



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

“Obtención de marcadores SCARs a partir de
patrones AFLP, para la identificación del hongo
Paecilomyces fumosoroseus”

T E S I S

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

P R E S E N T A
ERIKA ARROYO VÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos a:

El Posgrado en Ciencias Biológicas.

Al apoyo económico recibido por CONACyT, ya que la autora fue becaria en el periodo de agosto de 2005 a junio de 2007, con el número 199307.

Comité tutorial

Presidente: Dra. Concepción Toriello Nájera.

Vocal: Dr. Joaquín Cifuentes Blanco.

Secretario: Dra. María del Rocío Reyes Montes.

Suplente: Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos.

Suplente: Dra. María del Carmen Calderón Esquerro.

“De que nos sirve soñar sino hacemos realidad nuestros sueños”

Mahatma Gandhi



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María del Rocío Reyes Montes por todo el apoyo brindado en esta tesis, al permitirme trabajar en su laboratorio, por todos sus consejos, observaciones y gracias sobre todo por la gran calidez que tiene como ser humano.

A la Dra. Concepción Toriello Nájera jefa del Laboratorio de Micología Básica por proporcionarme los cultivos monospóricos del hongo *Paecilomyces fumosoroseus*, esenciales para la realización de este trabajo.

A la Dra. Margarita Villegas por todos sus consejos y recomendaciones hechas en la escritura de la tesis. Muchas gracias por su apoyo y por su disposición para participar en el comité tutorial.

A la Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro miembro de mi comité tutorial, gracias por todos sus comentarios y apoyo para la culminación de la presente.

Agradezco a la QFB. María Guadalupe Frías de León por toda la asesoría técnica durante el trabajo experimental, pero sobre todo por su amistad.

Agradezco a la Dra. Gloria Carrión del Instituto de Ecología de Jalapa, México; por las cepas de *P. amoeneroseus* y *P. carneus*, las cuales fueron muy importantes para dar validez al presente trabajo.

DEDICATORIAS

A la memoria de la persona más importante en mi vida, gracias por el tiempo que compartimos juntos y sobre todo gracias por enseñarme a ser una mejor persona. Te quiero mucho Omar y nunca te olvidaré.

Gracias por el tiempo que disfrutamos juntas, fuiste la hermana que nunca tuve y creo que nunca te lo pude decir. Te llevo en el corazón Fernanda.

Emmanuel te amo por la gran persona que eres, te doy las gracias por aguantarme ya que no soy una persona fácil, eres mi mejor amigo y el pilar en mi vida.

A mi sobrino Omar por hacerme sonreír todos los días y a mi sobrina Fernanda por que nazca con bien, los quiero mucho a los dos.

A mis grandes amigas, las amazonas, Edén, Erika, Fabiola, Mónica, Rocío y Valentina. Son un gran respaldo en mi vida y cada una de ustedes me ha enseñado muchas cosas, lo principal, que uno nunca está solo si se cuenta con amigas como ustedes. Muchas gracias a todas.

A la comunidad del anillo integrada por Alejandro F., Alejandro P., Antonio, Carolina, Cesar, Concepción, Fernando, Ivonn, Martha, Rocío, Rodrigo, Selene y Sofía. Gracias por todas las salidas de campo y por su amistad.

ÍNDICE	
RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
PLANTEAMIENTO	11
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
Objetivos particulares	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Material fúngico	13
Medio de cultivo y condiciones de crecimiento	14
Extracción del DNA genómico	14
Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	15
Obtención de marcadores SCAR (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada)	18
Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por AFLP	18
Clonación de los fragmentos purificados	19
Purificación de plásmidos por método enzimático	21
Caracterización de las clonas por medio de PCR en colonia	22
Liberación del fragmento ligado por digestión con <i>EcoRI</i>	22
Secuenciación y diseño de oligonucleótidos	23
Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos	23
Sensibilidad de los oligonucleótidos específicos para la PCR	26
ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA	27

RESULTADOS	28
Extracción de DNA genómico	28
Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	30
Selección de los marcadores SCAR	35
Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por AFLP	36
Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109	40
Clonación de los fragmentos purificados	40
Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia	41
Purificación de plásmidos por método enzimático	42
Liberación del fragmento ligado por digestión con <i>EcoRI</i>	43
Secuenciación	43
Diseño de oligonucleótidos específico	44
Comparación en el GenBank.	45
Estandarización de la PCR para los oligonucleótidos Pf154-1a/Pf154-1b; Pf211-1a/Pf211-1b; Pf204-1a/Pf204-1b	46
Estandarización de la PCR del par de oligonucleótidos específicos Pf150-1a y Pf150-1b	47
Primera amplificación por PCR con los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a	48
Evaluación de la especificidad de la primera amplificación	50
Evaluación de la sensibilidad de la primera amplificación	52
Segunda amplificación de la PCR semianidada	53
DISCUSIÓN	59
PERSPECTIVAS	65
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Diagrama del diseño de los oligonucleótidos para la PCR semianidada.	48
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cultivos monospóricos de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	13
Tabla 2. Cepas tipo de referencia de <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	14
Tabla 3. Hospedero y origen de los cultivos monospóricos de otros entomopatógenos.	24
Tabla 4. Características de las cepas tipo de referencia del género <i>Metarhizium</i> .	25
Tabla 5. Aislados del género <i>Paecilomyces</i> .	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vector de clonación pGEM®-T Easy.	19
Figura 2. Cuantificación del DNA obtenido por el método tradicional.	28
Figura 3. Cuantificación de DNA de <i>P. fumosoroseus</i> procedentes de MX.	29
Figura 4. Cuantificación de DNA de las cepas de referencia de <i>P. fumosoroseus</i> .	29
Figura 5. Cuantificación de DNA de otros microorganismos.	30
Figura 6. Curva de DNA obtenida de las diluciones de <i>P. fumosoroseus</i> .	31
Figura 7. Curva del marcador de peso molecular de 50bp DNA Ladder.	32
Figura 8. Patrón polimórfico obtenido por AFLP con los oligonucleótidos EcoRI-AC/MseI-CAG.	33
Figura 9. Patrón polimórfico obtenido por AFLP con los oligonucleótidos EcoRI-AA/MseI-CTT.	34
Figura 10. Patrón polimórfico obtenido por AFLP con los oligonucleótidos EcoRI-AA/MseI-CTA.	35
Figura 11. Cuantificación de las bandas 200, 230, 450 y 600bp.	36
Figura 12. Reamplificación de la banda de 600bp.	37
Figura 13. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 200bp.	38
Figura 14. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 230bp.	38
Figura 15. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 270bp.	38
Figura 16. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 400bp.	39
Figura 17. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 450bp.	39
Figura 18. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 600bp.	39
Figura 19. Selección de clones recombinantes obtenidas en medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG.	41

Figura 20. Caracterización de las clonas por PCR en colonia.	42
Figura 21. Purificación de los plásmidos por método enzimático.	43
Figura 22. Liberación de los fragmentos clonados.	43
Figura 23. Comparación de la secuencia en el GenBank.	46
Figura 24. Comparación de la secuencia amplificada por los oligonucleótidos internos.	46
Figura 25. Amplificaciones inespecíficas de los marcadores Pf211, Pf204 y Pf150.	47
Figura 26. Amplificación con los oligonucleótidos específicos Pf150-1b y Pf110-2a.	49
Figura 27. Amplificación con los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a en el plásmido.	50
Figura 28. Evaluación de la especificidad con aislados del género <i>Metarhizium</i> .	51
Figura 29. Evaluación de la especificidad con aislados de <i>M. a.</i> var. <i>acridum</i> .	51
Figura 30. Evaluación de la especificidad con <i>P. farinosus</i> , <i>P. amoeneroseus</i> y <i>P. carneus</i> .	52
Figura 31. Sensibilidad de los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a.	53
Figura 32. Primera amplificación y cuantificación de la banda.	53
Figura 33. Sensibilidad de la segunda amplificación con (Pf110-2a y Pf110-2b).	54
Figura 34. Evaluación de la especificidad con (Pf110-2a/Pf110-2b).	55
Figura 35. Evaluación de la especificidad con las nuevas condiciones de amplificación.	56
Figura 36. Especificidad de la PCR semianidada con las nuevas condiciones de amplificación	57
Figura 37. Evaluación de la especificidad con las otras especies de <i>Paecilomyces</i>	57
Figura 38. Sensibilidad de la PCR semianidada con las nuevas condiciones de amplificación.	58

RESUMEN

La mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) es una plaga que ataca cultivos agrícolas de gran importancia económica como hortalizas, árboles frutales y plantas ornamentales. Se encuentra distribuida en las zonas tropicales y subtropicales en un rango de 0 a 1500 msnm, además es reconocida como un transmisor de virus fitopatógenos, donde las pérdidas en nuestro país han alcanzado el 100% en cultivos de melón, chile y tomate.

Una de las características de las poblaciones de insectos es el gran número de generaciones en un periodo corto de tiempo, permitiéndoles adquirir resistencia a los químicos con los que se les ha tratado de controlar. De manera preventiva se ha utilizado el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*, el cual ha mostrado ser un buen regulador biológico de la mosquita blanca.

En México, se han llevado a cabo programas de control biológico, donde se ha medido la capacidad de control de *P. fumosoroseus* contra este insecto en condiciones de campo, en cultivos de chile jalapeño en Quintana Roo, demostrando la eficiencia indiscutible del micoinsecticida.

Para realizar un seguimiento del hongo en campo, se cuenta con los métodos tradicionales como el aislamiento *in situ* y la consiguiente identificación que implica pruebas fenotípicas que tienen algunas limitaciones. Por estas razones, el empleo de métodos que utilizan marcadores moleculares constituye, hoy en día, una herramienta indispensable que facilita la identificación y caracterización genética de diferentes individuos. Por tal motivo es de gran importancia contar con marcadores moleculares sensibles y específicos, obtenidos a partir de aislados regionales, que nos permitan la detección del hongo en el campo, como los marcadores moleculares tipo SCAR (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada). Para su obtención se utilizaron DNA de 17 cultivos monospóricos y cinco cepas de referencia de *P. fumosoroseus* procedentes de las colecciones del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) México, Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi (ARSEF) USA y del

Centro Nacional de Recursos Genéticos/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil. Se generaron patrones polimórficos a partir de AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados) utilizando cuatro combinaciones de oligonucleótidos, para seleccionar las bandas que compartieran los aislados de México (MX). Las bandas se seleccionaron con más de un 80% de presencia para su purificación, clonación y secuenciación a través de los métodos moleculares tradicionales. De las secuencias obtenidas (Pf₂₇₀[2], Pf₄₀₀[1], Pf₂₀₀[1] y Pf₂₃₀[2]) se diseñaron oligonucleótidos específicos y las regiones que éstos amplificaron fueron comparadas en el GenBank con todas las pertenecientes a hongos depositadas hasta ese momento, para probar su especificidad con hongos homólogos y heterólogos. De estas secuencias analizadas se seleccionó la secuencia Pf₂₇₀[2] para el diseño de los oligonucleótidos específicos para una PCR semianidada (1ª amplificación Pf_{150-1b}/Pf_{110-2a} y 2ª amplificación Pf_{110-2a}/Pf_{110-2b}), que amplifican una banda final de 110bp. Este marcador resultó idóneo para la amplificación del DNA de *P. fumosoroseus*, excepto para el cultivo monospórico EH-506/3 procedente de Campeche. La sensibilidad del marcador SCAR fue de 1fg.

Contar con esta herramienta molecular es de gran importancia en nuestro país, para la identificación del hongo en los campos agrícolas donde se usa como bioinsecticida, ya que a la fecha en todo el mundo no se cuenta con este tipo de marcadores para la identificación de *P. fumosoroseus*.

SUMMARY

The whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) is a plague that spreads over vegetables, fruit trees, and ornamental plants of great economic relevance. It is distributed across tropical and subtropical zones in a range of 0 to 1500 m. a. s. l. It is also known as a phytopathogenic viruses transmitter and has been held accountable for complete losses of melon, chili, and tomato crops in Mexico.

One characteristic that hinders control of the whitefly pest is its rapid birth rate that enables it to build resistance to pesticides. The entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* has proven to be a good biological regulator of the whitefly- .

In fact, in Mexico a biocontrol program has been used in the state of Quintana Roo on a jalapeño chili crop, demonstrating the efficiency of *P. fumosoroseus* as a fungal pesticide. To follow-up on the effectiveness of this fungus, two traditional methods are used; the *in situ* method and the consequent identification that requires phenotypic assessments with its inherent limitations. Therefore, methods using molecular markers constitute, nowadays, an indispensable tool that eases the identification and genetic characterization of diverse individuals.

For this reason, it is very important to count upon sensitive and specific molecular markers, obtained from regional isolates, which will allow for the detection of the fungus in field work, such as the SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) type molecular markers. To obtain it, we used the DNA of 17 monosporic cultures isolated from the whitefly (*Bemisia tabaci*) in Mexico and 5 *P. fumosoroseus* reference strains from the collections of the National Reference Center of Biological Control (CNRCB, Mexico), Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi (ARSEF, USA), and from the National Center of Genetic Resources from a Brazilian enterprise. We generated polymorphic patterns from AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) data using four oligonucleotide combinations to select the bands being shared by the Mexican isolates. Those bands with a higher than 80% presence were

purified, cloned, and sequenced by means of traditional molecular techniques. From the obtained sequences (Pf₂₇₀[2], Pf₄₀₀[1], Pf₂₀₀[1], and Pf₂₃₀[2]), specific oligonucleotides were designed and the corresponding amplified regions were compared with GenBank data to prove their specificity with homologous and heterologous fungi. From the analyzed sequences, we chose sequence Pf₂₇₀[2] for the design of the specific oligonucleotides to be used in a semi-nested PCR (1st amplification Pf150-1b/Pf110-2^a and 2nd amplification Pf110-2a/Pf110-2b), which amplified a final 110 bp band. This marker was adequate for DNA amplification of *P. fumosoroseus*, except for the monosporic culture EH-506/3 from the state of Campeche. Sensitivity of the SCAR marker was 1 fg.

To count upon this molecular tool (SCAR-type marker) is of great relevance in our country to identify the fungus and verify its persistence in agricultural fields, where it is used as a bioinsecticide. To our knowledge no such marker has been reported worldwide.

INTRODUCCIÓN

El uso de hongos entomopatógenos como control biológico es una alternativa al uso de los plaguicidas químicos, de esta manera se favorece al mantenimiento de la salud humana, el equilibrio de los ecosistemas y su conservación mediante el manejo integral de plagas (Butt *et al.* 2001). Desde el inicio de las civilizaciones las cosechas se han visto devastadas por plagas de insectos, por lo que el hombre tuvo que desarrollar métodos de control, como fue el caso de los chinos que desde hace algunos siglos han utilizado hormigas para proteger sus huertas de cítricos contra gusanos, avispas y otros insectos. Ya en el siglo XIX científicos europeos y norteamericanos emplearon depredadores naturales (atarintinas y avispas) y patógenos (hongos) para proteger cultivos y bosques, obteniendo resultados muy alentadores (Torres *et al.* 2002). Estas investigaciones perdieron importancia entre 1930 y 1940, al descubrirse los insecticidas químicos que resultaron ser más rápidos, baratos y con un espectro de acción más amplio que los enemigos naturales (Torres *et al.* 2002).

Los insecticidas químicos han permitido un control eficaz de las plagas, pero también se ha observado que la mayoría de estos compuestos son altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas. Por su persistencia en el ambiente favorecen la selección de insectos-plaga resistentes a ellos, lo que ha motivado el uso de dosis cada vez mayores y de productos cada vez más tóxicos (SAGARPA 2001; Torres *et al.* 2002). Esto ha generado una gran preocupación en el ámbito mundial y actualmente se trabaja para limitar la aplicación de los insecticidas químicos tóxicos así como promover el manejo integral de plagas y la búsqueda de otras formas de control efectivas y menos contaminantes como el control biológico, el que consiste en la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de las plagas para limitar su población (Torres *et al.* 2002).

Dentro de los entomopatógenos utilizados para el biocontrol se encuentra el hongo *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, que es una especie ampliamente distribuida en la naturaleza y es reportada como patógena de diferentes insectos (Lepidópteros, Coleópteros, Dípteros, Homópteros) incluyendo a la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) e incluso es capaz de colonizar ácaros, otros hongos como los saprobios y también sobrevive en el suelo (Souza *et al.* 2000). Hay que resaltar que *P. fumosoroseus* ha mostrado ser un buen regulador biológico de la mosquita blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Altre *et al.* 1998; Oborník *et al.* 2001). Ésta es una especie polífaga que parasita a más de 300 especies de plantas, incluyendo ornamentales, malas hierbas y hortalizas como calabacita, melón, calabaza, sandía, pepino, algodón, brócoli y tomate. *B. tabaci* se encuentra distribuida hasta los 1500 msnm comprendiendo las zonas tropicales y subtropicales; además es el vector de un gran número de virus, entre los que se encuentran algunos como geminivirus que afectan al tomate (Ortega 1991; Salguero 1994).

