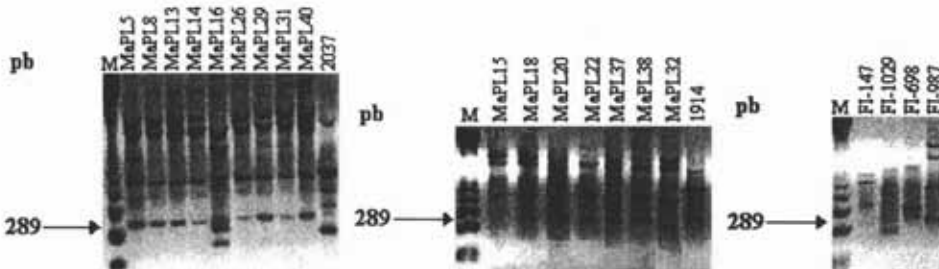
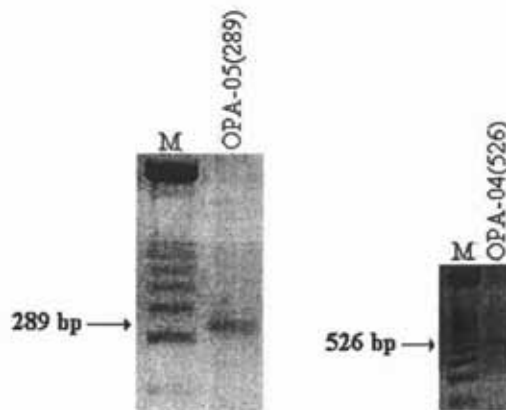
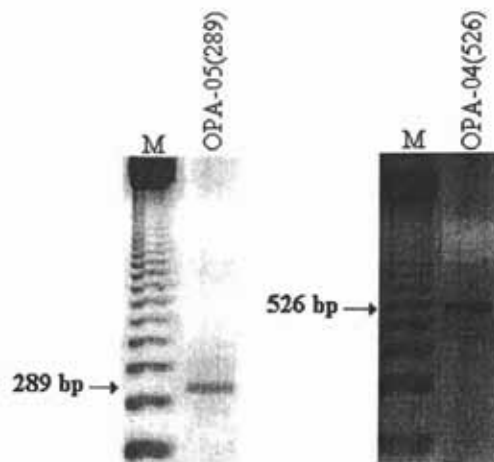


Figura 4. RAPD-PCR de los cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* procedentes de MX y cepas de referencia, el patrón polimórfico se generó con el oligonucleótido OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3'). Las flechas indican el amplicon diagnóstico de 289 bp. M: 123 bp DNA Ladder.

**Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por RAPD-PCR.** La figura 5 muestra las bandas purificadas, en la que se confirmó el tamaño molecular de las bandas de 289 y 526 bp. La figura 6 muestra la reamplificación de dichas bandas, estos amplicones fueron purificados y ligados al vector de clonación pGEM®-T Easy (Promega) para su posterior clonación.



**Figura 5.** Purificación de las bandas de 289 y 526 bp. M: 123 bp DNA Ladder.



**Figura 6.** Reamplificación de las bandas de 289 y 526 bp generadas por los oligonucleótidos OPA-05 y OPA-04 respectivamente, bajo las condiciones iniciales de amplificación por RAPD-PCR. M: 123 bp DNA Ladder.

**Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109.**

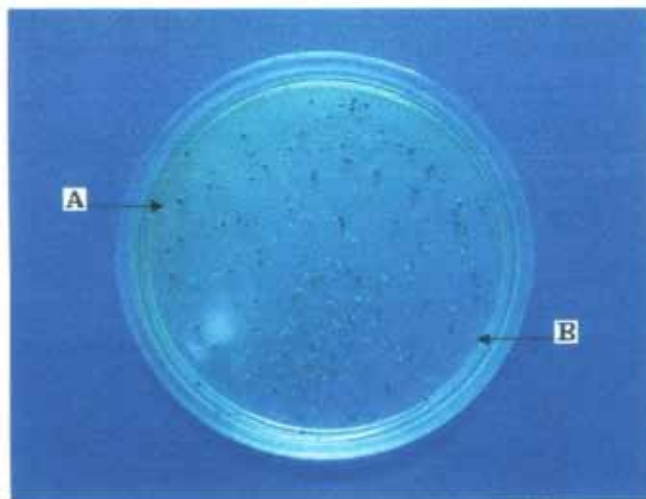
El promedio de las colonias obtenidas fue de 120, por lo que la eficiencia de transformación resultó ser de 120 UFC/0.001 ng DNA, que dio una eficiencia de  $1.20 \times 10^5$  UFC/ng ó  $1.20 \times 10^8$  UFC/ $\mu$ g de DNA. Ésta fue adecuada para la transformación, ya que la eficiencia de transformación mínima requerida es de  $1 \times 10^8$  UFC/ $\mu$ g de DNA (cantidad recomendada por la casa comercial).

**Clonación de los fragmentos purificados.**

Los amplicones 526 y 289 bp generados por los oligonucleótidos OPA-04 y OPA-05 respectivamente, fueron ligados al vector de clonación y el producto de éstos se utilizó para la transformación de células competentes, observando una eficiencia de transformación del 60 %. La selección de las clonas recombinantes se basó en el color que desarrollaron en el medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal, en donde las clonas recombinantes presentan color blanco debido a que la secuencia del gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa se interrumpe al integrar un fragmento de DNA, por lo que las células pierden la capacidad de degradar la X-Gal presente en el medio. Por otra parte, las

clonas que no tienen ningún fragmento integrado, conservan intacta la secuencia de la  $\beta$ -galactosidasa y por consecuencia tienen la capacidad de degradar la X-Gal presente en el medio, desarrollando una pigmentación azul (Fig. 7).

Se eligieron 20 clonas recombinantes y se sembraron en medio LB/ampicilina [100  $\mu$ g/mL] para conservarlas y analizarlas posteriormente.

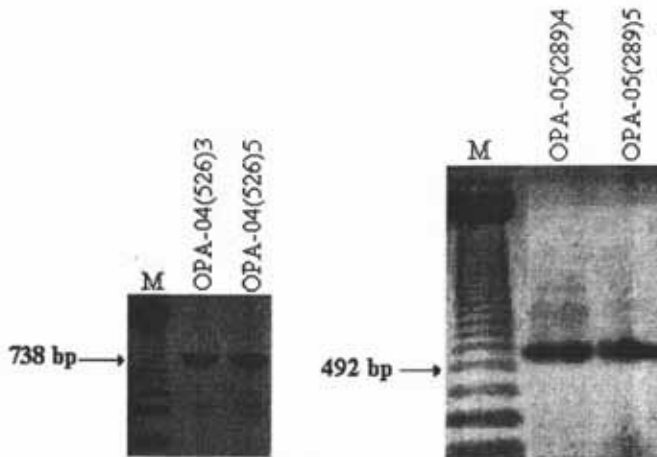


**Figura 7.** Selección de clonas recombinantes obtenidas en medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG. Las clonas que no tienen el fragmento de DNA de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* integrado degradaron el X-Gal desarrollando la pigmentación azul (A). Las clonas que no desarrollaron la pigmentación azul son las que contienen el fragmento de interés (B).

**Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia.** Para verificar que las clonas elegidas realmente contienen los amplicones, se llevaron a cabo dos métodos: 1) liberación de fragmentos recombinantes con la enzima *EcoRI* y 2) PCR en colonia con iniciadores universales, con el material genómico de cada clona, el cual fue liberado calentando a ebullición una muestra de las colonias blancas. Se utilizaron los oligonucleótidos universales: pUC/M13 izquierdo y el pUC/M13 derecho (Promega). Los

productos de amplificación revelaron los dos fragmentos deseados, siendo de 539 y 776 bp (Fig. 8). Cabe mencionar que el tamaño observado en la figura es ligeramente mayor al observado en la reamplificación, debido a que se amplifica tanto el fragmento integrado como una parte del vector, que es de aproximadamente de 250 bp, lo cual incrementa el tamaño del producto de amplificación.

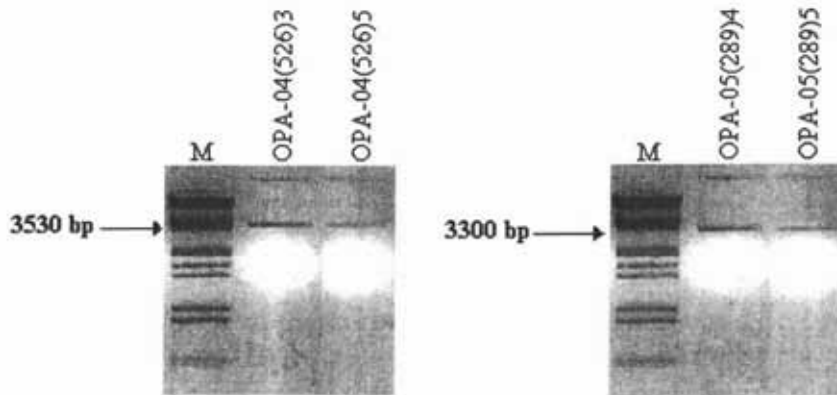
Después de verificar la transformación, se eligieron dos clonas respectivas de cada uno de los fragmentos, dichas clonas se nombraron de la siguiente manera: OPA-04(526)3, OPA-04(526)5, para un fragmento y OPA-05(289)4 y OPA-05(289)5 para el otro fragmento clonado. En donde OPA-04 indica el oligonucleótido empleado para la reamplificación, 526 el tamaño del fragmento clonado en bp y 3 el número de la clona seleccionada.



**Figura 8.** Caracterización de las clonas que contienen los fragmentos de 526 y 289 bp por PCR en colonia, con los oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo y pUC/M13 derecho. M: 123 bp DNA Ladder.

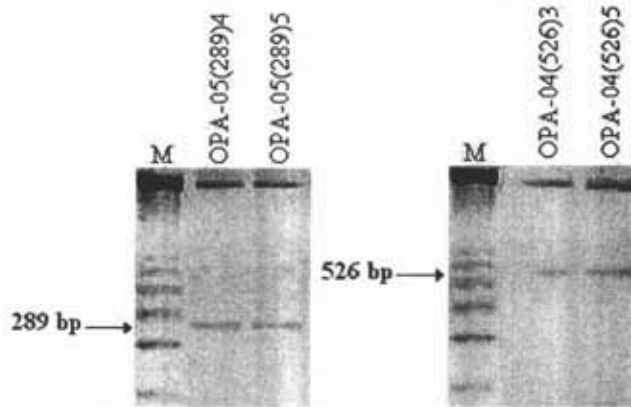
**Purificación de plásmidos por método alcalino.** Una vez verificada la presencia de los fragmentos deseados, los plásmidos de las 4 colonias seleccionadas OPA-04(526)3, OPA-04(526)5, OPA-05(289)4 y OPA-05(289)5 fueron liberados y purificados por el método alcalino como se encuentra especificado en la metodología. Se analizaron por

electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, observando una banda que se encuentra alrededor de los 3300 bp para los plásmidos OPA-05(289)4, OPA-05(289)5 y una banda de aproximadamente 3530 para los plásmidos OPA-04(526)3 y OPA-04(526)5 (Fig. 9). El aumento en el tamaño del vector pGEM®-T Easy (3015 bp), coincide con el tamaño de los fragmentos que se detectaron por PCR en colonia.



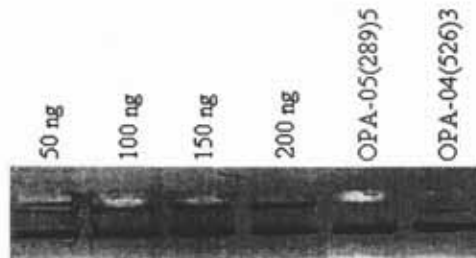
**Figura 9.** Purificación de los plásmidos por método alcalino, de las clonas seleccionadas OPA-05(289)4, OPA-05(289)5, OPA-04(526)3 y OPA-04(526)5. M:  $\lambda$ HindIII digerido con la enzima *EcoRI*.

**Liberación del fragmento ligado por digestión con *EcoRI*.** Los plásmidos obtenidos a partir de las clonas seleccionadas OPA-04(526)3, OPA-04(526)5, OPA-05(289)4 y OPA-05(289)5 fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*. El producto de la digestión se observó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % con el propósito de verificar que el tamaño de los fragmentos fuera el esperado. En la figura 10, se observa que la digestión de las clonas se llevó a cabo adecuadamente, obteniendo los fragmentos esperados de 526 y 289 bp.



**Figura 10.** Liberación de los fragmentos clonados, por digestión con la enzima *EcoRI*. M: 123 bp DNA Ladder.

**Secuenciación.** Con el propósito de obtener suficiente material para la secuenciación de los fragmentos, las clonas OPA-04(526)3 y OPA-05(289)5 se purificaron por el método enzimático utilizando el Kit FastPlasmid™ Mini (Eppendorf, NY, USA) de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial, obteniéndose 100 ng/μL de los plásmidos con los fragmentos, cantidad de 200 ng suficiente para la secuenciación de los fragmentos (Fig. 11).

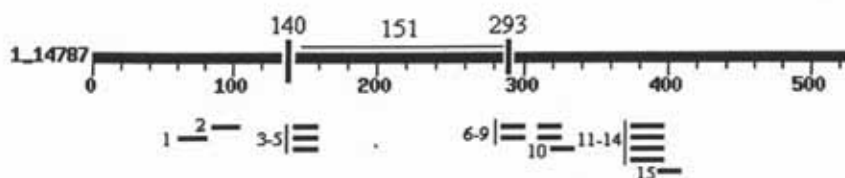


**Figura 11.** Cuantificación de los plásmidos obtenidos por método enzimático. Los cuatro primeros carriles pertenecen a diferentes concentraciones del fago λ.