P. fumosoroseus es un hongo mitospórico que presenta un ciclo parasexual en el laboratorio (Riba y Ravelojoana 1984). Desarrolla colonias filamentosas de lento crecimiento de color blanca crema a rosa grisácea. Algunas veces produce grupos compactos de conidióforos reunidos en filídes, sus conidios son cilíndrico-fusiformes de 3-4 x 1-2µm (Domsch *et al.* 1980). Osborne y Landa (1992) iniciaron estudios de control biológico, al aislar a *P. fumosoroseus* de la mosquita blanca en un campo de Florida, fue en ese momento que comenzaron los estudios sobre su biología y patogenicidad hacia diversas especies de insectos.

Una de las características de los hongos que los capacita como bioinsecticidas es el eficiente mecanismo de infección hacia el insecto, el cual se divide en 4 etapas: 1) adhesión de los conidios a la cutícula del insecto, 2) penetración al insecto por medios mecánicos y enzimáticos (proteasas y quitinasas) facilitando la digestión de la

capa externa (epicutícula) y la degradación de las capas internas (procutícula y epidermis) hasta invadir el hemocele, 3) reproducción del hongo en el hemocele del insecto y 4) la salida del hongo al exterior para su posterior esporulación (St Leger *et al.* 1992, 1997; St Leger 1993, 1995).

En México, se consideran alrededor de 700,000 ha de cultivo en riesgo y las pérdidas por infecciones virales han llegado al 100% en cultivos de tomate, chile y melón. Las enfermedades más conocidas son el chino del tomate, amarillamiento de la venación del pepino, enchinamiento de la hoja de la calabaza, mosaico común del frijol y el enanismo de la papa (Yáñez 1990; Ramírez 1996). Esto ha obligado a tomar medidas que no son las más apropiadas, como es el empleo irracional y excesivo de insecticidas químicos. Una alternativa al uso de estos productos sería la aplicación de hongos entomopatógenos como micoinsecticidas y de manera particular *P. fumosoroseus*, debido a que constituye una de las mejores opciones para el combate de la mosquita blanca principalmente. Con tal propósito se han llevado a cabo algunos programas de control biológico como el de García y Gutiérrez (1998) quienes midieron la capacidad de control de *P. fumosoroseus* contra la mosquita blanca en condiciones de campo en diferentes cultivos de chile jalapeño en Quintana Roo, demostrando la eficiencia indiscutible del micoinsecticida. Pineda-Guillermo y Alatorre-Rosas (1995) estudiaron el potencial de este hongo sobre la mosquita blanca demostrando que el tiempo letal medio (tiempo en el cual una concentración dada de conidios mata el 50% de los insectos prueba) es mayor que en otros hongos entomopatógenos como *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana*.

Diferentes factores limitan el uso de entomopatógenos mitospóricos en prácticas de biocontrol, como cuestiones de taxonomía y la carencia de un ciclo meiospórico que restringe las características morfológicas para su identificación (Oborník *et al.* 2001). La aplicación que se haga en los agroecosistemas de micoinsecticidas que utilicen como

ingrediente activo *P. fumosoroseus*, plantea la necesidad de saber cuál es el curso que siguen las cepas introducidas. Esto viene unido al conocimiento de aspectos biológicos importantes que se dan en el ambiente, como la persistencia y la viabilidad del hongo. Y si estos aislados mantienen sus características genéticas esenciales que los hacen aptos para contender con las condiciones ambientales y a su vez controlar los insectos plaga. El monitoreo y seguimiento del curso de aislados de este hongo entomopatógeno en agroecosistemas solo se ha llevado a cabo por métodos fenotípicos como es la caracterización morfológica de sus conidios y el crecimiento en medios de cultivo, lo cual ha traído problemas en su identificación ya que una simple mutación puede cambiar las características de la colonia en los medios de cultivo (Tigano *et al.* 1999). Por tal razón, resulta útil contar con métodos de identificación de alta sensibilidad y especificidad como los moleculares. Éstos han permitido el rápido desarrollo de numerosas técnicas genéticas que se han aplicado con éxito en la identificación de especies, como es la tecnología de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que ofrece una rápida detección e identificación de microorganismos sin recurrir al cultivo.

En otros hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* y *Verticillium* spp. se ha reportado un ensayo de PCR para muestras ambientales en el que usan oligonucleótidos específicos para la región ITS del rDNA (Nazar *et al.* 1991; Entz *et al.* 2005). Hu *et al.* (1993) reportaron un ensayo de PCR cuantitativo usando oligonucleótidos para detectar *V. dahliae* en girasoles y *V. albo-atrum* en alfalfa. De igual manera se han utilizado oligonucleótidos diseñados de una porción del rDNA mitocondrial para distinguir a *V. dahliae* de otros hongos (Li *et al.* 1994), y con el propósito de mejorar la especificidad se diseñaron oligonucleótidos a partir de marcadores SCAR (Secuencias Amplificadas de Regiones Caracterizadas), para la detección de *V. dahliae* (Li *et al.* 1999). Posteriormente Castrillo *et al.* (2003) utilizaron la técnica de RAPD para obtener marcadores SCAR, los cuales les permitieran diferenciar la cepa de *Beauveria bassiana* GHA y estimaron la densidad de propágulos presentes en muestras de suelo y follaje en el campo. Los marcadores SCAR son altamente específicos

y sensibles en ensayos de PCR, para la identificación y detección de muchos hongos patógenos. Estos marcadores se obtienen a partir de patrones polimórficos generados por diferentes técnicas como RAPD (Polimorfismo del DNA Amplificado al Azar), AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados) y RGAP (Polimorfismo de Genes de Resistencia Análogo) entre otros, 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 aislados ambientales sin la necesidad de generar cultivos monospóricos y facilitan el manejo de una gran cantidad de muestras (Castrillo *et al.* 2003). Los marcadores SCAR 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. De igual manera permite detectar el nivel de inóculo que persiste en el ambiente después de su aplicación (Castrillo *et al.* 2003).

Creemos que la técnica de AFLP (Vos *et al.* 1995) es la ideal para obtener este tipo de marcadores, puesto que combina la PCR y el análisis de fragmentos de restricción para detectar polimorfismos debido a cambios en o cerca de sitios de enzimas de restricción y por su mayor reproducibilidad. Xu *et al.* (2001, 2002), obtuvieron marcadores SCAR 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 le confiere resistencia a la mosca enana del arroz (*Orseolia oryzae*), obteniendo marcadores SCAR 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 nivālis*; este marcador permite excluir los ejemplares hembras de dicha especie. Linde *et al.* (2004), a partir de marcadores AFLP de rosas híbridās, 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 obtuvieron marcadores SCAR, a partir de la elección de patrones polimórficos generados por AFLP de cultivos monospóricos de México y cepas de referencia de distinto origen geográfico, para la discriminación específica de los aislados de *P. fumosoroseus* de nuestro país.

PLANTEAMIENTO

Actualmente se han desarrollado marcadores moleculares para la identificación de hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana*, *Verticillium dahliae*, *Trichoderma hamatum* y *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Hegedus y Khachatourians 1996; Li *et al.* 1999; Abbasi *et al.* 1999; Castrillo *et al.* 2003; Arroyo 2005; Entz *et al.* 2005). Sin embargo, la identificación de *Paecilomyces fumosoroseus* sólo se ha llevado a cabo por métodos fenotípicos tradicionales, que conllevan grandes limitaciones. A la fecha, no existen marcadores moleculares para su identificación y tipificación, por esta razón en el presente trabajo se obtuvieron marcadores moleculares específicos de *P. fumosoroseus*, a partir de los patrones polimórficos del DNA generados por AFLP. Esta es una técnica que se ha utilizado en especies fúngicas, para obtener productos de PCR únicos, llamados SCAR, que han sido utilizados para estudiar variación entre aislados como ha sido reportado por varios autores, además es una herramienta útil para identificar cepas de interés, determinar el origen de los aislados o estudiar estructura de poblaciones (Xu *et al.* 2001, 2002; Linde *et al.* 2004; Stehlik y Blattner 2004; Arroyo 2005). Los marcadores SCAR permiten el desarrollo de un ensayo sensible y diagnóstico para la amplificación específica del DNA del microorganismo estudiado. Por lo tanto, es importante obtener estos marcadores a partir de aislados de México, ya que se ha reportado gran variabilidad genética para este hongo y la utilización de sondas obtenidas a partir de cepas de otros países podrían no identificar a los provenientes de nuestro país (Tigano *et al.* 1995a; Cavallazzi 2002).

JUSTIFICACIÓN

Con el propósito de 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 la identificación morfológica (macro y micromorfología), desafortunadamente esta herramienta es poco específica y sensible para detectar los aislados del hongo, por lo que resulta necesario contar con métodos de identificación específicos, como los marcadores moleculares tipo SCAR que son una herramienta importante para el desarrollo de ensayos sensibles y diagnósticos en la amplificación específica de DNA en mezclas de hongos. Además, 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 a partir de los patrones polimórficos de AFLP de *Paecilomyces fumosoroseus* son específicas para la identificación de este hongo.

OBJETIVO GENERAL

1. Obtener sondas tipo SCAR a partir de los patrones polimórficos de AFLP, de cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus* procedentes de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar y clonar las bandas obtenidas por AFLP de los cultivos monospóricos de *P. fumosoroseus* compartidas sólo por los aislados procedentes de México.
2. Secuenciar las bandas seleccionadas y diseñar oligonucleótidos específicos para *P. fumosoroseus* procedente de México.
3. Determinar la especificidad y sensibilidad de los marcadores SCAR con DNA del hongo procedente de México, cepas de referencia y otros hongos entomopatógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico

Se utilizaron 17 cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus* procedentes de México (MX) (Tabla 1) y cinco cepas de referencia de diferente origen geográfico (Brasil, Estados Unidos de América, Japón y Francia) (Tabla 2). La selección se hizo eligiendo una cepa representativa de cada uno de los tres clados fenéticos obtenidos con base a la similitud encontrada en las secuencias de 27 aislados de *P. fumosoroseus* utilizados por Tigano et al. 1995a, quienes utilizaron oligonucleótidos arbitrarios para la amplificación con la PCR y oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia consenso de tRNA. Dicha similitud no tenía relación con el país de origen de los aislados. Todos los aislados y especies se mantuvieron en medio de papa-dextrosa-agar (PDA) (Bioxon, México) a 4°C.

Tabla 1. Cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus*

Cultivo monospórico			
Clave CNRCB*	Clave UNAM	Origen	Cultivo
MBP	EH-503/3	Yucatán	pepino
MBP1	EH-504/1	Yucatán	pepino
MBCH	EH-505/1	Yucatán	chile habanero
PFCAM	EH-506/3	Campeche	chile
MBPO1N	EH-507/3	Colima	noche buena
MBPO2N	EH-508/3	Colima	noche buena
MBPO3A	EH-509/3	Colima	noche buena
AMBAS 1	EH-510/1	Colima	noche buena
AMBAS 2	EH-511/3	Colima	sandía
AMBAS 3	EH-512/7	Colima	sandía
AMBAS 4	EH-513/3	Colima	sandía
AMBAS 5	EH-514/4	Colima	sandía
MBPO4	EH-516/2	Colima	noche buena
MBYH	EH-517/6	Sinaloa	-
MBMAC	EH-518/6	Sinaloa	-
MBBRT	EH-519/2	Colima	berenjena
PSMB1	EH-520/3	Nayarit	tomate

*Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Tabla 2. Cepas tipo de referencia de *Paecilomyces fumosoroseus* descritas por Tigano *et al.* (1995a).

Clave ARSEF**	Clave *** CENARGEN/EMBRAPA	Clave UNAM	origen	hospedero
Grupo 1				
3480	CG 35	EH-456	Brasil	<i>Cyperus rotundus</i>
Grupo 2				
2956	CG 123	EH-454	Brasil	<i>Spaethiella sp</i>
3076	CG 203	EH-455	EE.UU	<i>Bemisia tabaci</i>
Grupo 3				
989	CG 323	EH-452	Japón	<i>Bombyx mori</i>
1645	CG 326	EH-453	Francia	<i>Musca domestica</i>

**Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, USA.

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

La división en tres clados fenéticos se hizo con base a la similitud encontrada en las secuencias de 27 aislados de *P. fumosoroseus* utilizados por Tigano *et al.* 1995a, quienes utilizaron oligonucleótidos arbitrarios para la amplificación con la PCR y oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia consenso de tRNA. Dicha similitud no tenía relación con el país de origen de los aislados.

Medio de cultivo y condiciones de crecimiento

A partir de cada cultivo monospórico de *P. fumosoroseus* 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 de acuerdo con Cavallazzi (2002).

Extracción del DNA genómico

El rompimiento celular de toda la masa micelial obtenida por filtración se realizó con el Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen GmbH Hilden, Germany) de acuerdo con las especificaciones posteriores.

Se trituró la biomasa micelial en presencia de nitrógeno líquido en un mortero hasta la obtención de un polvo fino, y se colocaron 100 mg en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Inmediatamente se adicionaron 400 μ L del amortiguador AP1 y 4 μ L de RNAsa A 100 mg/mL, se agitó vigorosamente en el vórtex y se incubó la mezcla por 10 min a 65°C, mezclando 2 o 3 veces, sólo por inversión. Pasados los 10 min se adicionaron 130 μ L del amortiguador AP2 y se incubó por 5 min en hielo. Se transfirieron 450 μ L del lisado a la columna QIAshredder sostenida en un tubo colector de 2 mL para centrifugarse a 14000 rpm por 2 min. Al sobrenadante obtenido en el tubo colector se le adicionaron 1½ volúmenes del amortiguador AP3/E y se mezcló rápidamente con ayuda de una micropipeta. Se transfirieron 650 μ L de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó 1 min a 9000 rpm desechando el sobrenadante obtenido, se repitió este paso hasta acabar el volumen. Posteriormente se cambió el tubo colector, se adicionaron 500 μ L del amortiguador AW y se centrifugó por 1 min a 9000 rpm. Por último la columna se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL, adicionándole a la membrana 100 μ L del buffer AE (precalentado a 65°C), se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 9000 rpm para eluir. La concentración del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, comparando con diferentes concentraciones del fago λ (GIBCO BRL®, US) de 20, 40 y 60 ng.

Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

Las reacciones de AFLP se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Vos *et al.* (1995) y usando el Kit GIBCO BRL AFLP System I de la manera siguiente. Los DNAs obtenidos se ajustaron a una concentración de 500ng/18 μ L, éstos fueron digeridos simultáneamente con las enzimas de restricción *EcoRI/MseI* (1.25U/ μ L) durante dos horas a 37°C y posteriormente las enzimas de restricción se inactivaron a

70°C durante 15 minutos. Los fragmentos de DNA derivados de la digestión fueron ligados a adaptadores de doble hebra *EcoRI* F (5'-CTCgTAgACTgCgTACC-3'), *EcoRI* R (3'-CATCTgACgCATggTTAA-5'); *MseI* F (5'-gACgATgAgTCCTgAg-3'), *MseI* R (3'-TACTCAggACTCAT-5') con T4 ligasa por 2 h a 20°C, para generar templados de DNA que se utilizaron en amplificaciones posteriores. Las secuencias de los adaptadores asociadas a los sitios de restricción sirvieron como sitios de enlace de oligonucleótidos para efectuar dos amplificaciones subsecuentes por PCR. De la mezcla anterior se realizó una dilución 1:10, que fue utilizada en la preamplificación.

En la reacción de preamplificación, se utilizaron 5 µL de la dilución anterior, 40 µL de la mezcla pre-amp primer [*EcoRI* (5'-gACTgCgTACCAATTC+A-3'); *MseI* (5'-gATgAgTCCTgAgTAA+C-3')], 5µL del amortiguador 10X PCR [MgCl₂ 15 mM] y 1 µL de Taq DNA polimerasa [1U/µL] y se realizó una PCR, que consistió de un ciclo de 3 min a 94°C; 20 ciclos de: ½ min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C. Los productos de PCR obtenidos en la preamplificación fueron diluidos y usados como templados en una segunda amplificación (amplificación selectiva), en donde se probaron cuatro combinaciones de oligonucleótidos (*EcoRI*-AC/*MseI*-CAG; *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT; *EcoRI*-AA/*MseI*-CTA y *EcoRI*-AC/*MseI*-CAT), que además de reconocer la región del adaptador y del sitio de restricción, contienen dos nucleótidos específicos adicionales.