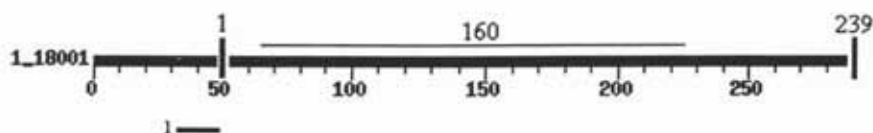
Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa CHROMAS versión 1.48 (<http://www.techneylsium.com.au/chromas.html>) y se alinearon con el programa BLAST 2. 2. 9 (Altschul *et al.*, 1997) con las secuencias de todos los hongos registradas hasta la fecha en el GenBank (2'191,679 secuencias), con el fin de descartar homologías. Se encontró que las secuencias de *M. anisopliae* var. *acridum* comparten ciertas regiones de menos de 25 bp con varios hongos como lo son: *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium tricinctum*, *Gibberella zeae* y *Ophiostoma picea*. Por lo que las secuencias obtenidas de *M. anisopliae* var. *acridum* se acotaron hasta eliminar las regiones compartidas con estos hongos. Las secuencias de 526 y 289 bp se redujeron hasta 153 y 239 bp respectivamente.

Para el diseño de los oligonucleótidos de estas secuencias, se introdujeron en el programa Primer3 Input ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), que toma como base para el diseño de los oligonucleótidos los siguientes parámetros: la longitud ideal de los oligonucleótidos (18-25 bp), el porcentaje de guanina-citosina (40-60%), la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) (55-65 °C), además deben de ser 100 % complementarios al DNA molde, no autocomplementarse, no formar estructuras secundarias que impidan el alineamiento de los oligonucleótidos al DNA molde. Obteniendo como resultado los siguientes pares de oligonucleótidos: el oligonucleótido Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> (5'-TGGTCAGAGCTCACGTCCAC-3') con una  $T_m$ = 63 °C y 60 % GC y el oligonucleótido Ma-151<sub>OPA-04-b</sub> (5'-TGAAGACATTCAGAGGCCAGT-3') con una  $T_m$ = 60 °C y 48 % GC que amplifican una región de 151 pb (Fig. 12); el otro par de oligonucleótidos, el Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> (5'-TGAAGACATTCAGAGGCCAGT-3') con una  $T_m$ = 62 °C y 50 % GC y el oligonucleótido Ma-160<sub>OPA-05-b</sub> (5'-GGCGACGCTCATATTCAACT-3') con una  $T_m$ = 60 °C y 50 % GC que amplifican una región de 160 pb (Fig.13). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX). La concentración de los cuatro oligonucleótidos se ajustó a 100 pmol/  $\mu$ L.





**Figura 12.** Comparación de la secuencia de la clona obtenida OPA-04(526)3 con todas las secuencias registradas en el GenBank. Las líneas negras indican las regiones compartidas con otros hongos: 1 y 15 *Gibberella zeae*, 2 y 6-9 *Neurospora crassa*, 3-5 y 11-14 *Saccharomyces cerevisiae* y 10 *Fusarium tricinctum*. La línea vertical con el número 151, indica la región amplificada por los oligonucleótidos específicos para *M. anisopliae* var. *acridum*.

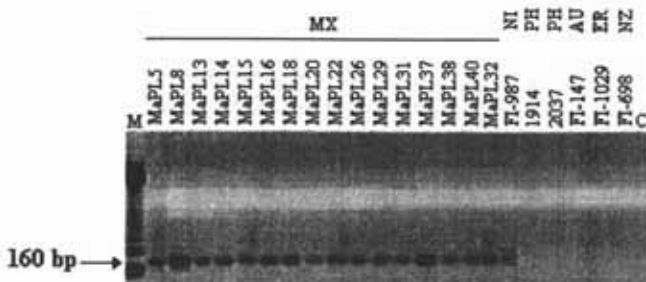


**Figura 13.** Comparación de la secuencia de la clona obtenida OPA-05(289)5 con todas las secuencias registradas en el GenBank. La línea negra indica la región compartida con: 1 *Ophiostoma piceae*. La línea vertical con el número 160, indica la región amplificada por los oligonucleótidos específicos para *M. anisopliae* var. *acridum*.

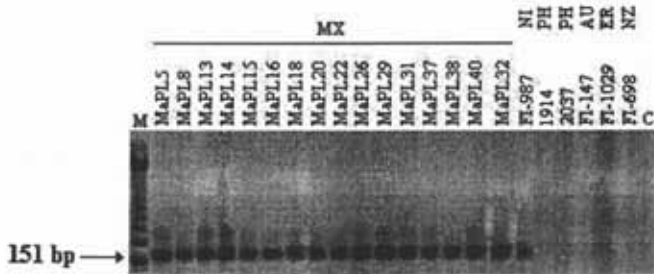
**Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos.** Para la estandarización de la PCR con los oligonucleótidos específicos se utilizó el aislamiento MaPL15. Las condiciones óptimas de la PCR para el par de oligonucleótidos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub> fueron las siguientes: un volumen final de 25  $\mu$ L con 10 ng de DNA genómico; dNTP 0.2 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; oligonucleótido 10 pmoles de cada uno y Taq DNA polimerasa 0.5U en amortiguador de PCR 1X. El programa de amplificación óptimo consistió de un ciclo de 3 min a 94 °C; 25 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a 62 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C. Estas condiciones de reacción fueron las ideales para la amplificación selectiva de los DNAs de *M. anisopliae* var. *acridum*, ya que sólo se amplificó la banda específica de 160 bp con los oligonucleótidos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>. Las condiciones óptimas de la PCR para el par de oligonucleótidos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub> fueron las siguientes: un

volumen final de 25  $\mu$ L con 10 ng de DNA genómico; dNTP 0.2 mM;  $MgCl_2$  1 mM; oligonucleótido 10 pmoles de cada uno y *Taq* DNA polimerasa 0.5U en amortiguador de PCR 1X. El programa de amplificación óptimo consistió de un ciclo de 3 min a 94 °C; 25 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C. Estas condiciones de reacción fueron las ideales para la amplificación selectiva de los DNAs de *M. anisopliae* var. *acridum*, ya que sólo se amplificó la banda específica de 151 bp con los oligonucleótidos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>.