Antes de la amplificación selectiva, el oligonucleótido *EcoRI* fue marcado radiactivamente por fosforilación de la terminación 5' con la T4 cinasa y [γ -³²P]-ATP (3000Ci/mmol), este último se diluyó 1:4. Posteriormente, se incubó por 1 h a 37°C la siguiente mezcla: 10.8 µL del oligonucleótido, 6µL del regulador de la T4 cinasa, 12 µL de la dilución del ATP³² y 1.2µL de la cinasa T4, por último se inactivó a 70°C por 10 min.

El volumen final de la mezcla de reacción de la amplificación selectiva fue de 20 μL conteniendo: 0.5 μL del oligonucleótido marcado [*EcoRI*], 4.5 μL del oligonucleótido [*MseI*], 2 μL del amortiguador 10X PCR+ MgCl_2 [15 mM], 0.1 μL de Taq polimerasa [5U/ μL], 7.9 μL de agua grado MilliQ y 5 μL de la preamplificación. La PCR consistió de un ciclo de 5 min a 94°C; 12 ciclos de: 1/2 min a 94°C, 1/2 min comenzando en 65°C (disminuyendo cada ciclo 0.7°C), 1 min a 72°C; 23 ciclos de 1/2 min a 94°C, 1/2 min a 56°C, 1 min a 72°C.

Los fragmentos derivados de la amplificación selectiva, fueron separados en geles de acrilamida desnaturalizantes al 6%. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara BioRad, Sequi-Gen® GT System. El gel se corrió en amortiguador TBE 0.5X, pH8.0, a voltaje constante (1600V) hasta que el colorante xilen-cianol alcanzó el final del gel, el marcador de peso molecular que se utilizó fue el 50bp DNA ladder (Invitrogen, CA, USA). El gel se separó de los vidrios de la cámara de electroforesis y se adhirió a papel filtro Whatman 1MM, seguido de su cobertura con Alusa Plast (plástico) y posterior secado al vacío en un sistema de secado de geles Model 583, HydroTech™ Gel Drying System (BioRad, USA). Una vez seco, se colocó sobre el gel una serie de marcas radiactivas, que permitieron la alineación con la placa fotográfica de la autorradiografía. Finalmente, se expuso el gel a la placa de radiografía Kodak X-OMAT AR FILM (35x43cm) a -70°C durante 20 h. El análisis de las bandas se realizó en la autorradiografía. Todos los reactivos mencionados fueron de GIBCO.

Obtención de marcadores SCAR (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada).

La película revelada se alineó con el gel haciendo coincidir las marcas generadas por puntos radiactivos de referencia. Las bandas seleccionadas se localizaron tomando como referencia la película, se cortaron y los pedazos de papel con las bandas se transfirieron a tubos para eluirlos con 100 μL de agua MilliQ toda la noche a 4°C. Los

tubos se sellaron y se colocaron en agua hirviendo por 15 min, posteriormente se sacaron los tubos y se dejaron enfriar, para repetir el paso anterior. Se recuperaron los 100 μ L de volumen inicial y se les adicionaron 450 μ L de etanol al 100%, 10 μ L de acetato de sodio 3M pH8 y 2.5 μ L de un glicógeno 20 μ g/mL [acarreador de DNA (Sigma Chemical CO, MO)] dejándolo precipitar toda la noche a -20°C . Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm 20 min, se retiró el sobrenadante y el botón se lavó con 100 μ L de etanol al 80%, para volver a centrifugar por 20 min a 14000 rpm. Se secaron los tubos a 55°C y se diluyó el botón en 10 μ L de agua MilliQ. El DNA obtenido de las bandas se reamplificó con las mismas condiciones con que se generaron las bandas, pero sin la marca radioactiva.

Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por AFLP.

Los fragmentos seleccionados (bandas), se purificaron usando el Kit QIAquick PCR purification (Qiagen GmbH Hilden, Germany), de acuerdo con las instrucciones descritas por el fabricante. Los fragmentos de DNA purificados se concentraron al vacío (Instrumental Speed Vac System AES1010) durante 2 h y se diluyeron en 30 μ L de agua grado MilliQ. La pureza y concentración del fragmento se verificó por electroforesis en agarosa al 1.5%. La electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente, las concentraciones de los fragmentos de DNA se definieron por comparación con concentraciones de 10, 20 y 30 ng/ μ L del fago λ (GIBCO).

Los fragmentos seleccionados y purificados se amplificaron nuevamente utilizando los oligonucleótidos y las condiciones de PCR que los generaron. Al final de la amplificación se adicionaron 1.5U de Taq polimerasa recombinante (Invitrogen TECH-LINESM BRASIL) a la mezcla que contenía los amplicones y se incubaron en el termociclador a 70°C por 10 min. Este paso se llevó a cabo con el objetivo de adicionar adeninas a la terminal 3' de cada uno de los amplicones y favorecer la ligación de los mismos al vector de clonación. Posteriormente, los productos de esta segunda

amplificación se purificaron por columnas High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany), según la metodología descrita por el fabricante.

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 µL de agua grado MilliQ estéril. Para determinar la pureza del producto purificado, se analizaron 2 µL en agarosa al 1.5%. La ligación se realizó con 2 µL de los amplicones purificados, 5 µL de amortiguador 2X, 1 µL de T4 DNA Ligasa, 1 µL del vector pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) (Fig.1) y se ajustó a 10 µL 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 recombinantes), se transformaron en células competentes *E. coli* JM109 (método descrito posteriormente). Las colonias bacterianas resistentes a ampicilina (marcador de selección) se sembraron en medio de Luria líquido con ampicilina (100 µg/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 enzimático descrito mas adelante.

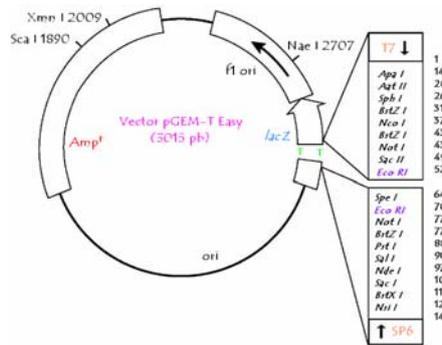


Figura 1. Vector de clonación pGEM®-T Easy.

Preparación de células competentes.

La cepa de *E. coli* JM-109 se sembró en un tubo de 5 mL con medio de Luria (triptona 3%, extracto de levadura 3% y cloruro de sodio 1%) sin antibiótico y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación vigorosa. Se transfirieron 400 µL del cultivo anterior a 100 mL de medio Luria fresco y se incubaron 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 2500 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%; MnCl₂ 0.99%; KCl 0.75%; CaCl₂ 0.15% y glicerina 12%), la suspensión celular se incubó en hielo durante 1½ min. Después de la incubación, las células de *E. coli* se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min a 4°C, el paquete celular se resuspendió en 3 mL de TfbII pH7 (MOPS, 2.1%; CaCl₂ 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*.

Se tomó un tubo Eppendorf que contenía 100 µL de la suspensión de células competentes JM-109 y se le adicionó 1µL del producto de ligación. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 min e inmediatamente se dio un choque térmico a 42°C por 1½ min, y se regresaron las células al hielo por 2 min más. Se agregaron 900 µL de medio de Luria a las células competentes y se incubaron a 37°C en agitación por 2 h. Después se centrifugaron a 3000 rpm 5 min y se resuspendieron en 100 µL, que fueron sembrados en cajas Petri con medio de selección Luria adicionado con (ampicilina 100µg/mL/IPTG-Isopropiltio-β-D-galactósido 0.1M/X-Gal-5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido 20mg/mL) a 37°C por 24 h. Finalmente, se seleccionaron las posibles clonas recombinantes (colonias blancas).

Purificación de plásmidos por método enzimático

Las clones seleccionadas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio Luria con el antibiótico de selección a 37°C de 12 a 16 h y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm hasta obtener un número cercano a 1. La purificación se llevó a cabo con el Kit FastPlasmid™ Mini (Eppendorf, NY, USA) de acuerdo con las especificaciones siguientes.

Se colocó 1.5 mL del medio anterior en un tubo de cultivo, se centrifugó 1 min a 12500 rpm y se desechó el sobrenadante. Se adicionaron 400 µL de la solución completa de lisis la cual debe de estar muy fría y se mezcló perfectamente a gran velocidad con ayuda de un vórtex, cuidando que el botón se resuspenda completamente en la suspensión. Se incubó el lisado por 3 min a temperatura ambiente y se transfirió a una columna para centrifugarse por 1 min a 14000 rpm, posteriormente se adicionaron 400 µL del amortiguador diluido y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm, se desechó el sobrenadante y se centrifugó 1 min más para secar la columna. La columna se transfirió a un tubo colector y se adicionaron 50 µL del amortiguador de elusión en el centro de la columna y finalmente se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. La elusión con los plásmidos se almacenó a -20°C. La presencia del plásmido se comprobó por electroforesis en agarosa al 1.5%. Los plásmidos se conservaron a -20°C.

Caracterización de las clones por medio de PCR en colonia

La PCR en colonia se llevó a cabo utilizando el material genómico de cada clona, la clona fue resuspendida en 50 µL de agua grado MilliQ y se calentó a punto de ebullición por 5 min. En un volumen final de 23 µL, con 2 µL de dNTP 2 mM; 2 µL de MgCl₂ 30 mM; 5.6 µL de cada oligonucleótido universal pUC/M13 izquierdo (5'-gTTTTCCCAgTCACgAC-3') y pUC/M13 derecho

(5'-CAGgAAACAgCTATgAC-3') (Promega, Madison, WI, USA) y 0.5 μ L de Taq DNA polimerasa 5U en 2.3 μ L de amortiguador de PCR 10X. El programa de amplificación consistió de un ciclo de 3 min a 94°C; 30 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.

Liberación del fragmento ligado por digestión con *EcoRI*

La liberación de los fragmentos ligados se llevó a cabo en tubos de 0.2 mL, donde se colocaron 10 μ L de plásmido, 2 μ L de regulador *EcoRI* 10X (Roche), 1 μ L de *EcoRI* (Roche), 1 μ L de RNAsa 100mg/ μ L (Qiagen) y 6 μ L de agua grado MilliQ. Se incubaron a 37°C 12 horas y se almacenaron a 4°C. Para verificar la liberación de los fragmentos se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% en TBE 0.5X (Tris base 10%, ácido bórico 10%, EDTA 10%) teñido con bromuro de etidio (10 μ g/mL), se colocó en cada carril 2 μ L de muestra más 2 μ L del regulador de carga y se condujo la electroforesis a 85V/42cm², 40 min, se utilizó el marcador de peso molecular de 123 bp DNA ladder (Invitrogen) y el marcador de peso molecular λ *HindIII* (Roche)/*EcoRI* (Roche). El marcador de peso molecular λ *HindIII*/*EcoRI* se obtuvo digiriendo 10 μ L de λ *HindIII* con 2 μ L 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 secuenciar en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM en un aparato ABI (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA), utilizando el promotor T7. Las secuencias obtenidas se editaron, alinearon y diseñaron los oligonucleótidos específicos de *P. fumosoroseus* en el programa Primer3 Input v 0.4. Posteriormente, se compararon con todas las secuencias pertenecientes a los hongos depositadas en el GenBank hasta ese momento,

mediante el programa BLAST 2.2.15 (Altschul *et al.*, 1997), con el objeto de descartar homologías con genes de hongos.

Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos

Los oligonucleótidos diseñados a partir de los fragmentos clonados, fueron utilizados en la amplificación por PCR del DNA genómico de *P. fumosoroseus*. Para la estandarización se realizaron curvas de MgCl₂ (1, 1.5, 2 y 2.5 mM), de DNA (1, 3 y 5 ng/μL), oligonucleótidos (10, 30, 50, 80 y 100 pmol/μL), así como curvas de la temperatura de alineamiento 55, 57 y 60°C. Los productos de amplificación se analizaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5%. Con las condiciones óptimas de amplificación para *P. fumosoroseus*, se evaluó la especificidad con cultivos monospóricos seleccionados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *M. a.* var. *acridum*, *Verticillium lecanii* (Tabla 3); cepas de referencia del género *Metarhizium* procedentes de diferentes orígenes geográficos (Tabla 4) y tres especies del género *Paecilomyces*: *P. farinosus* (Colima), *P. amoeneroseus* y *P. carneus* del Instituto de Ecología de Jalapa, Veracruz (Tabla 5).

Tabla 3. Hospedero y origen de los cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *M. a.* var. *acidum* y *Verticillium lecanii*.

Clave UNAM (cultivos monospóricos)	Clave CNRCB*	Hospedero	Cultivo	Origen
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>				
EH-346/4	-	<i>Trialeurodes</i> sp	berenjena	Guatemala
EH-475/2	MaNM1	<i>Aeneolamia</i> sp	caña de azúcar	S. L. Potosí
EH-478/1	MaOPS2	<i>Aeneolamia</i> sp	caña de azúcar	Oaxaca
EH-479/2	MaMV	<i>Aeneolamia</i> sp	caña de azúcar	Veracruz
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>				
		<i>Schistocerca</i>		
EH-484/6	MaPL8	<i>piceifrons</i>	pastos	Colima
EH-486/7	MaPL13	<i>S.piceifrons</i>	pastos	Colima
EH-489/1	MaPL16	<i>S.piceifrons</i>	pastos	Colima
EH-493/1	MaPL22	<i>S.piceifrons</i>	pastos	Colima
EH-494/4	MaPL26	<i>S.piceifrons</i>	pastos	Colima
EH-497/7	MaPL29	<i>S.piceifrons</i>	pastos	Colima
EH-499/10	MaPL37	<i>S.piceifrons</i>	-----	Isla Socorro
EH-502/8	MaPL40	<i>S.piceifrons</i>	-----	Isla Socorro
EH-531/8	MaPL32	<i>S.piceifrons</i>	pastos	Colima
<i>Verticillium lecanii</i>				
EH-348/2		<i>Trialeurodes</i> sp.	frijol	Morelos
EH-457/5		<i>Hemileia vastatrix</i>	roya del café	Veracruz
EH-459/1		<i>H. vastatrix</i>	roya del café	Edo. de México
EH-460/1		<i>H. vastatrix</i>	roya del café	Puebla
EH-572/7	V262	<i>Toxoptera aurantii</i>	limón	Colima

*Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Tabla 4. Características de las cepas tipo de referencia del género *Metarhizium* de acuerdo a Driver *et al.* (2000).

Clave UNAM	Clave		Nombre Original	Hospedero	Origen	Clado*** (grupo)	Nombre Actual
	ARSEF*	CSIRO**					
EH-525	1941*	-	-	<i>Nephotettix virescens</i> (Homóptera)	Filipinas	1	<i>M. album</i>
EH-529	2948*	-	<i>M. f.¹</i> var. <i>Minus</i>	Homóptera	Brasil	2	<i>M. flavoviride</i> Tipo E
EH-534	FI-698**	-	<i>M. a.²</i> var. <i>anisopliae</i>	Lepidóptera	Nueva Zelanda	3	<i>M. f.¹</i> var. <i>novazealandicum</i>
EH-573	FI-72**	-	<i>M. a.²</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Pemphigus trehemi</i> (Homóptera)	Inglaterra	4	<i>M. f.¹</i> var. <i>pemphigum</i>
EH-528	2037*	-	-	<i>Nilaparvata lugens</i> (Homóptera)	Filipinas	5	<i>M. f.¹</i> var. <i>minus</i>
EH-527	1184*	-	-	<i>Otiorthynchus sulcatus</i> (Coleóptera)	Francia	6	<i>M. f.¹</i> var. <i>flavoviride</i>
EH-530	FI-985**	-	<i>M. a.²</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Austracris guttulosa</i> (Ortóptera)	Australia	7	<i>M. a.²</i> var. <i>acridum</i>
EH-535	FI-987**	-	<i>M. f.¹</i> var. <i>Minus</i>	<i>Ornithacris cavroisi</i> (Ortóptera)	Nigeria	7	<i>M. a.²</i> var. <i>acridum</i>
EH-532	FI-147**	-	<i>M. a.²</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>Lepidiotia consobrina</i> (Coleóptera)	Australia	8	<i>M. a.²</i> var. <i>lepidiotum</i>
EH-533	FI-1029**	-	-	<i>S. gregaria</i> (Ortóptera)	Eritrea	9	<i>M. a.²</i> var. <i>anisopliae</i>
EH-526	1914*	-	-	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleóptera)	Filipinas	10	<i>M. a.²</i> var. <i>majus</i>

*Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, USA.

**Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia.

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

M. f.¹ = *Metarhizium flavoviride*

M. a.² = *Metarhizium anisopliae*

Tabla 5. Aislados del género *Paecilomyces*

Clave	Nombre	Origen	Hospedero
EH-402**	<i>P. farinosus</i>	Colima	
IE-418*	<i>P. carneus</i>	Veracruz	<i>Globodera rostochiensis</i>
IE-430*	<i>P. amoeneroseus</i>	Veracruz	<i>Globodera rostochiensis</i>

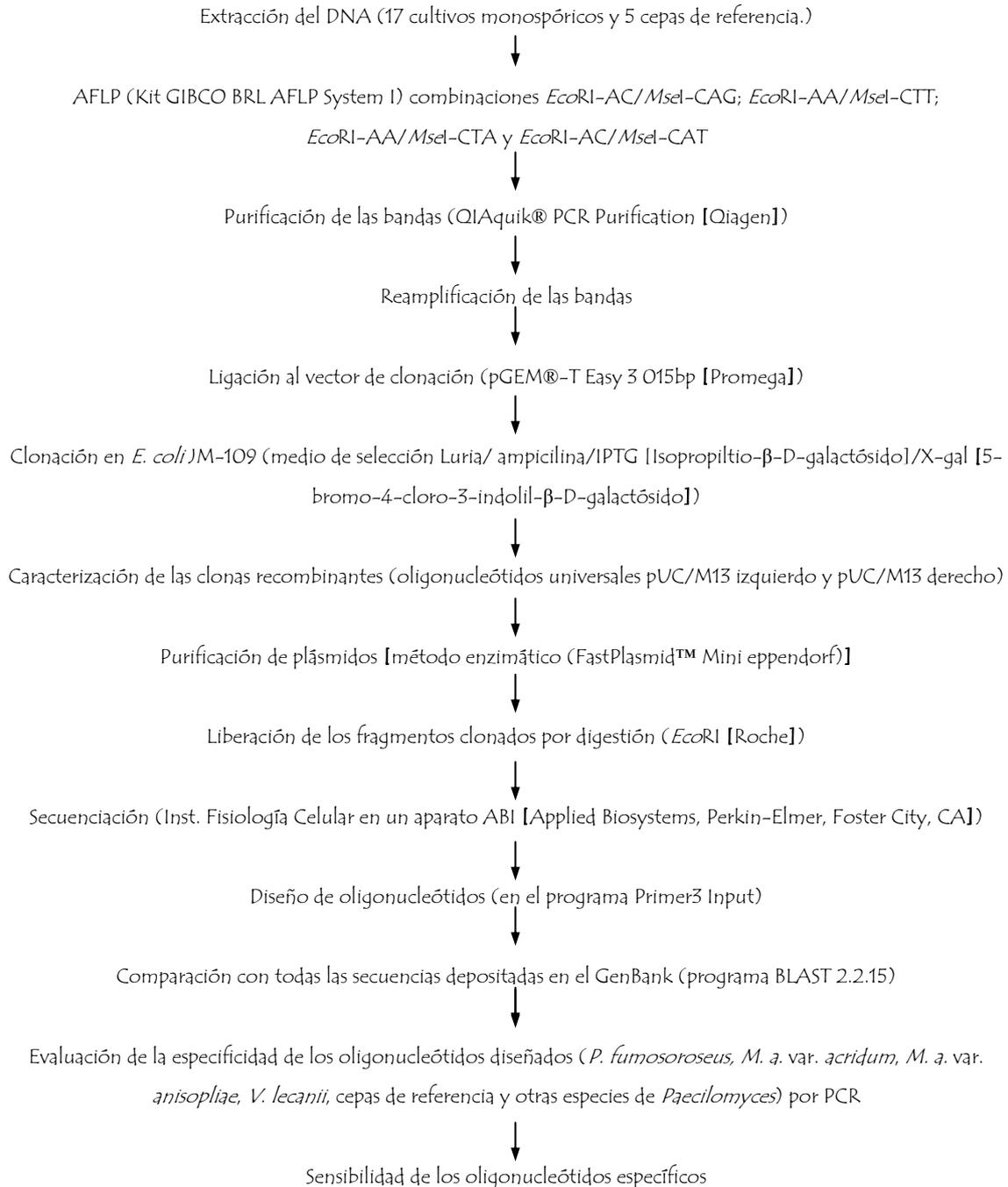
* Instituto de Ecología, Jalapa, Veracruz.

** Laboratorio Micología Básica, Fac. Medicina, UNAM.

Sensibilidad de los oligonucleótidos específicos para la PCR

Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico, detectada por los pares de oligonucleótidos específicos, se realizó una PCR bajo las condiciones óptimas para la amplificación específica utilizando DNA de un cultivo monospórico de MX. El DNA de éste cultivo monospórico 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/ μ L.

ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA



RESULTADOS

Extracción de DNA genómico. Se obtuvo DNA de un total de 17 cultivos monospóricos seleccionados de *P. fumosoroseus* de México (MX) (Tabla 1) y cinco cepas de referencia procedentes de Brasil (BR), Estados Unidos (EE.UU), Francia (FR) y Japón (JP) (Tabla 2), de acuerdo con el método descrito en materiales y métodos (Figura 2).

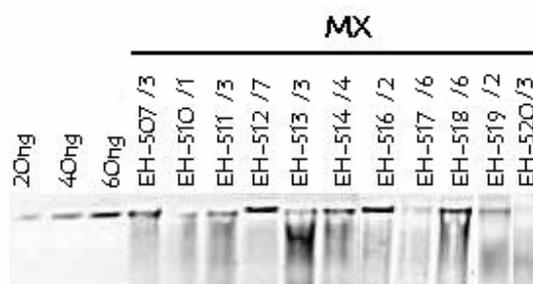


Figura 2. Cuantificación del DNA de los cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus*, obtenido por el método tradicional. Los tres primeros carriles corresponden a diferentes concentraciones del fago λ .

En la figura 2 se puede apreciar que la calidad del DNA obtenido con el método tradicional no fue la adecuada para la metodología de AFLP, ya que se requiere DNA puro para que el corte con las enzimas de restricción se lleve a cabo adecuadamente, por lo que se realizó la extracción del DNA con el Kit DNeasy Plant Mini, de los cultivos monospóricos y las cepas de referencia. Además de otros hongos que se utilizaron como testigo: *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (EH-479/2), *M. a.* var. *acridum* (EH-493/1) y *Verticillium lecanii* (EH-348/2).

Posteriormente, se determinó la concentración de DNA de todos los aislados, comparando 2 μ L de cada DNA con diferentes concentraciones del fago λ (Figs. 3, 4 y 5). Una vez determinada la concentración se ajustó cada DNA a 500ng/18 μ L, para utilizarlo en la técnica de AFLP. La figura 3 muestra la determinación de las concentraciones obtenidas de los DNAs de 17 cultivos de *P. fumosoroseus* de MX; la

figura 4 muestra los DNAs de cinco cepas de referencia procedentes de BR, EE.UU, FR y JP; por último la figura 5 muestra los DNAs de cultivos de otros microorganismos utilizados como testigos en la selección de las bandas específicas del AFLP.

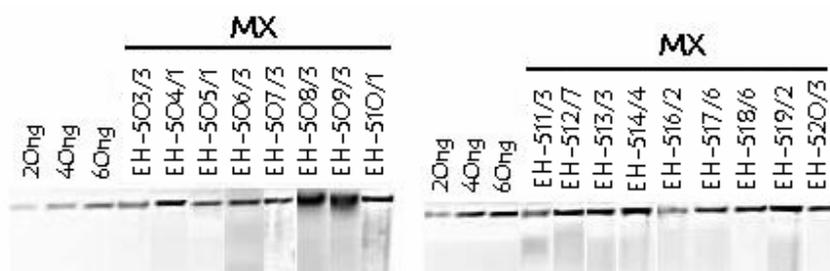


Figura 3. Cuantificación de DNA de los cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus* procedentes de MX. Los primeros tres carriles corresponden a diferentes concentraciones del fago λ .

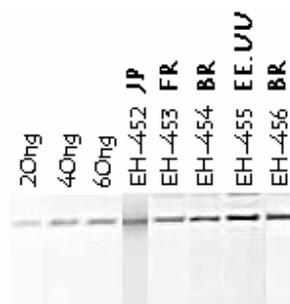


Figura 4. Cuantificación de DNA de las cepas de referencia de *Paecilomyces fumosoroseus* procedentes de Japón (JP), Brasil (BR), Estados Unidos (EE.UU), Francia (FR) y Japón (JP). Los primeros tres carriles corresponden a diferentes concentraciones del fago λ .



Figura 5. Cuantificación de DNA de otros microorganismos utilizados como testigos procedentes de MX. Los primeros tres carriles corresponden a diferentes concentraciones del fago λ .

Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Los patrones polimórficos fueron generados a partir de los DNAs obtenidos de los cultivos monospóricos de *P. fumosoroseus*, cepas de referencia y los cultivos utilizados como testigos (Tablas 1 y 2), para ello se utilizó el Kit GIBCO BRL AFLP System I. Se utilizaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos para la amplificación selectiva, estas combinaciones nos permitieron elegir el patrón polimórfico con mejor resolución de bandas para identificar el marcador SCAR que compartieran casi todos los cultivos monospóricos de *P. fumosoroseus* procedentes de México. Inicialmente se realizó una curva de concentración del DNA (Fig. 6), ya que no todos los DNAs amplificaron en la misma dilución, de igual manera se llevó a cabo una curva para ajustar la concentración del peso molecular, de 50 bp DNA Ladder, (Fig. 7). Posteriormente se utilizaron las siguientes combinaciones: *EcoRI*-AC/*MseI*-CAG; *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT; *EcoRI*-AA/*MseI*-CTA y *EcoRI*-AC/*MseI*-CAT. Con la combinación *EcoRI*-AC/*MseI*-CAG, observamos que todos los cultivos monospóricos seleccionados (MS), presentaron bandas polimórficas, la mayoría de éstos comparten la banda de 400

bp a excepción de los MS EH-506, EH-508 y EH-509 (Fig. 8). Con la combinación *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT observamos que todos los MS presentaron bandas polimórficas, la mayoría de éstos comparten la banda de 600 bp a excepción de los MS EH-503, EH-504, EH- 506, EH-509, EH-513 y EH-516 (Fig. 9). La banda de 450 bp la comparten 13 MS a excepción de EH-504, EH-506, EH-509 y EH-513 (Fig. 9). La banda de 230 bp la comparten 14 MS a excepción de EH-504, EH-509 y EH-516 (Fig. 9). La banda de 200 bp la comparten 15 MS a excepción de EH-504 y EH-509 (Fig. 9). Con la combinación *EcoRI*-AA/*MseI*-CTA todos los MS presentaron patrones polimórficos, de los cuales 14 comparten la banda de 270 bp a excepción de EH-504, EH-508 y EH-509 (Fig. 10). Con la combinación *EcoRI*-AC/*MseI*-CAT) no se generaron patrones polimórficos.



Figura 6. Patrón de DNA obtenido de las diluciones de un cultivo monospórico de *P. fumosoroseus* (EH-506) y un aislado de *Histoplasma capsulatum* (EH-375). M: 50 bp DNA ladder. Las condiciones del AFLP se describieron en materiales y métodos.



Figura 7. Curva del marcador de peso molecular 50 bp DNA ladder. Se hicieron diferentes diluciones del marcador. Las condiciones del AFLP se describieron en materiales y métodos.

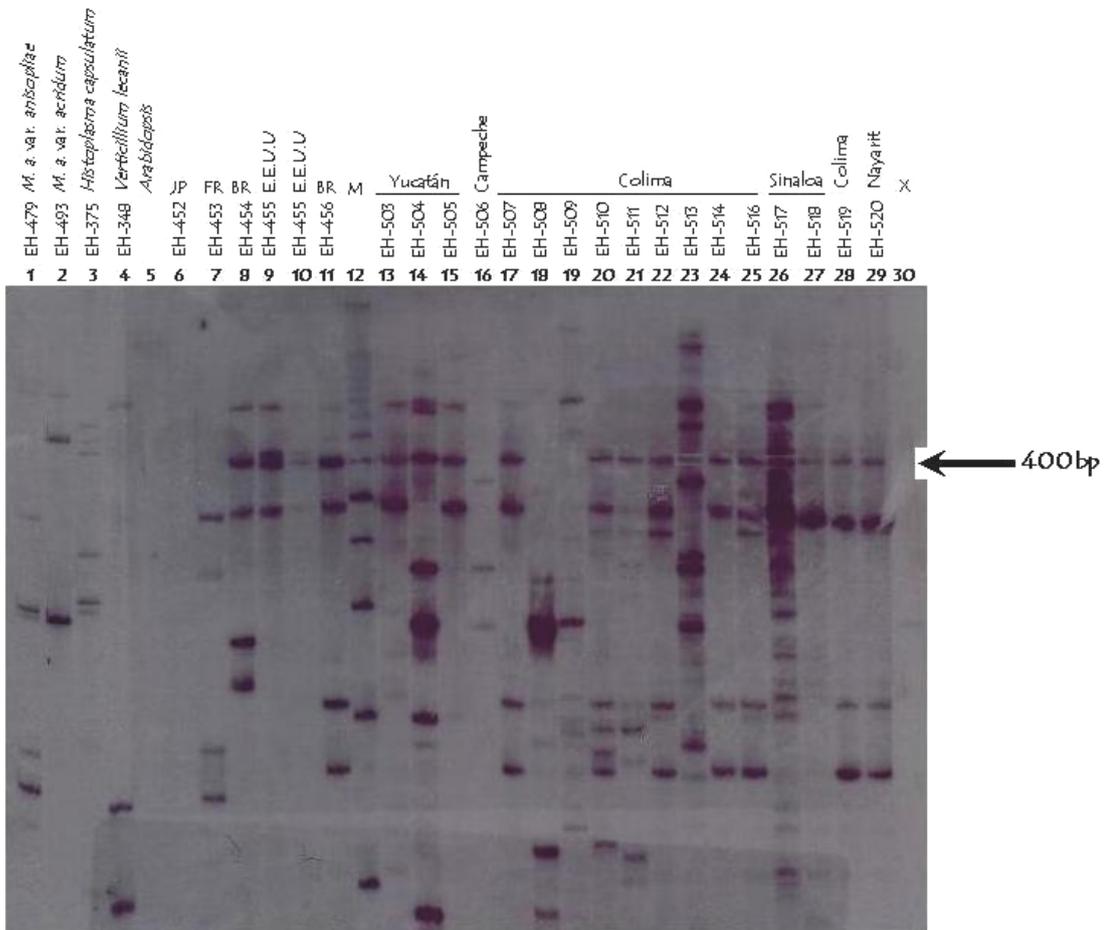


Figura 8. Patrón polimórfico obtenido por AFLP con la combinación de oligonucleótidos *Eco*RI-AC/*Mse*I-CAG de los aislados de *P. fumosoroseus* de MX, las cepas de referencia y los hongos utilizados como testigos. M: 50 bp DNA ladder.