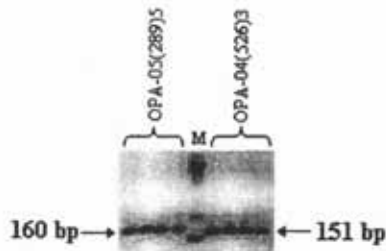
Para probar la especificidad de los oligonucleótidos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>, se utilizaron DNAs de *M. anisopliae* var. *acridum* y cepas de referencia, mostrando que no hay amplificación inespecífica con ninguno de los DNAs de las cepas de referencia que no pertenecen a la var. *acridum* (Fig. 14). En el caso de los oligonucleótidos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>, tampoco se observó ninguna amplificación inespecífica con las cepas de referencia (Fig. 15). La figura 16 muestra la detección con los dos pares de oligonucleótidos específicos en los plásmidos recombinantes obtenidos a través del método enzimático, y en la figura 17 se muestra la detección en los DNAs de cepas de referencia procedentes de Filipinas (PH), Australia (AU), Brasil (BR), Francia (FR) e Inglaterra (GB); los cuales representan cinco clados taxonómicos de los 10 clados propuestos por Driver *et al.* (2000).



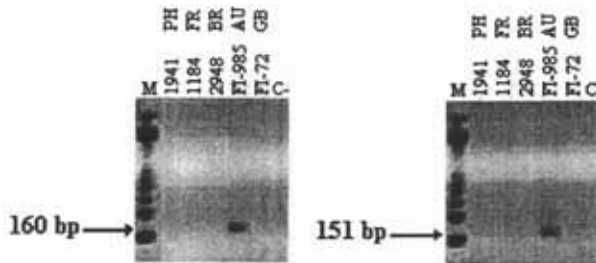
**Figura 14.** Amplificación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* y cepas de referencia diferentes al hongo mencionado, con los oligonucleótidos específicos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>. M: 123 bp DNA Ladder.



**Figura 15.** Amplificación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* y cepas de referencia diferentes al hongo mencionado, con los oligonucleótidos específicos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>. M: 123 bp DNA Ladder.

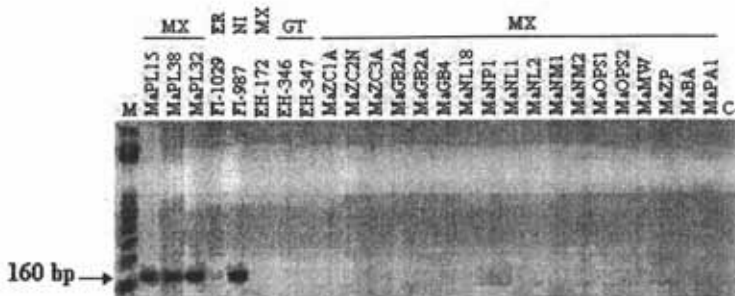


**Figura 16.** Amplificación con los pares de oligonucleótidos específicos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>; Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>, en los plásmidos recombinantes. M: 123 bp DNA Ladder.

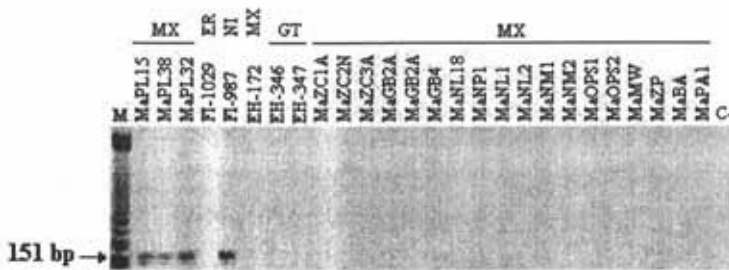


**Figura 17.** Amplificación con los pares de oligonucleótidos específicos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>; Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>, en los DNAs de cepas de referencia. La cepa FI-985 procedente de AU corresponde a la var. *acridum*. M: 123 bp DNA Ladder

Para probar la especificidad de estos oligonucleótidos se utilizaron DNAs de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Verticillium lecanii*, mostrando que no hay amplificación inespecífica con ninguno de éstos hongos. La figura 18 muestra la PCR de 21 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, 4 cultivos de *M. anisopliae* var. *acridum* y 1 cepa de referencia con los oligonucleótidos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>, resultando la amplificación sólo con los cultivos de *M. anisopliae* var. *acridum*. La figura 19 muestra la PCR de 21 cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, 4 cultivos de *M. anisopliae* var. *acridum* y 1 cepa de referencia con los oligonucleótidos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>, resultando la amplificación sólo con los cultivos de *M. anisopliae* var. *acridum*.

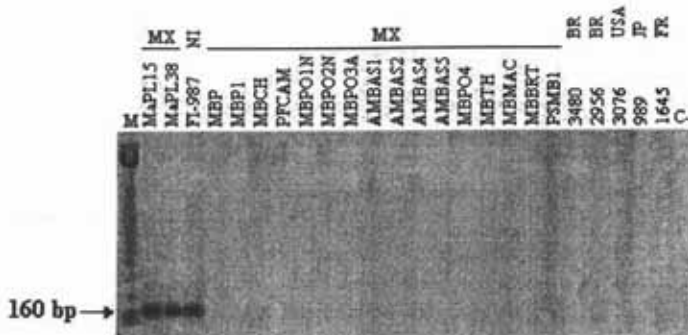


**Figura 18.** Amplificación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* y *M. anisopliae* var. *anisopliae* con los oligonucleótidos específicos Ma-160<sub>OPA-05</sub>-a y Ma-160<sub>OPA-05</sub>-b. M: 123 bp DNA Ladder.

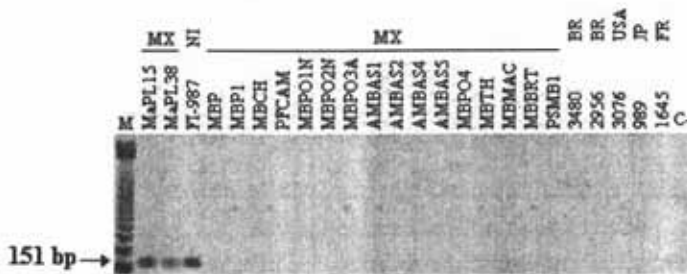


**Figura 19.** Amplificación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* y *M. anisopliae* var. *anisopliae* con los oligonucleótidos específicos Ma-151<sub>OPA-04</sub>-a y Ma-151<sub>OPA-04</sub>-b. M: 123 bp DNA Ladder.

La figura 20 muestra la PCR de 21 cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus* y 3 cultivos de *M. anisopliae* var. *acidum* con los oligonucleótidos Ma-160<sub>OPA-05</sub>-a y Ma-160<sub>OPA-05</sub>-b, resultando la amplificación sólo con los cultivos *M. anisopliae* var. *acidum*. La figura 21 muestra la PCR de 21 cultivos monospóricos de *P. fumosoroseus* y 3 cultivos de *M. anisopliae* var. *acidum* con los oligonucleótidos Ma-151<sub>OPA-04</sub>-a y Ma-151<sub>OPA-04</sub>-b, resultando la amplificación sólo con los cultivos de *M. anisopliae* var. *acidum*.

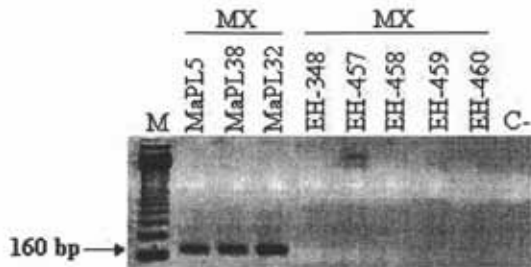


**Figura 20.** Amplificación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* y *P. fumosoroseus* con los oligonucleótidos específicos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>. M: 123 bp DNA Ladder.

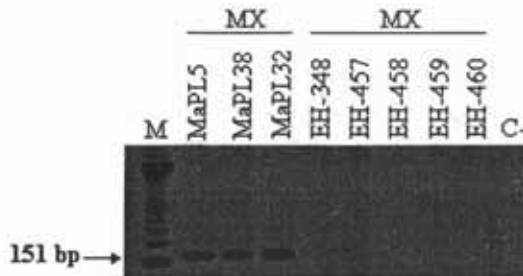


**Figura 21.** Amplificación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* y *P. fumosoroseus* con los oligonucleótidos específicos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>. M: 123 bp DNA Ladder.

La figura 22 muestra la PCR de 5 cultivos monospóricos de *Vertillium lecanii* y 3 cultivos de *M. anisopliae* var. *acridum* con los oligonucleótidos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>, resultando la amplificación sólo con los cultivos de *M. anisopliae* var. *acridum*. La figura 23 muestra la PCR de 5 cultivos monospóricos de *V. lecanii* y 3 cultivos de *M. anisopliae* var. *acridum* con los oligonucleótidos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>, resultando la amplificación sólo con los cultivos de *M. anisopliae* var. *acridum*.

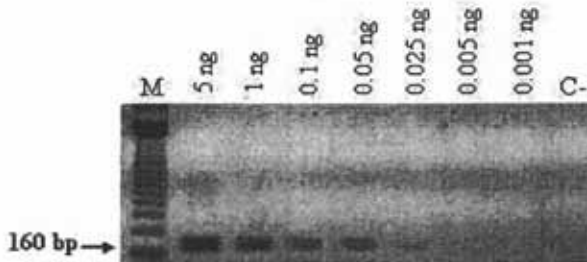


**Figura 22.** Amplificación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* y *V. lecanii* con los oligonucleótidos específicos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>. M: 123 bp DNA Ladder.

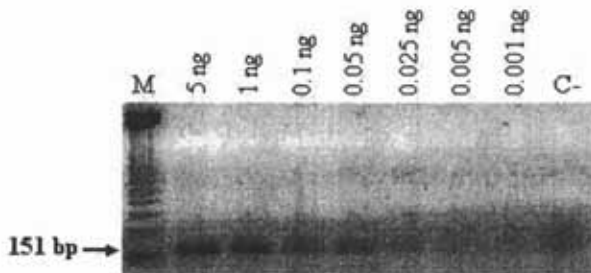


**Figura 23.** Amplificación de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* y *V. lecanii* con los oligonucleótidos específicos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>. M: 123 bp DNA Ladder.

**Sensibilidad de los oligonucleótidos para la PCR.** Los dos pares de oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones clonadas de 289 y 526 bp, amplificaron su DNA blanco hasta la cantidad mínima de 25 pg/μL. En las figuras 24 y 25 se observa la amplificación del DNA utilizando el cultivo monospórico (MaPL15) procedente de MX con los dos pares de oligonucleótidos (Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub>; Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub>), respectivamente.



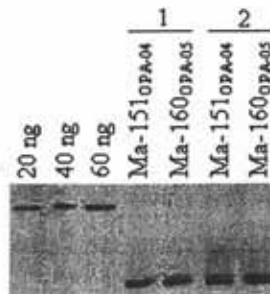
**Figura 24.** Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub> y Ma-160<sub>OPA-05-b</sub> utilizando concentraciones variables del DNA del cultivo monospórico MaPL15 de MX. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. C-: control negativo. M: 123 bp DNA Ladder.



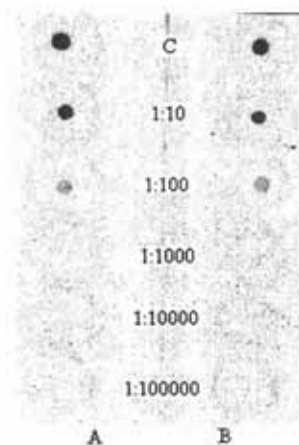
**Figura 25.** Sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos Ma-151<sub>OPA-04-a</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-b</sub> utilizando concentraciones variables del DNA del cultivo monospórico MaPL15 de MX. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. C-: control negativo. M: 123 bp DNA Ladder.

**Marcaje de la sonda de DNA.** En la figura 26 se muestra la cuantificación de las sondas de DNA, obtenidas por amplificación (1) y liberación de fragmentos a partir de los plásmidos recombinantes (2). Éstas se marcaron con digoxigenina para su detección, a través del método colorimétrico descrito anteriormente (Fig.27).





**Figura 26.** Cuantificación de los fragmentos obtenidos por amplificación y liberación de fragmentos de plásmidos recombinantes. La cantidad de sonda se estimó en 50 ng comparando con las diferentes concentraciones del fago  $\lambda$ .