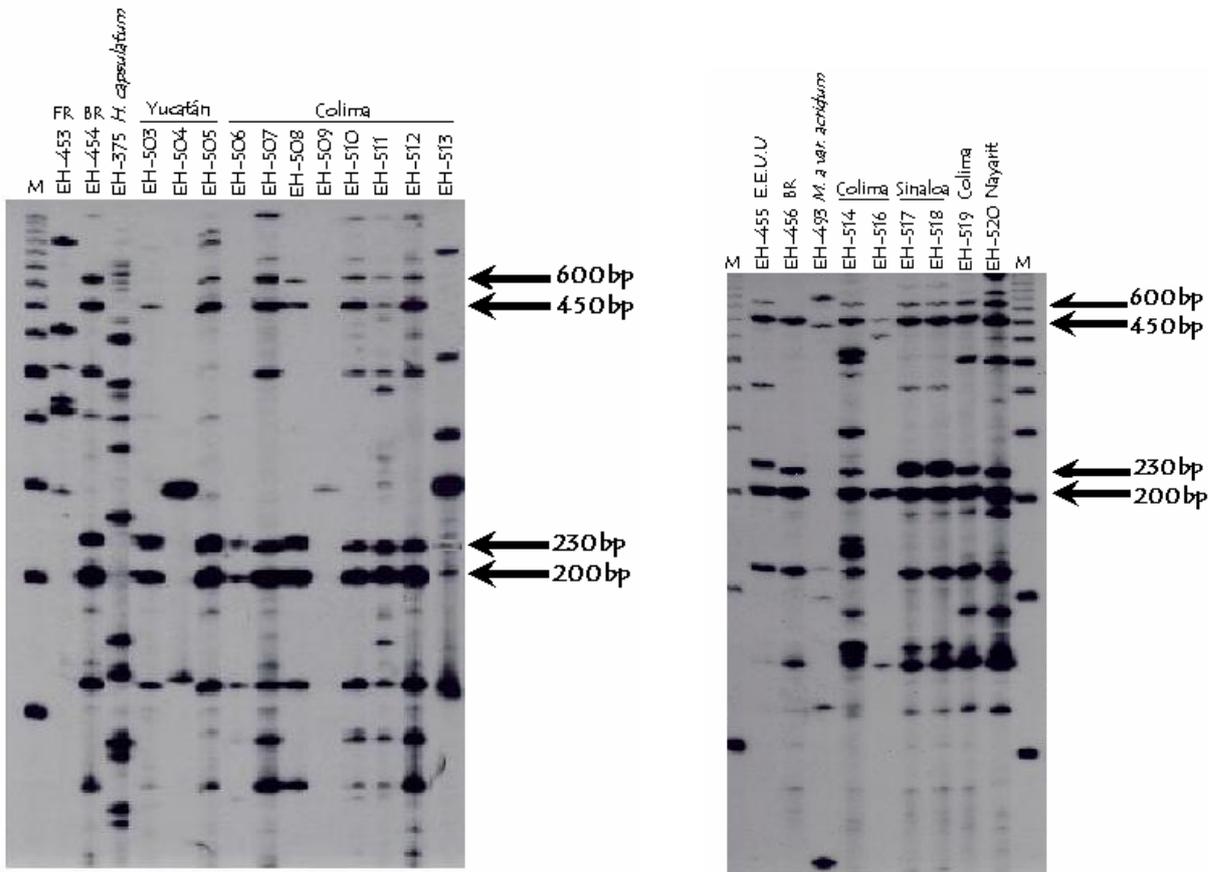


Figura 9. Patrón polimórfico obtenido por AFLP con la combinación de oligonucleótidos *EcoRI-AA/MseI-CTT* de los aislados de *P. fumosoroseus* de MX, las cepas de referencia y los hongos utilizados como testigos. M: 50 bp DNA ladder.

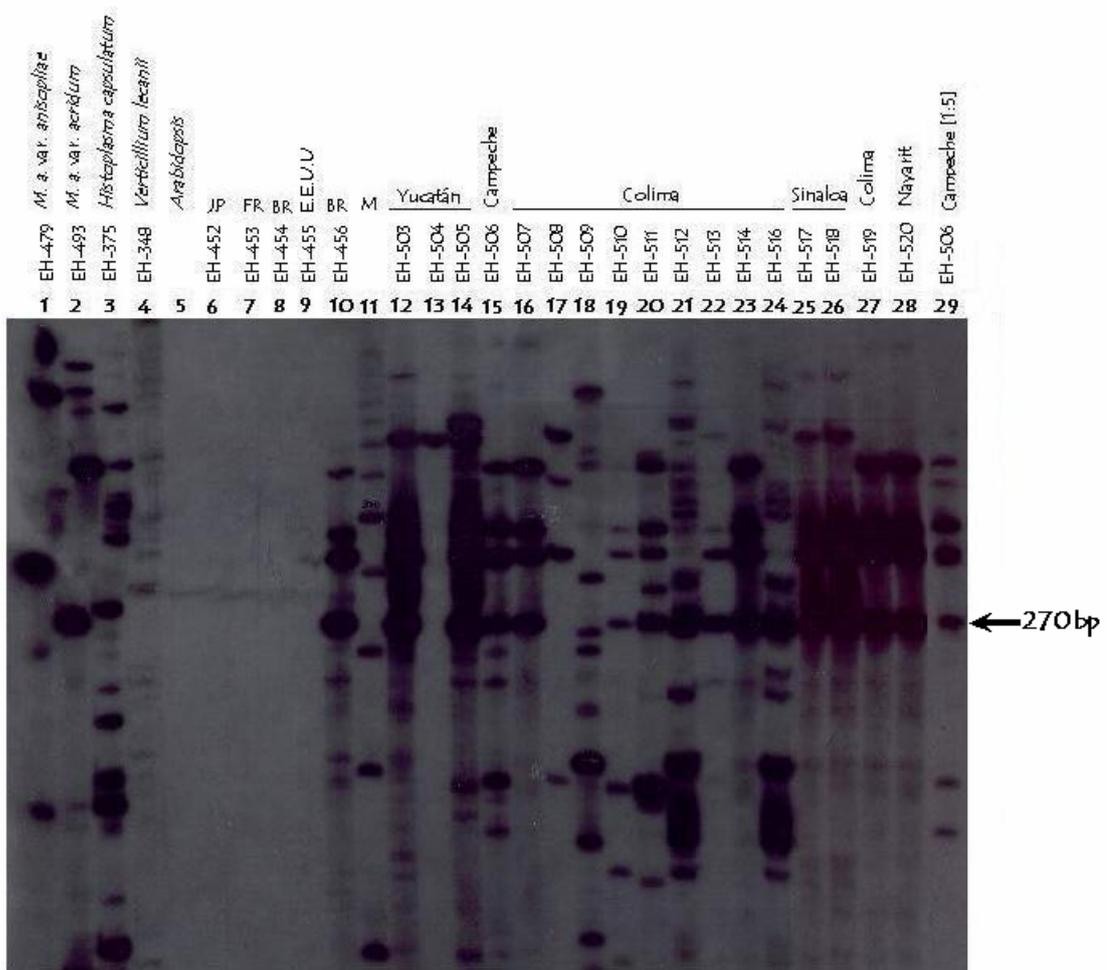


Figura 10. Patrón polimórfico obtenido por AFLP con la combinación de oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CTA de los aislados de *P. fumosoroseus* de MX, de las cepas de referencia y los hongos utilizados como testigos. M: 50 bp DNA ladder.

Selección de los marcadores SCAR. Para la selección de los marcadores SCAR se calculó el porcentaje de presencia de las bandas, ya que no todos los aislados de MX las presentaron. De esta manera se eligieron las bandas con mayor porcentaje de presencia, siendo éstas representativas de la población de MX. Con la combinación *EcoRI*-AC/*MseI*-CAG 14 cultivos comparten la banda de 400 bp obteniéndose un

porcentaje de presencia del 82.3%, mientras que, con la combinación *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT, se identificaron cuatro bandas compartidas por casi todos los cultivos de MX, los porcentajes fueron de 58.8% para la banda de 600 bp; de 76.4% para la banda de 450 bp; de 82.3% para la banda de 230 bp y de 88.2% para la banda de 200 bp, por último con la combinación *EcoRI*-AA/*MseI*-CTA, 14 cultivos comparten la banda de 270bp obteniendo un porcentaje de presencia del 82.3%. Las bandas anteriormente citadas fueron elegidas para convertirse en marcadores SCAR y fueron extraídas del gel para su purificación y posterior reamplificación, utilizando las mismas condiciones en que se generaron.

Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por AFLP. La figura 11 muestra la cuantificación de las bandas purificadas, en donde no se observó ningún producto. Al reamplificar las bandas se observaron bandas inespecíficas de menor peso molecular. En la figura 12 se muestra un ejemplo de la reamplificación de la banda de 600 bp originada con la combinación *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT y utilizando las condiciones originales de la amplificación selectiva por AFLP. Para eliminar las bandas inespecíficas se procedió a estandarizar la PCR para aumentar la especificidad y de esta manera obtener sólo una banda.

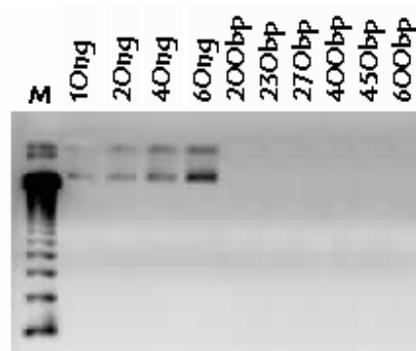


Figura 11. Cuantificación de las bandas 200, 230, 450 y 600 bp generadas por la combinación *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT; la banda de 270 bp generada con la combinación *EcoRI*-AA/*MseI*-CTA y la banda de 400 bp generada con la combinación

EcoRI-AC/*MseI*-CAG. Los primeros cuatro carriles corresponden a diferentes concentraciones del fago λ . M: 123 bp DNA ladder.

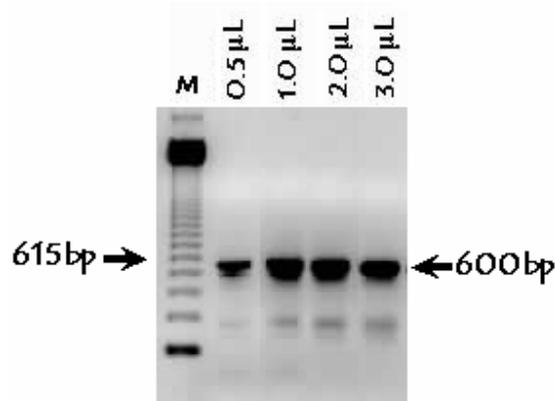


Figura 12. Reamplificación de la banda de 600 bp empleando las condiciones originales para la obtención de los patrones polimórficos por AFLP. Los carriles del 2 al 5 contienen diferentes concentraciones del amplicón y bandas inespecíficas. M: 123 bp DNA ladder.

Para la reamplificación específica de los marcadores, se ajustaron las condiciones de la PCR. Se realizó una curva de la temperatura de alineamiento [56, 58 y 60°C] y también una curva de concentración del DNA [0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 µL], obteniéndose las condiciones óptimas de la PCR que fueron las siguientes: en un volumen final de 25 µL con dNTP 0.25 mM; MgCl₂ 0.12 mM; oligonucleótidos *Eco* 0.69 ng/*Mse* 0.77 ng y Taq DNA polimerasa 0.5U en amortiguador de PCR 10X. La temperatura que resultó óptima para la amplificación fue 60°C. El programa de amplificación consistió de un ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de: ½ min a 94°C, ½ min a 60°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Las figuras 13-18 muestran la reamplificación estandarizada de los marcadores de 200, 230, 270, 400, 450 y 600 bp mostrando en cada caso una amplificación específica.

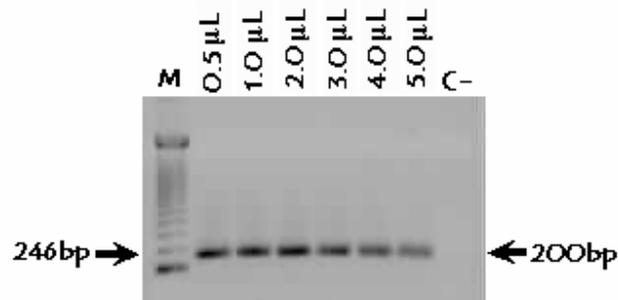


Figura 13. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 200 bp originada por los oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT. M: 123 bp DNA ladder

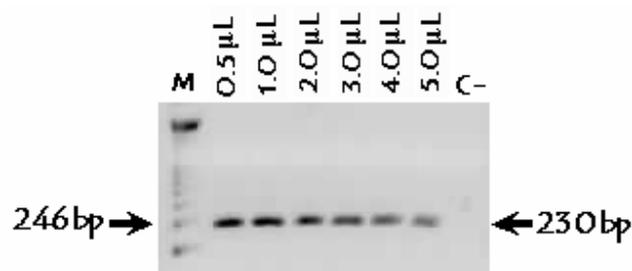


Figura 14. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 230 bp originada por los oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT. M: 123 bp DNA ladder.

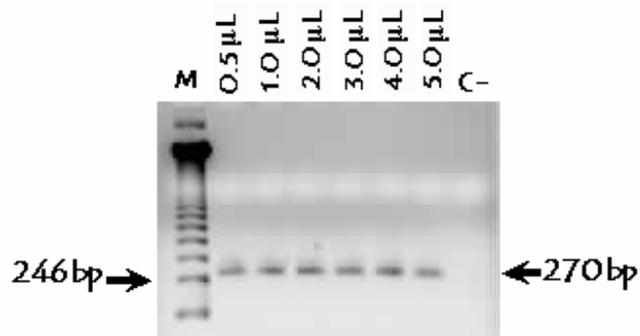


Figura 15. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 270 bp originada por los oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CTA. M: 123 bp DNA ladder.

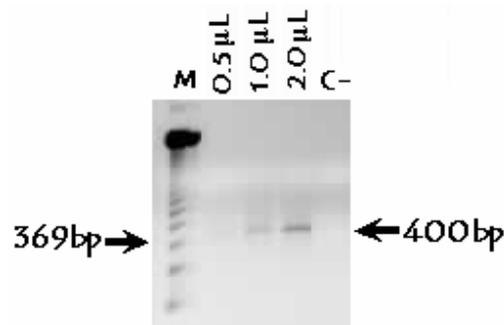


Figura 16. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 400 bp originada por los oligonucleótidos *EcoRI*-AC/*MseI*-CAG. M: 123 bp DNA ladder.

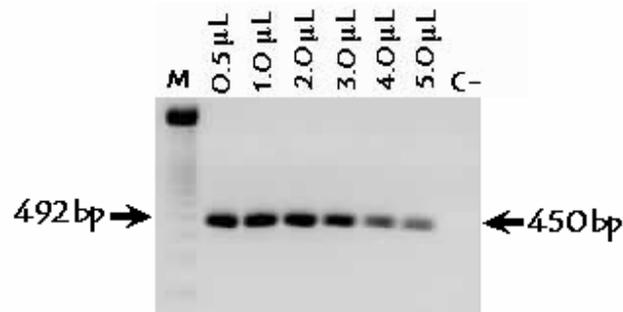


Figura 17. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 450 bp originada por los oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT. M: 123 bp DNA ladder



Figura 18. Curva de DNA para la reamplificación de la banda de 600 bp originada por los oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT. M: 123 bp DNA ladder.

Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109. El promedio de las colonias obtenidas fue de 100, por lo que la eficiencia de transformación resultó ser de 1×10^5 UFC/ng ó 1×10^8 UFC/ μ g de DNA. Ésta fue adecuada para la transformación, ya que es la eficiencia de transformación mínima requerida y recomendada por la casa comercial.

Clonación de los fragmentos purificados. Los amplicones de 200, 230, 450 y 600 bp (generados con las combinaciones *EcoRI-AA/MseI-CTT*), 270 bp (*EcoRI-AA/MseI-CTA*) y 400bp (*EcoRI-AC/MseI-CAG*), fueron ligados al vector de clonación y el producto de éstos se utilizó para su transformación en 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 β -galactosidasa se interrumpe al integrar un fragmento de DNA, por lo que las células pierden la capacidad de degradar al X-Gal presente en el medio. Por otra parte, las clonas que no tienen ningún fragmento integrado, conservan intacta la secuencia de la β -galactosidasa y por consecuencia tienen la capacidad de degradar al X-Gal presente en el medio, desarrollando una pigmentación azul (Fig. 19). Se eligieron 10 clonas recombinantes al azar y se sembraron en medio LB/ampicilina [100 μ g/mL] para confirmar la resistencia a la ampicilina de esta manera se corroboró la presencia del vector de clonación, el cual le da la característica de ser resistente a dicho antibiótico.

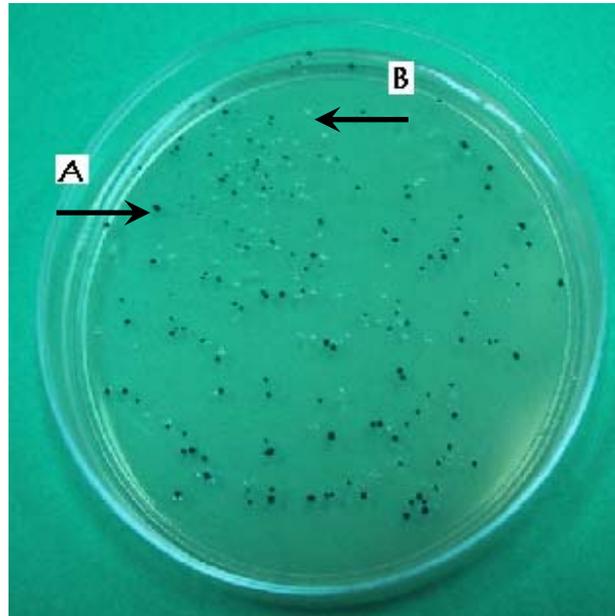


Figura 19. Selección de clonas recombinantes obtenidas en medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG. Las clonas que no tienen el fragmento de DNA de *P. fumosoroseus* integrado degradaron al X-Gal desarrollando la pigmentación azul (A). Las clonas que no desarrollaron la pigmentación azul son las que contienen el fragmento de interés (B).

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia. Para verificar que las clonas elegidas realmente contuvieran los amplicones, se realizaron dos métodos: 1) liberación de fragmentos recombinantes con la enzima *EcoRI* y 2). Los productos de amplificación revelaron los fragmentos deseados (Fig. 20). Cabe mencionar que el tamaño de los fragmentos 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 aproximadamente de 250 bp, lo cual incrementa el tamaño del producto de amplificación.

Después de verificar la transformación, de las diez clonas seleccionadas, se eligieron al azar dos clonas de cada uno de los fragmentos para disminuir la cantidad de muestras manejadas, dichas clonas se nombraron de la siguiente manera: Pf₂₀₀[1], Pf₂₀₀[2]; Pf₂₃₀[1], Pf₂₃₀[2]; Pf₄₅₀[1], Pf₄₅₀[2]; Pf₆₀₀[1], Pf₆₀₀[2]; Pf₂₇₀[1], Pf₂₇₀[2]; Pf₄₀₀[1], Pf₄₀₀[2]. Donde, Pf indica el nombre del organismo de donde se obtuvo, el número 200 el tamaño del fragmento clonado en bp y el número en el paréntesis es la clona seleccionada. En la figura 20 solo se muestra una clona de cada fragmento seleccionado.

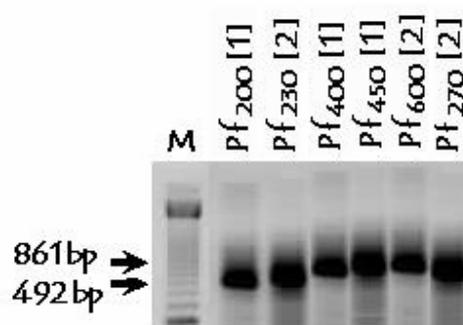


Figura 20. Caracterización de las clonas que contienen los fragmentos de 200, 230, 450, 600, 270 y 400 bp por PCR en colonia, con los oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo y pUC/M13 derecho. M: 123 bp DNA ladder.

Purificación de plásmidos por método enzimático. Una vez verificada la presencia de los fragmentos deseados, los plásmidos de las colonias seleccionadas Pf₂₀₀[1], Pf₂₃₀[2], Pf₄₅₀[1], Pf₆₀₀[2], Pf₂₇₀[2] y Pf₄₀₀[1] fueron purificados por el método enzimático como se encuentra especificado en la metodología y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, observando una banda que se encuentra alrededor de los 3530 bp (Fig. 21). 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.

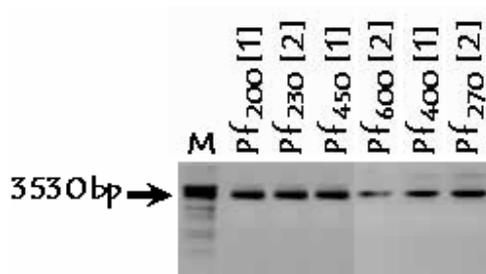


Figura 21. Purificación de los plásmidos por método enzimático de las clonas seleccionadas Pf₂₀₀[1], Pf₂₃₀[2], Pf₄₅₀[1], Pf₆₀₀[2], Pf₂₇₀[2] y Pf₄₀₀[1]. M: λ /HindIII digerido con la enzima *EcoRI*.

Liberación del fragmento ligado por digestión con *EcoRI*. Los plásmidos obtenidos a partir de las clonas seleccionadas Pf₂₀₀[1], Pf₂₃₀[2], Pf₄₅₀[1], Pf₆₀₀[2], Pf₂₇₀[2] y Pf₄₀₀[1] 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 22, se observó que la digestión de las clonas se llevó a cabo adecuadamente, obteniendo los fragmentos esperados.

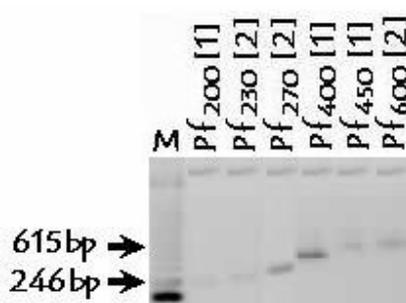


Figura 22. Liberación de los fragmentos clonados, por digestión con la enzima *EcoRI*. M: 123 bp DNA ladder.

Secuenciación. Con el propósito de obtener suficiente material para la secuenciación de los fragmentos, las clonas seleccionadas Pf₂₀₀[1], Pf₂₃₀[2], Pf₄₅₀[1], Pf₆₀₀[2], Pf₂₇₀[2] y Pf₄₀₀[1] se purificaron por el método enzimático utilizando el Kit FastPlasmid™ Mini

(Eppendorf, NY, USA) de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial, obteniéndose 300 ng/ μ L de los plásmidos con los fragmentos, cantidad suficiente para la secuenciación de los fragmentos (Fig. 21).

Diseño de oligonucleótidos específico. Se seleccionaron las secuencias con un porcentaje de presencia mayor al 80% en los aislados de *P. fumosoroseus* de México, éstas secuencias fueron Pf₂₀₀[1], Pf₂₃₀[2], Pf₂₇₀[2] y Pf₄₀₀[1]. Posteriormente fueron editadas en el programa ChomasPro versión 1.34 y para el diseño de los oligonucleótidos específicos se utilizó el programa Primer3 Input (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), tomando como base los siguientes parámetros: longitud ideal de los oligonucleótidos (18, 20 y 27 bp), porcentaje de guanina-citosina (20, 60 y 80%), temperatura de alineamiento (T_m) (57, 60 y 63°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:

Clona	Oligonucleótido	Secuencia	T _m	%GC	reg. amplificada
Pf ₂₀₀ [1]	Pf154-1a	5' CgAAAAGCATgATTCCCAgT 3'	63.8	45	154bp
	Pf154-1b	5' gACCCATCAAaggTAgCTCA 3'	64	55	154bp
Pf ₂₃₀ [2]	Pf211-1a	5' ggAACCAATCCAAgCTACCA 3'	63.7	50	211bp
	Pf211-1b	5' TCCCgACTCATCAAgTTACTCA 3'	63.5	45.45	211bp
Pf ₂₇₀ [2]	Pf150-1a	5' gACTgCgTACCAATTCAACg 3'	63.1	50	150bp
	Pf150-1b	5' CgCgCACATgTAACAACCTCT 3'	63.8	50	150bp
Pf ₄₀₀ [1]	Pf204-1a	5' AgTCAGggAgTTgCATTTgg 3'	64	50	204bp
	Pf204-1b	5' CggCCTgCCTgTTTATCC 3'	65.5	61.1	204bp

La primera columna es la clona que se mandó secuenciar, en la segunda columna se encuentra el nombre los dos pares de oligonucleótidos que fueron diseñados con base en la secuencia de la clona [Donde, Pf indica el nombre del organismo, el número 150 el tamaño del fragmento en bp y el 1a o 1b es la orientación que tienen]. La tercera

columna es la secuencia de cada oligonucleótido. La cuarta y quinta columna son la T_m (Temperatura de fusión) y el % de guanina-citosina de cada uno de los oligonucleótidos y la última columna la longitud de la región que amplifican cada par de oligonucleótidos en pares de bases (bp).

Comparación en el GenBank. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX) y la concentración de los pares de oligonucleótidos específicos se ajustó a 100 pmol/ μ L. Las secuencias que amplifican los pares de oligonucleótidos específicos se alinearon en el programa BLAST 2. 2. 15 (Altschul *et al.* 1997) con las secuencias de todos los hongos registradas hasta la fecha en el GenBank (4,753,923 secuencias; 18,936,235,727 letras totales) con el fin de descartar homologías con otros entomopatógenos. Las regiones amplificadas con los oligonucleótidos Pf211-1a/Pf211-1b; Pf154-1a/Pf154-1b y Pf204-1a/Pf204-1b cuando se alinearon con el programa BLAST no presentaron similitud significativa con otros hongos. Pero la región amplificada con los oligonucleótidos Pf150-1a y Pf150-1b comparte ciertos fragmentos de menos de 22bp con los hongos: *Coccidioides immitis* y *Candida glabrata*, estos fragmentos corresponden a una proteína hipotética (Fig. 23). Por lo que se trató de acotar la región y para tal propósito se diseñaron otros oligonucleótidos internos (Pf110-2a y Pf110-2b) que se muestran en la tabla de abajo, pero aun así se conservó sólo una región compartida con *Candida glabrata* (Fig. 24).

Oligonucleótido	Secuencia	T_m	%GC	reg. Amplificada
Pf110-2a	5' CAAgACTTgCCAgAgAATCg 3'	58.6	50	110bp
Pf110-2b	5' ggggATCgCAATAATCAACC 3'	61.4	50	110bp

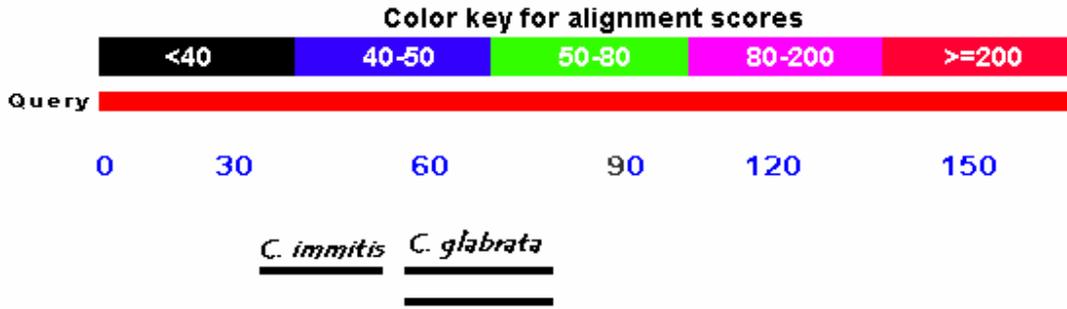


Figura 23. Comparación de la secuencia amplificada por los oligonucleótidos específicos (Pf150-1a y Pf150-1b) con todas las secuencias registradas en el GenBank. Las líneas negras indican las regiones compartidas con los hongos *Coccidioides immitis* y *Candida glabrata*.

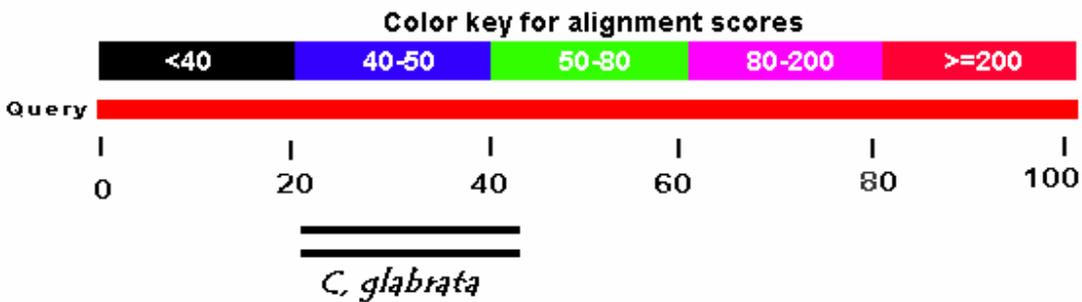


Figura 24. Comparación de la secuencia amplificada por los oligonucleótidos internos (Pf110-2a y Pf110-2b) con todas las secuencias registradas en el GenBank. Las líneas negras indican las regiones compartidas con el hongo *Candida glabrata*.

Estandarización de la PCR para los oligonucleótidos Pf154-1a/Pf154-1b; Pf211-1a/Pf211-1b; Pf204-1a/Pf204-1b. Para esto se utilizaron los aislados de *P. fumosoroseus* EH-506/3 y EH-520/3. Se realizaron curvas de MgCl₂ (1, 1.5, 2 y 2.5 mM), de DNA (1, 3 y 5 ng/μL), oligonucleótidos (10, 30, 50, 80 y 100 pmol/μL) y de igual manera con la temperatura de alineamiento de 50, 55 y 60°C; obteniendo como resultado amplificaciones inespecíficas, que no se pudieron eliminar en ninguna de las condiciones antes mencionadas (Fig. 25).

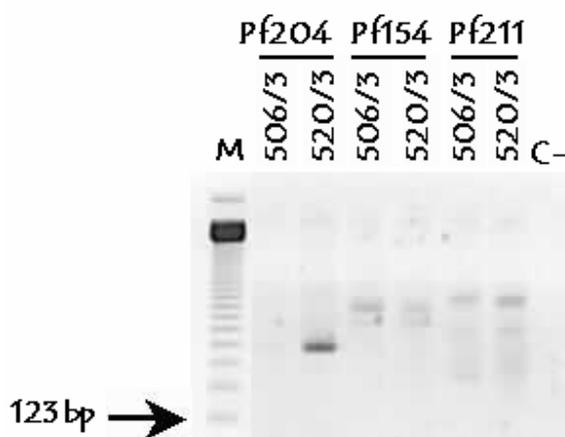
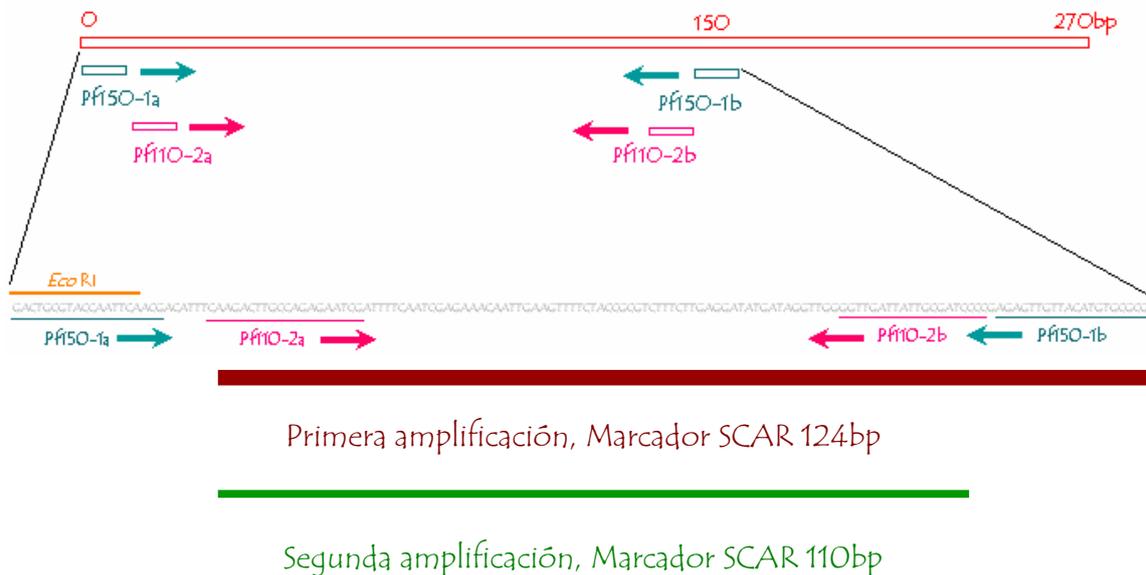


Figura 25. Amplificación de dos cultivos monospóricos de *P. fumosoroseus*, con los oligonucleótidos Pf211-1a/Pf211-1b; Pf204-1a/Pf204-1b y Pf150-1a/Pf150-1b. M: 123 bp DNA ladder.