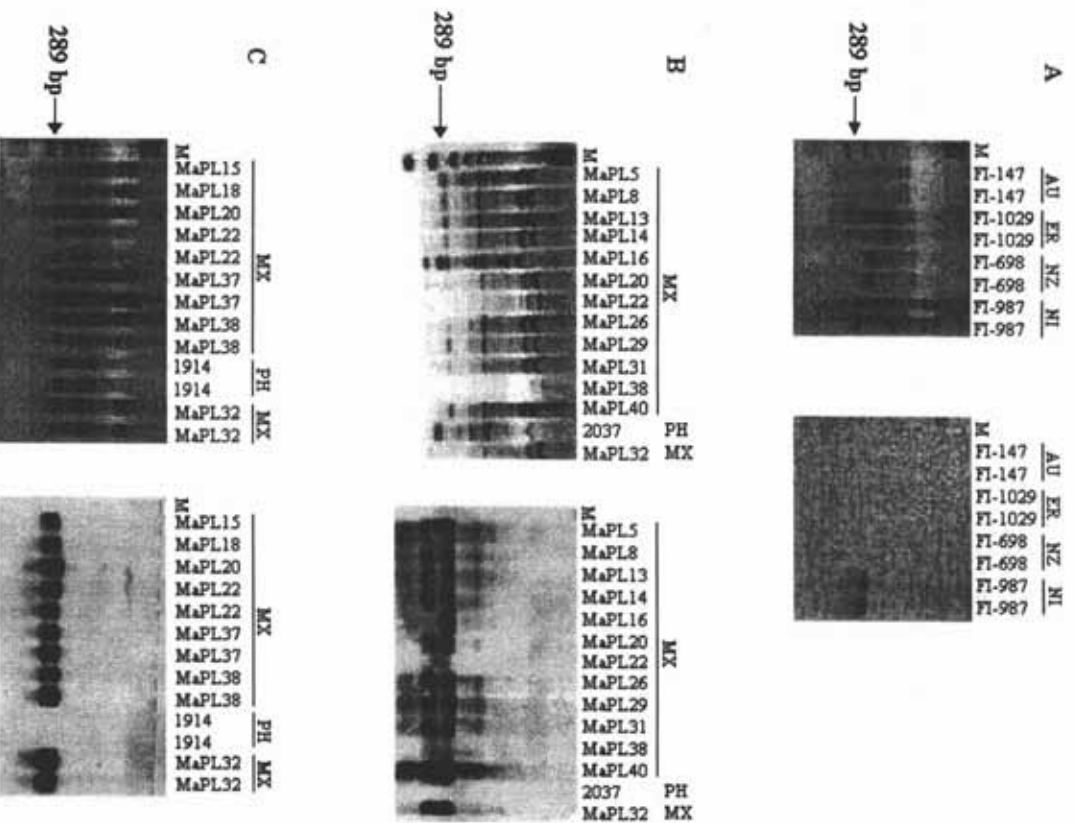


**Figura 27.** Determinación de la concentración de las sondas marcadas: A: sonda Ma-151<sub>OPA-04</sub>; B: sonda Ma-160<sub>OPA-05</sub>; las diluciones de los concentrados fueron las siguientes: 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000 y 1:100 000.

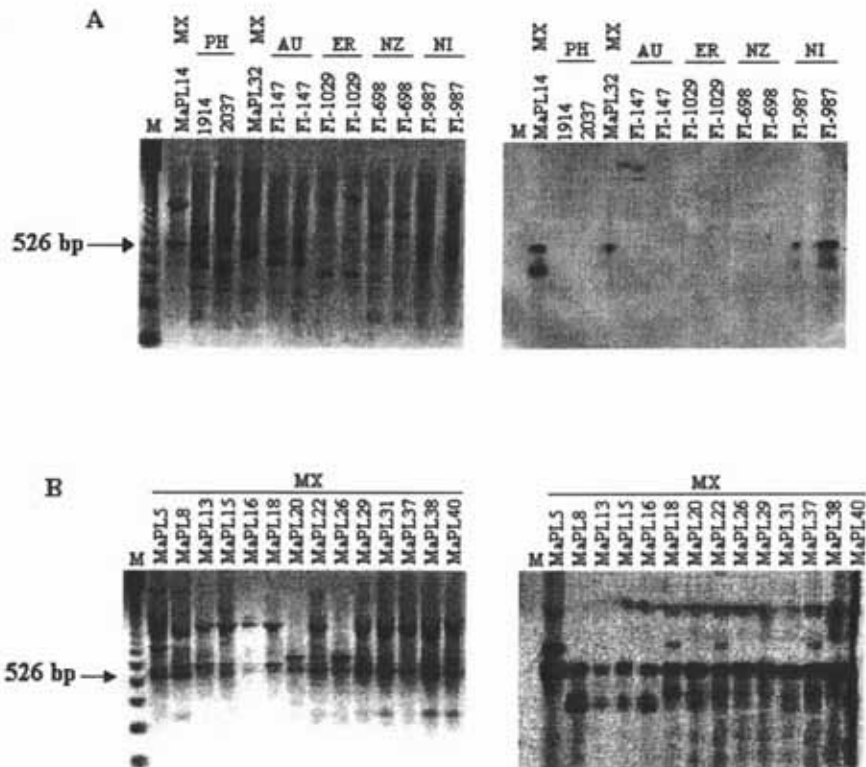
**Detección por el método colorimétrico.** En las figuras 28 A, B y C se observa la hibridación de la sonda Ma-160<sub>OPA-05</sub> marcada, con los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum*, en más de una región de los patrones polimórficos generados por RAPD, mostrando una alta especificidad hacia la var. *acidum*, ya que ninguna de las cepas de referencia fue reconocida, excepto la FI-987 procedente de NI (Nigeria) que

pertenece a la var. *acidum*. En la figura 28A se muestran por duplicado las cepas de referencia procedentes de AU (Australia), ER (Eritrea), NZ (Nueva Zelanda) y NI (Nigeria), en la figura 28B se observan 13 cultivos monospóricos de MX y la cepa de referencia 2037 procedente de PH (Filipinas), en la figura 28C se encuentran 3 cultivos monospóricos de MX y la cepa de referencia 1941 procedente de PH.

De la misma manera, en las figuras 29 A y B se observa la hibridación de la sonda Ma-151<sub>OPA-04</sub> marcada, con los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acidum* en más de una región de los patrones polimórficos generado por RAPD. En la figura 29A se muestran las 6 cepas de referencia, confirmando la especificidad de la sonda al hibridar sólo con la var. *acidum* (FI-987 NI) y 2 cultivos de MX, en la figura 29B se encuentran 14 cultivos de MX.



**Figura 28.** Hibridación con la sonda Ma-160<sub>OP-A-05</sub>. Las figuras de la izquierda muestran los gels con los patrones polimórficos de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* y cepas de referencia. Las figuras de la derecha muestran el resultado de la hibridación con la sonda.



**Figura 29.** Hibridación con la sonda Ma-151<sub>OPA-04</sub>. Las figuras de la izquierda muestran los geles con los patrones polimórficos de los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* y cepas de referencia. Las figuras de la derecha muestran el resultado de la hibridación con la sonda.

## DISCUSIÓN

Actualmente se han desarrollado marcadores moleculares para la identificación de hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana*, *Verticillium dahlie* y *Trichoderma hamatum* (Hegedus y Khachatourians 1996; Li *et al.* 1999; Abbasi *et al.* 1999 Castrillo *et al.* 2003). Sin embargo, la identificación de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* sólo se ha llevado a cabo por métodos fenotípicos tradicionales que conllevan grandes limitaciones (Riba *et al.* 1986; Rombach *et al.* 1986; St. Leger *et al.* 1992; Bridge *et al.* 1993; Fegan *et al.* 1993; Bidochka *et al.* 1994; Glare *et al.* 1996). Sin embargo, no existían marcadores moleculares para su identificación y tipificación, por esta razón en el presente trabajo se obtuvieron marcadores tipo SCARs, a partir de patrones polimórficos RAPD-PCR de aislamientos procedentes de MX, del hongo *M. anisopliae* var. *acidum*. De los 14 patrones polimórficos analizados por RAPD-PCR (Cano *et al.* 2005), se eligieron sólo dos bandas una de 526 bp y otra de 289 bp generados con los oligonucleótidos arbitrarios OPA-04 (5'-AATCGGGCTG-3') y OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3'), ya que estas dos bandas son comunes en los aislamientos de MX.