Estandarización de la PCR del par de oligonucleótidos específicos Pf150-1a y Pf150-1b. Debido a que el oligonucleótido Pf150-1a se localiza en el sitio de restricción de la enzima *EcoRI*, se utilizó el oligonucleótido interno Pf110-2a, de esta manera se discrimina esta región de la enzima y se obtiene un fragmento de 124 bp. Por lo que la PCR semianidada esta constituida por la combinación de los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a que corresponden a la primera amplificación y la segunda amplificación esta dada por la combinación de los oligonucleótidos Pf110-2a y Pf110-2b con los que se amplifica una región de 110 bp. Como se muestra en la siguiente tabla y esquema 1:

	Oligonucleótido	Secuencia	Tm	%GC	reg. Amplificada
Primera amplificación	Pf150-1b	5' CgCgCACATgTAACAACCTCT 3'	59.9	50	124bp
	Pf110-2a	5' CAAgACTTgCCAgAgAATCg 3'	58.6	50	124bp
Segunda amplificación	Pf110-2a	5' CAAgACTTgCCAgAgAATCg 3'	58.6	50	110bp
	Pf110-2b	5' ggggATCgCAATAATCAACC 3'	61.4	50	110bp

Esquema 1. Diagrama del diseño de los oligonucleótidos para la PCR semianidada.



|

Primera amplificación por PCR con los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a. Para la estandarización de la PCR con los oligonucleótidos específicos antes mencionados se utilizó el aislado EH-520/3. Se realizaron curvas de MgCl₂ (1, 1.5, 2 y 2.5 mM), de DNA (1, 3 y 5 ng/μL), oligonucleótidos (10, 30, 50, 80 y 100 pmol/μL) y de igual manera con la temperatura de alineamiento de 55, 57 y 60°C.

Las condiciones óptimas para la primera amplificación, se realizó en un tubo para PCR de 200 μL con un volumen final de reacción de 25 μL. La mezcla de reacción contenía amortiguador de PCR (1X); MgCl₂ 2 mM; deoxinucleótido trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) 200 μM; oligonucleótidos (Sigma Genosys) 100 pmoles; DNA 10 ng; Amplicasa® (Biogénica, México) 1U, ajustando el volumen con agua de grado MilliQ. 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 60°C, 2 min a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Estas condiciones de

la reacción fueron las ideales para la amplificación selectiva de los DNAs de *P. fumosoroseus* ya que fue el único par que amplificó una banda específica de 124bp.

Para probar la especificidad de la primera amplificación empleando los oligonucleótidos seleccionados (Pf150-1b y Pf110-2a) se utilizaron DNAs de *P. fumosoroseus* y cepas de referencia, mostrando una amplificación específica de la banda de 124 bp sólo en muestras del Continente Americano (Fig. 26) con excepción del cultivo monospórico EH-506/3 procedente de Campeche. De igual manera se muestra la detección en el plásmido recombinante obtenido a través del método enzimático (Fig. 27).

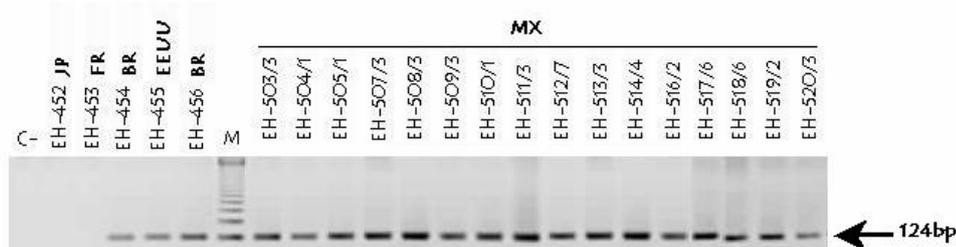


Figura 26. Amplificación de los cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus* y cepas de referencia de diferentes orígenes geográficos, con los oligonucleótidos específicos Pf150-1b y Pf110-2a. M: 123 bp DNA ladder.

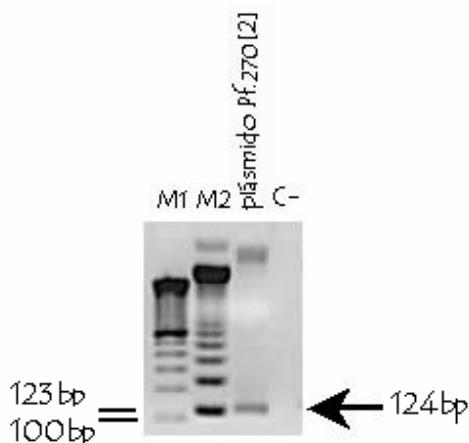


Figura 27. Amplificación con los pares de oligonucleótidos específicos Pf150-1b y Pf110-2a en el plásmido recombinante. M1: 100 bp DNA ladder, M2: 123 bp DNA ladder.

Evaluación de la especificidad de la primera amplificación. Para corroborar la especificidad del par de oligonucleótidos (Pf150-2b y Pf110-2a) se utilizaron DNAs de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *M. a.* var. *acridum*, *Verticillium lecanii* (Tabla 3 y 4), y tres especies de *Paecilomyces*, las cuales fueron *P. farinosus*, *P. amoeneroseus* y *P. carneus* (Tabla. 5). La figura 28 muestra la PCR de 4 cultivos monospóricos de *V. lecanii*, 5 cultivos de *M. a.* var. *anisopliae*, 11 cepas de referencia pertenecientes al género *Metarhizium* procedentes de diferentes orígenes geográficos (Driver *et al.* 2000) y el control positivo (EH-520/3) utilizando los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a; como resultado se obtuvo la amplificación exclusivamente con *P. fumosoroseus*. Utilizando los mismos oligonucleótidos en la figura 29 se muestra la PCR de 9 cultivos de *M. a.* var. *acridum* así como del control positivo, resultando la amplificación sólo en el control positivo.

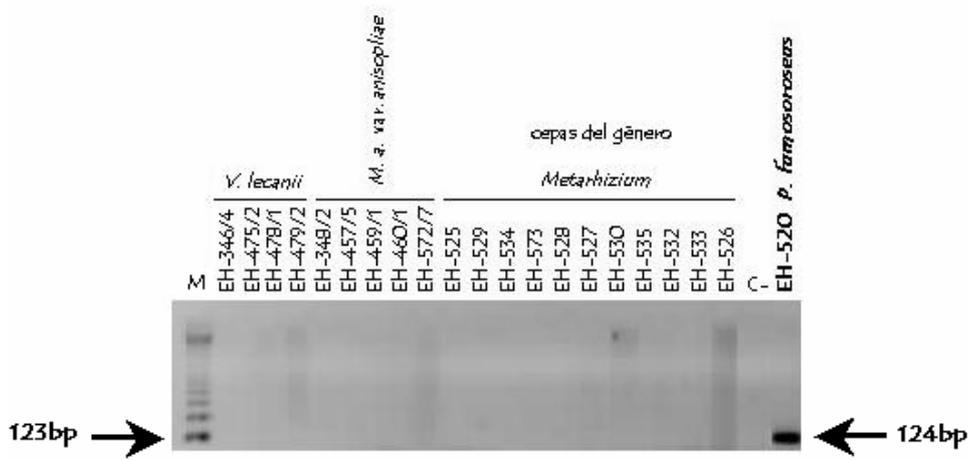


Figura 28. Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos específicos Pf150-1b y Pf110-2a, empleando cultivos monospóricos de *Verticillium lecanii*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, cepas de referencia del género *Metarhizium* y el control positivo (EH-520/3). M: 123 bp DNA ladder.

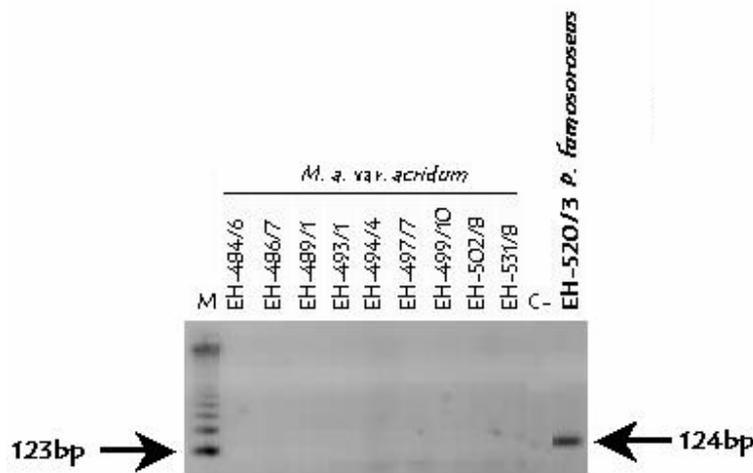


Figura 29. Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos específicos Pf150-1b y Pf110-2a, empleando cultivos monospóricos de *M. a. var. acridum* procedentes de México y el control positivo (EH-520/3) M: 123 bp DNA ladder.

La figura 30 muestra la PCR de las especies *Paecilomyces farinosus*, *P. amoeneroseus*, *P. carneus* y el control positivo, con los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a,

resultando la amplificación sólo con el control positivo correspondiendo a *P. fumosoroseus*.

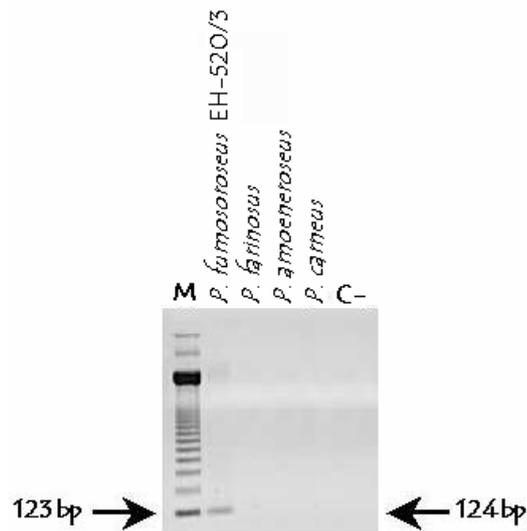


Figura 30. Amplificación de *P. farinosus*, *P. amoeneroseus*, *P. carneus* y el control positivo utilizando los oligonucleótidos específicos Pf150-1b y Pf110-2a. M: 123 bp DNA ladder.

Evaluación de la sensibilidad de la primera amplificación. El par de oligonucleótidos (Pf150-1b y Pf110-2a) diseñados a partir de la región clonada Pf270 [2], amplificaron su DNA blanco hasta la cantidad mínima de 1 pg/ μ L. En la figura 31 se observa la amplificación del DNA utilizando el cultivo monospórico EH-520/3 procedente de MX.

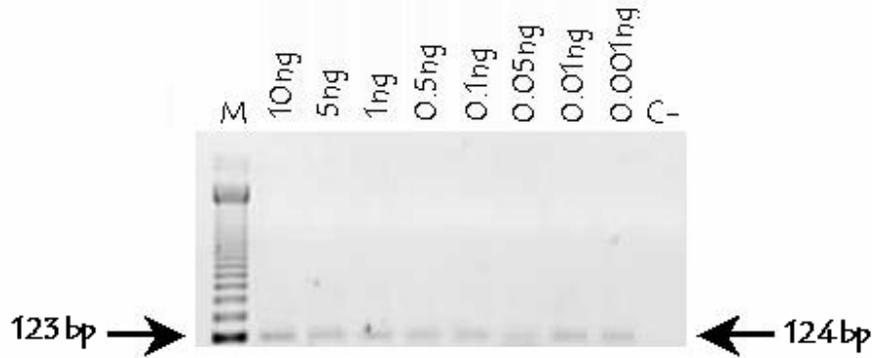


Figura 31. Sensibilidad de los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a utilizando concentraciones variables del DNA del cultivo monospórico EH-520/3 de MX. Los productos de la amplificación por PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. C-: control negativo. M: 123 bp DNA ladder.

Segunda amplificación de la PCR semianidadada. Una vez obtenido el producto de la primera amplificación, se cuantificó la cantidad amplificada (Fig. 32), para realizar diluciones y continuar con la segunda amplificación, esto se realizó con el fin de aumentar la sensibilidad del marcador SCAR. Las diluciones para la segunda amplificación van desde 10ng hasta 1fg, empleando los oligonucleótidos Pf110-2a y Pf110-2b, de esta manera se obtuvo una sensibilidad por su DNA blanco de 1fg como se muestra en la figura 33.



Figura 32. Primera amplificación con los oligonucleótidos (Pf150-1b y Pf110-2a) utilizando el cultivo monospórico EH-520/3 (*izquierda*); y cuantificación de la banda para realizar las diluciones para la segunda amplificación (*derecha*), en los primeros carriles se observan concentraciones conocidas del fago λ. M: 100 bp DNA ladder.

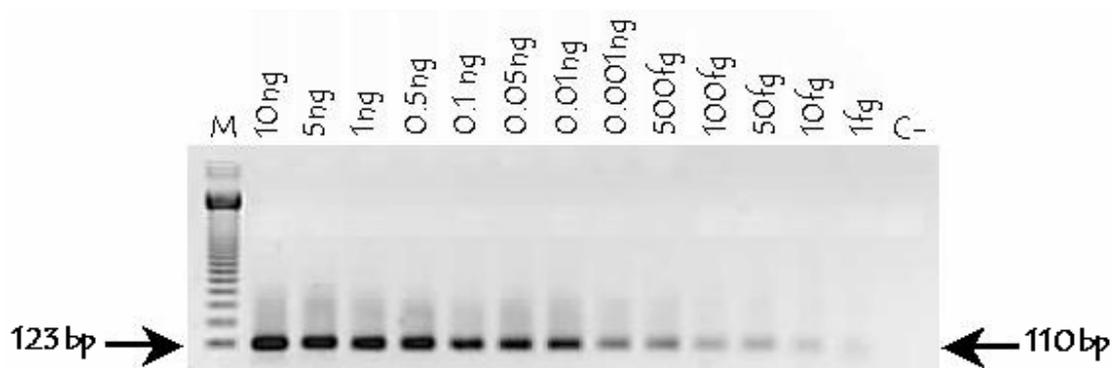


Figura 33. Sensibilidad de la segunda amplificación con los oligonucleótidos (Pf110-2a y Pf110-2b), utilizando concentraciones variables de la primera amplificación con los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a del cultivo monospórico EH-520/3 de MX. Los productos de la amplificación por PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. C-: control negativo. M: 123 bp DNA ladder.

Para corroborar la sensibilidad y especificidad de la segunda amplificación de la PCR semianidada se realizaron amplificaciones con los oligonucleótidos Pf110-2a/Pf110-2b y cultivos monospóricos de *Paecilomyces fumosoroseus* procedentes de MX, así como aislados del género *Metarhizium*, *Verticillium* y las otras especies de *Paecilomyces*, empleando las condiciones de la primera PCR y 2 μ L del producto obtenido en esta. Como resultado se obtuvo la banda de 110 bp y productos inespecíficos con otras especies de hongos entomopatógenos (Fig. 34) por lo que se modificaron las condiciones de amplificación para hacerlas más astringentes, al aumentar la temperatura de alineamiento a 66°C y disminuir la concentración de MgCl₂ a 1.5 mM, las bandas inespecíficas se eliminaron en todos los casos, sin embargo el aislado EH-506/3 (procedente de Campeche) no fue detectado con la segunda amplificación, como se puede apreciar en la figura 35. Como se modificó la temperatura de astringencia, fue necesario corroborar la sensibilidad de la segunda amplificación utilizando el amplicón de la primera utilizando el aislado EH-520/3. En la figura 36 se observa que la segunda

amplificación, en la cual se obtiene producto hasta la dilución de 1fg de la primera amplificación.