El estudio de estos dos marcadores específicos se llevó a cabo con el objetivo de identificar a los aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum*, particularmente los de MX, ya que se ha reportado gran variabilidad genética para este hongo (Cobb y Clarkson, 1993; Bidochka *et al.* 1994; Leal *et al.* 1994, 1997; Rakotonirainy *et al.* 1994; Mavridou y Typas 1998; Silveira *et al.* 1998; Inglis *et al.* 1999; Driver *et al.* 2000; Bidochka *et al.* 2001; Pantou *et al.* 2003; Cano *et al.* 2005), y la utilización de sondas obtenidas a partir de cepas de otros países podrían no identificar aislamientos de MX.

Las bandas que se seleccionaron como candidatas para obtener marcadores SCARs de *M. anisopliae* var. *acidum*, se estudiaron por los métodos tradicionales de clonación, secuenciación y análisis de las secuencias. La primera secuencia OPA-04(526)3 comparada y analizada con las depositadas en el GenBank compartió regiones homólogas no mayores de 22 bp con los hongos *Gibberella zeae*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Fusarium tricinctum* no obstante, hasta el momento no se encontró ningún sitio compartido con hongos entomopatógenos, la segunda secuencia OPA-05(289)5 solo presentó una

región homóloga de 19 bp con *Ophiostoma piceae*. En ambos casos, en el diseño de los oligonucleótidos específicos, se eliminaron los sitios compartidos con otras entidades fúngicas con el fin de aumentar la especificidad y reducir las posibilidades de reconocimiento inespecífico.

A nivel experimental, se definieron las condiciones óptimas de amplificación con los dos pares de oligonucleótidos específicos que generaron los fragmentos de 160 y 151 bp. Los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia OPA-05(289)5 que generan la banda de 160 bp, cuando se utilizaron para amplificar DNA de aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum*, a una temperatura de 55 °C, presentó inespecificidad con las cepas de referencia 1914, FI-147 y FI-1029 pertenecientes a las variedades *majus*, *lepidiotum* y *anisopliae*, respectivamente de *M. anisopliae*, y al aumentar la temperatura a 62 °C se eliminó la inespecificidad de la reacción. Cuando se establecieron las condiciones óptimas para la secuencia OPA-04(526)3 con los oligonucleótidos específicos que generan la banda de 151 bp, al utilizar una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2.5 mM, con DNA de aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* y cepas de referencia, se observó amplificación inespecífica con las cepas 1914, 2037, FI-147, FI-1029 y FI-698 pertenecientes a *M. anisopliae* var. *majus*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* y *M. flavoviride* var. *novaezealandicum*, respectivamente y al disminuir la concentración de MgCl<sub>2</sub> a 1 mM el reconocimiento inespecífico se eliminó. La determinación óptima de los parámetros de la reacción permitió que se incrementara la especificidad al 100 %, con todos los aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* incluyendo a las cepas de referencia FI-985 y FI-987, que corresponden a la var. *acridum* procedentes de AU (Australia) y NI (Nigeria) respectivamente. Esto corrobora el hallazgo de Cano *et al.* (2005), quienes al tipificar cultivos monospóricos y aislamientos de MX, junto con las cepas de referencia de otros países que representan los 10 clados taxonómicos del género *Metarhizium* propuestos por Driver *et al.* (2000), observaron que los cultivos y aislamientos de MX formaron un grupo separado de las cepas de referencia y además obtuvieron una similitud del 73 % con la cepa *M. anisopliae* var. *acridum* y una similitud del 99 % con *M. flavoviride* var. *flavoviride*. Pero cuando llevaron a cabo el análisis del árbol de tendido mínimo, éste indicó que los aislamientos de MX tenían una relación más directa con la var. *acridum* que con la var.

*flavoviride*. Esta relación con la var. *acidum* se corrobora al utilizar los marcadores SCARs, que discriminan a dicha variedad, por lo que creemos que estos marcadores son específicos para *M. anisopliae* var. *acidum*. No obstante, es necesario probar un mayor número de aislamientos de este género para valorar adecuadamente los oligonucleótidos diseñados.

La hibridación de las sondas Ma-160<sub>OPA-05</sub> y Ma-151<sub>OPA-04</sub> en las membranas transferidas con los patrones polimórficos RAPD-PCR generados a partir de los oligonucleótidos arbitrarios OPA-05 y OPA-04, mostró la especificidad de las mismas, ya que solamente se llevó a cabo la hibridación con los aislamientos de *M. anisopliae* var. *acidum*. Además, es importante hacer notar que los pares de oligonucleótidos son altamente sensibles, ya que detectan hasta 25 pg de DNA de *M. anisopliae* var. *acidum*.

Consideramos que estos marcadores podrían facilitar la detección de propágulos de este hongo en muestras del ambiente. Sin embargo, es necesario comentar que en estudios de viabilidad del hongo, para estudiar la persistencia del mismo en el ambiente, es necesario llevar a cabo paralelamente cultivos del hongo, ya que los métodos moleculares no detectan viabilidad en la naturaleza.

## CONCLUSIONES

1. El RAPD es una técnica poco específica sin embargo, a partir de ella se pueden obtener marcadores moleculares especie-específicos, los cuales son más sensibles.
2. Los dos pares de oligonucleótidos específicos Ma-160<sub>OPA-05-a</sub>, Ma-160<sub>OPA-05-b</sub> y Ma-151<sub>OPA-04-a</sub>, Ma-151<sub>OPA-04-b</sub> amplifican una banda de *M. anisopliae* var. *acridum* de 160 y otra de 151 bp, respectivamente.
3. Los pares de oligonucleótidos específicos obtenidos detectan a *M. anisopliae* var. *acridum* de México, así como de otras zonas geográficas del mundo.
4. Los pares de oligonucleótidos específicos para *M. anisopliae* var. *acridum*, no amplifican DNAs de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *P. fumosoroseus* y *V. lecanii*.
5. Los oligonucleótidos específicos detectan hasta 25 pg de DNA de *M. anisopliae* var. *acridum*.
6. Los marcadores SCAR obtenidos sólo hibridan con *M. anisopliae* var. *acridum*.



## REFERENCIAS

- Abbasi P, Miller S, Meulia T, Hoiting H, Kim J. 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5421-5426.
- Altschul S, Madden T, Shäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman A. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Bidochka M, Kamp A, Leveder T, Dekoning J, Amritha de Croos J. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1335-1342.
- Bidochka M, McDonald M, St Leger R, Roberts D. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* 25: 107-113.
- Bridge P, William M, Prior C, Paterson R. 1993. Morphological biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1163-1169.
- Cano-Ramírez C, Reyes-Montes MR, Zúñiga G, Navarro-Barranco H, Hernández-Velázquez V, Toriello C. 2005. Molecular typification by RAPD-PCR analysis of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* isolates from locusts (Orthoptera: Acrididae) in Mexico. Enviado a publicar a *Fungal Genet. Biol.*
- Castrillo L, Vandenberg J, Wraight S. 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 75-83.

Chelkowski J, Stepień L. 2001. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *J. Appl. Genet.* 42: 117-126.

Cobb B, Clarkson J. 1993. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 112: 319-3.

Dauch A, Watson A, Jabaji-Hare S. 2003. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. *J. Microbiol. Methods.* 55: 51-64.

Dedryver F, Jubier M, Thouverin J, Goyeau H. 1996. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr 24* in different wheat cultivars. *Genome.* 39: 830-835.

Douglas G, Guke G, Kawchuk L, Goettel M. 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biol. Control.* 14: 111-120.

Driver F, Milner J, Trueman J. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104: 134-150.

Fegan M, Manner J, MacLean D, Irwin J, Samuels K, Holdom D, Li D. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2075-2081.

Fernandez A, Costa A, Katsuyama Â, Madeira A, Gruber A. 2003. A survey of the inter- and intraspecific RAPD markers of *Eimeria* spp. Of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. *Parasitol. Res.* 89: 437-445.

- Frías G. 2004. Generación de oligonucleótidos específicos de *Histoplasma capsulatum* usando marcadores RAPD. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 65 pp.
- Glare T, Milner R, Baeton C. 1996. Variation in *Metarhizium*, a genus of fungal pathogens attacking Orthoptera: Is phialide morphology a useful criterion? *J. Orthop. Research*. 5: 19-27.
- Goettel M, Johnson D, Inglis S. 1995. The role of fungi in the control of grasshoppers. *Can. J. Bot.* 73: 71-75.
- Gygax M, Gianfranceschi L, Liebbard R, Kellerhals M, Gessler C, Patocchi A. 2004. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata jackii*. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1702-1709.
- Hegedus D, Khachatourians G. 1996. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 289-299.
- Hernández V, Berlanga A, Garza E. 1997. Detección de *Metarhizium flavoviridae* sobre *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) en la Isla Socorro, Archipiélago de Revillagigedo, México. *Vedalia*. 4: 45-46.
- Inglis P, Magalhães B, Valadares-Inglis C. 1999. Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* revealed by telomeric fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 49-52.
- Jain A, Ariyadasa R, Kumar A, Srivastava M, Mohan M, Nair S. 2004. Tagging and mapping of a rice gall midge resistance gene, *Gm8*, and development of SCARs for use in marker-aided selection and gene pyramiding. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1377-1384.

Klinbunga S, Amparyup P, Leelatanawit R, Tassanakajon A, Hirono I, Aoki T, Jarayabhand P, Menasveta P. 2004. Species identification of the Tropical Abalone (*Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* y *Haliotis varia*) in Thailand Using RAPD and SCAR Markers. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37: 213-222.

Leal S, Bertioli D, Butt T, Carder J, Burrows P, Peberdy J. 1997. Amplification and restriction endonuclease digestion of the *Pr1* gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. *Mycol. Res.* 101: 257-265.

Leal S, Bertioli D, Butt T, Peberdy J. 1994. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. *Mycol Res* 98: 1077-1081.

Lee G, Lee C, Kim C. 2004. Molecular markers derived from RAPD, SCAR, and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus pyrifolia* and *P. communis*. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1487-1491.

Lewin S, Schönian G, El Tai N, Oskam L, Bastien P, Presber W. 2002. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *Inter. J. Parasitol.* 32: 1267-1276.

Li K, Rouse D, Eyestone E, German T, 1999. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahlie*. *Mycol. Res.* 11: 1361-1368.

Linde M, Mattiesch L, Debener T. 2004. *Rpp1*, a dominant gene providing race-specific resistance to rose powdery mildew (*Podosphaera pannosa*): molecular mapping, SCAR development and confirmation of disease resistance data. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1261-1266.

Mavridou, A y Typas M. 1998. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. *Mycol. Res.* 102: 1233-1241.

Pantou M, Mavridou A, Typas M. 2003. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fung. Genet. Biol.* 38: 159-174.

Prior D, Lomer C, Herren H, Paraiso A, Kooyman C, Smith J. 1992. The IIBC/IITA/DFPV collaborative research programe on the biological control of locust and grasshoppers, p. 8-18. In Lomer, C. J., C. Prior (eds.), *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CAB International, Wallingford, Inglaterra.

Rakotonirainy M, Dutertre M, Brygoo Y, Riba G. 1994. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. *Mycol. Res.* 98: 225-230.

Riba G, Bouvier-Fourcade I, Caudal, A. 1986. Isoenzyme polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. *Mycopathologia.* 96: 161-169.

Robert O, Abelard C, Dedryver F. 1999. Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat. *Mol. Breeding.* 5: 167-175.

Rombach M, Humber R, Roberts D. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., a pathogen of plant- and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Island. *Mycotaxon* 27: 87-92.

SAGAR. 2000. Manejo integrado de langosta y chapulín. Sagar, México D. F.

SAGARPA. 2001. Taller internacional de transferencia de tecnología en control microbiano de langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. 2-5 Octubre, Yucatán, Mer. México.

Silveira E, Al-Janabi S, Magalhães B, Carvalho L, Tigano M. 1998. Polymorphism of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) and its natural pathogen *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes), revealed by RAPD analysis. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 27: 91-99.

St. Leger R, May B, Alee L, Frank D, Staples R, Roberts D. 1992. Genetic differences in allozymes and information of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 89-101.

Stankiewicz M, Pitera E, Gawroński S. 2002. The use of molecular markers in apple breeding for disease resistance. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7: 445-448.

Stehlik I, Blattner F. 2004. Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex nivalis* (Polygonaceae) and implications for the evolution of sex chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 108: 238-242.

Tanaka A, Miyazaki K, Murakami H, Shiraishi S. 2004. Sequence characterized amplified region markers tightly linked to the mating factors of *Lentinula edodes*. *Genome.* 47: 156-162.

Tigano M, Honeycutt R, Lacey L, Assis R, McClelland M, Sobral B. 1995. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 274-282.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

Ward E. 1995. Improved polymerase chain reaction (PCR) detection of *Gaeumannomyces graminis* including a safeguard against false negatives. *Europ. J. Plant Pathol.* 101: 561-566.

Weber J, Díez J, Selosse M, Tagu D, Le Tacon F. 2002. SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations. *Mycorrhiza.* 12: 19-27.

Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalsski J, Tingey S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Wu S, Collins G, Sedgley M. 2004. A molecular linkage of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome.* 47: 26-35.

Xu M, Huaracha E, Korban S. 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome.* 44: 63-70.

Xu M, Korban S. 2002. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the *Vf* locus in apple genome. *Plant Mol. Biol.* 50: 803-818.

Zhang Z, Xu J, Xu Q, Larkin P, Xin Z. 2004. Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 109: 433-439.