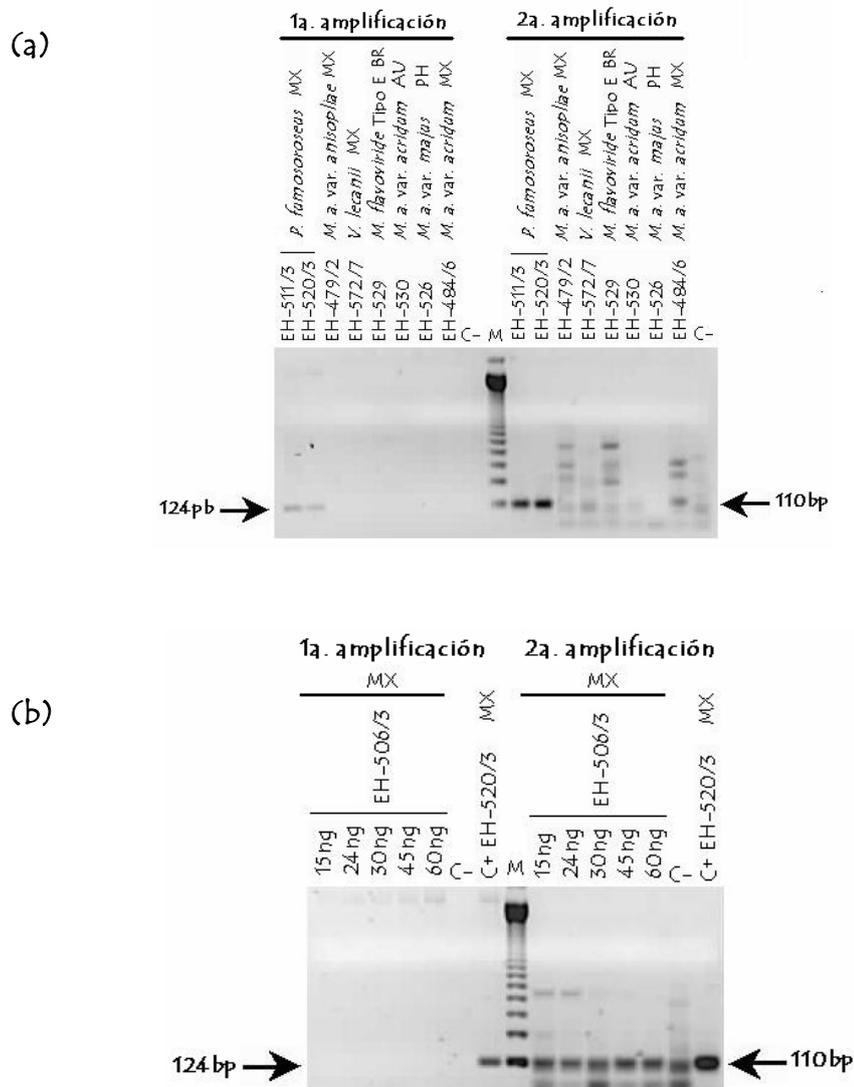


Figura 34. Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos para la segunda amplificación (Pf110-2a/Pf110-2b), (a) empleando especies de los géneros *Verticillium*, *Metarhizium* y (b) el cultivo monospórico EH-506/3 de *P. fumosoroseus* con las condiciones de la primera amplificación. M: 123 bp DNA ladder.

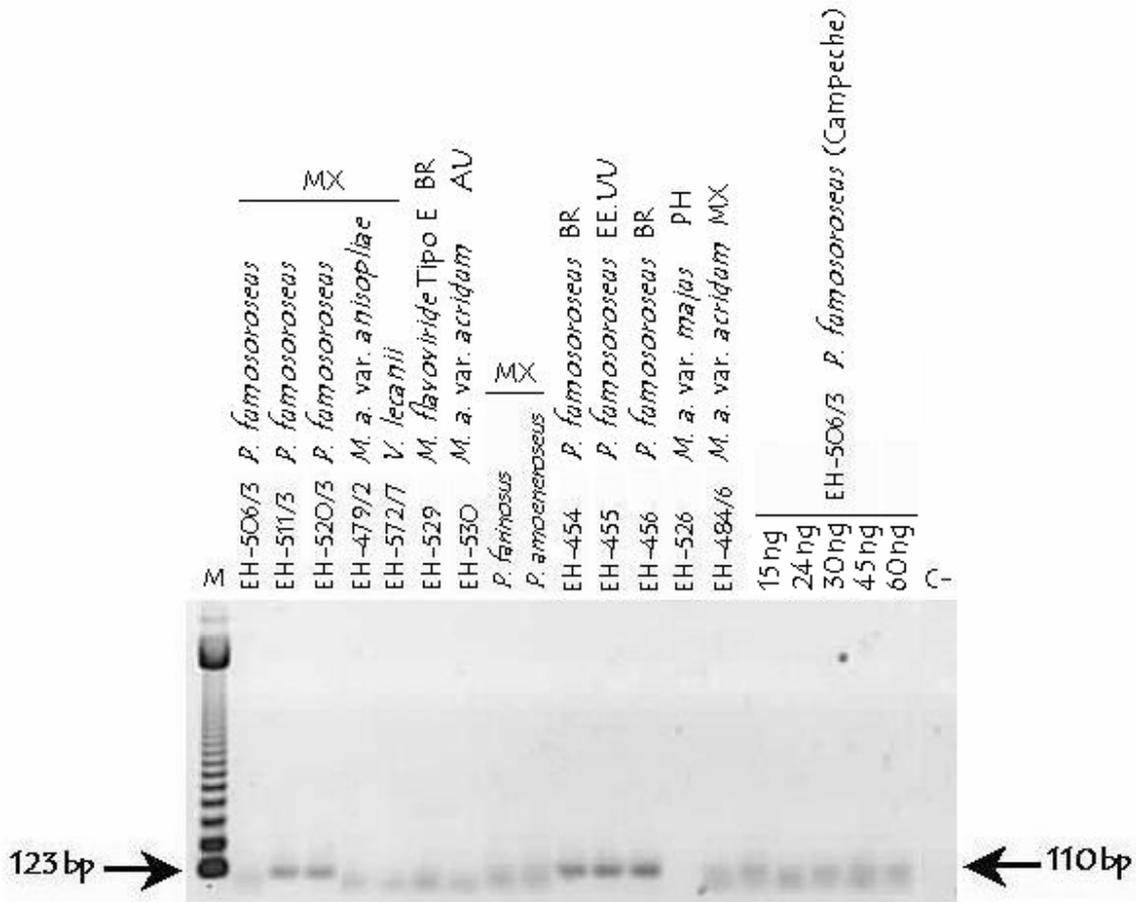


Figura 35. Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos para la segunda amplificación (Pf110-2a/Pf110-2b), empleando especies de los géneros *Verticillium*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* con las nuevas condiciones de la PCR. M: 123 bp DNA ladder.

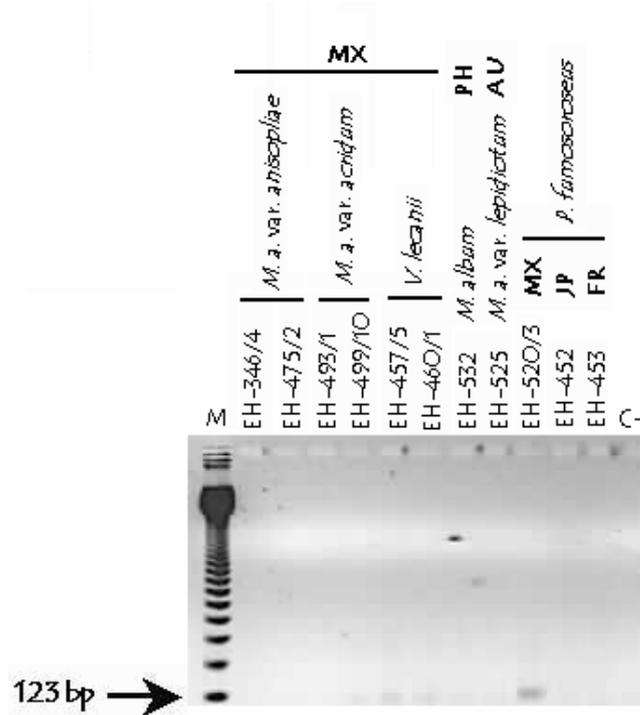


Figura 36. Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos para la segunda amplificación (Pf110-2a/Pf110-2b), empleando especies de los géneros *Verticillium*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* con las nuevas condiciones de la PCR. M: 123 bp DNA ladder.

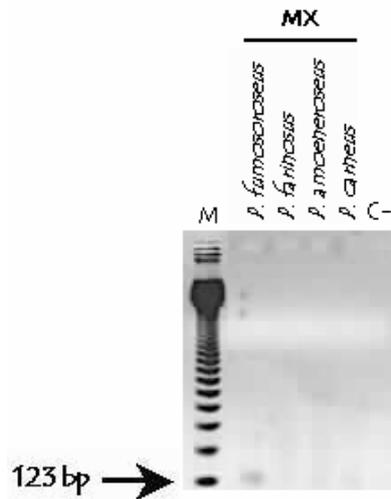


Figura 37. Amplificación de *P. farinosus*, *P. amoeneroseus*, *P. carneus* y el control positivo (EH-520/3) utilizando los oligonucleótidos para la segunda amplificación y las nuevas condiciones de la PCR. M: 123 bp DNA ladder.

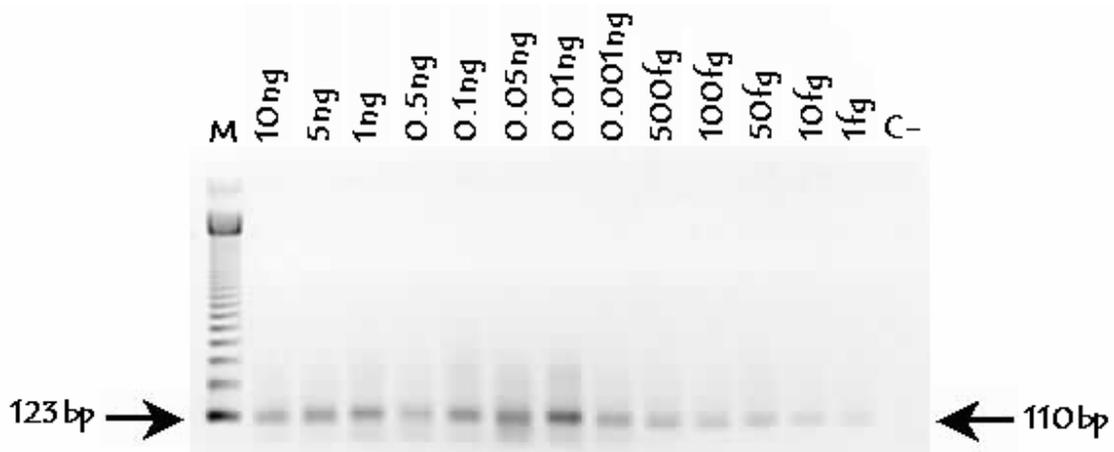


Figura 38. Sensibilidad de la segunda amplificación de la PCR semianidada (Pf110-2a y Pf110-2b), con las nuevas condiciones de amplificación, utilizando diferentes concentraciones de la primera amplificación con los oligonucleótidos Pf150-1b y Pf110-2a del aislado EH-520/3 de MX. Los productos de la amplificación por PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. C-: control negativo. M: 123 bp DNA ladder.

DISCUSIÓN

En la actualidad en el mundo se han desarrollado marcadores moleculares para la identificación de hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana*, *Verticillium dahliae*, *Trichoderma hamatum* y *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Hegedus y Khachatourians 1996; Li *et al.* 1999; Abbasi *et al.* 1999; Castrillo *et al.* 2003; Arroyo 2005; Entz *et al.* 2005). Sin embargo, la identificación de *Paecilomyces fumosoroseus* sólo se ha llevado a cabo a través de 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). Dado que no existen marcadores moleculares para su identificación y tipificación, en el presente trabajo se obtuvieron marcadores tipo SCAR, a partir de patrones polimórficos de AFLP de aislados procedentes de MX, del hongo *P. fumosoroseus*.

El género *Paecilomyces* presenta una gran variabilidad genotípica como lo han mostrado Tigano *et al.* (1995a; 1995b), Cantone y Vandenberg (1998), Oborník *et al.* (2000), Fargues y Bon (2004), los cuales plantean que estas diferencias probablemente se deben al rango de hospederos y a su distribución geográfica. Asimismo, podrían deberse a la capacidad del microorganismo para adaptarse a los cambios ambientales de manera eficaz o a la presencia de diferentes genotipos, que podrían sugerir que en el campo es recomendable asperjar la combinación de varios aislados en las formulaciones, para llevar un control biológico más eficiente (Tigano *et al.* 1995a; Tigano y Aljanabi, 2000). Oborník (2000) sugiere que es posible que este hongo presente recombinación aunque no se le conoce estado sexual, sin embargo se reportó una vía de recombinación mitótica *in vitro* a través de la reproducción parasexual, que posiblemente podría ser una estrategia para el intercambio genético en este hongo (Riba y Ravelojoana, 1984). Por otro lado, la elevada diversidad genética en los hongos anamórficos podría explicarse posiblemente por la aparición de heterocariontes (Cantone y Vandenberg, 1998). Esta variabilidad genética entre los aislados de

P. fumosoroseus también se refleja en el trabajo realizado por Cavallazzi (2002), donde se estudió la genotipificación de aislados de *P. fumosoroseus* obtenidos de la mosquita blanca *B. tabaci*, provenientes de los estados de Campeche, Colima, Nayarit, Sinaloa y Yucatán, a través de marcadores RAPD. Este estudio reveló un amplio polimorfismo entre los 14 aislados estudiados, así como una división en 5 grupos fenéticos empleando las 5 cepas de referencia de diferente origen geográfico de Tigano *et al.* (1995a). El Grupo I incorpora a todos los aislados de MX. El Grupo II y III pertenecen al Continente Americano con aislados de Estados Unidos (EE.UU) y Brasil (BR). Por último los Grupos IV y V corresponden al Continente Europeo y Asiático respectivamente. De esta clasificación se observó que los aislados de MX no se agrupan con las cepas de referencia estudiadas, lo que hace suponer que los aislados de MX podrían constituir un nuevo grupo fenético diferente a lo reportado en la literatura. Esta separación de los aislados de MX nos indica que hay diferencias genéticas con los aislados de otros países, por lo que era necesario obtener marcadores moleculares que reconocieran aislados regionales y a partir de éstos aislar un marcador compartido por estos aislados, a partir de un patrón polimórfico generado por la técnica de AFLP para convertirlo en un marcador SCAR. La elección de esta técnica se hizo con base en su alta resolución y mayor reproducibilidad en comparación con otras técnicas de "fingerprinting", además utiliza altas temperaturas lo que se refleja en su mayor reproducibilidad. En otras investigaciones se ha observado que aporta mayor información para discriminar organismos a nivel de especie, subespecie y cepas (Savelkuol *et al.* 1999; Jiang S *et al.* 2000).

En los patrones polimórficos obtenidos por AFLP se observó una gran variabilidad intraespecífica entre los aislados de MX y no fue posible obtener marcadores monomórficos para estos aislados, con las diferentes combinaciones de bases adicionales al sitio de las enzimas de restricción (*EcoRI* y *MseI*). Por tal motivo la selección de los marcadores se hizo con base en aquellos que tuvieran el mayor porcentaje de presencia

en los patrones polimórficos de los aislados de MX, de esta manera sólo se eligieron cuatro bandas de 200, 230; 270 y 400 bp generadas con los oligonucleótidos *EcoRI*-AA/*MseI*-CTT; *EcoRI*-AA/*MseI*-CTA y *EcoRI*-AC/*MseI*-CAG respectivamente, ya que estas bandas se encuentran presentes en más de un 80% de los cultivos monospóricos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cavallazzi 2002 quién encontró que solo algunos aislados de MX, (503 y 504; 516 y 519; 509 y 513) se agruparon con 88% de similitud, los otros aislados no compartieron este porcentaje de similitud a pesar de que provienen de la misma región geográfica.

Durante la generación de los marcadores SCAR fue necesario modificar ciertos criterios metodológicos para obtener resultados óptimos. Después de elegir las bandas (200, 230; 270 y 400 bp), se reamplificaron con el propósito de obtener una mayor concentración de los amplicones, pero se obtuvieron unas bandas inespecíficas por lo que se modificó el programa de amplificación. El programa inicial tenía un gradiente de temperatura que disminuía 0.7°C durante 12 ciclos para el alineamiento de los oligonucleótidos, esto hacía inespecífica la amplificación de un solo producto de PCR, por lo que se eliminó el gradiente y se mantuvo una temperatura constante, de esta manera se generó un solo producto, que permitió continuar con los métodos tradicionales de clonación, secuenciación y análisis de las secuencias.

Por otro lado, al comparar las secuencias de los marcadores obtenidos (Pf₂₇₀[2], Pf₄₀₀[1], Pf₂₀₀[1] y Pf₂₃₀[2]) con las depositadas en el GenBank, se encontró que la secuencia Pf₂₇₀[2] fue la única que compartió regiones homólogas no mayores de 22 bp con los hongos *Coccidioides immitis* y *Candida glabrata*. En el diseño de los oligonucleótidos específicos se eliminó el sitio compartido con *C. immitis* con el fin de aumentar la especificidad y reducir las posibilidades de reconocimiento inespecífico. Al evaluar los oligonucleótidos Pf150-1a y Pf150-1b, se encontró que generaban bandas inespecíficas, debido a que el primer oligonucleótido (Pf150-1a) se encuentra en el sitio

de restricción de la enzima *EcoRI*, lo que ocasionaba que se reconociera cada sitio de restricción a lo largo del genoma dando como resultado múltiples bandas. En contraste los oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones Pf₄₀₀[1], Pf₂₀₀[1] y Pf₂₃₀[2] siempre presentaron bandas inespecíficas durante su amplificación, las cuales no se pudieron eliminar con la estandarización de la PCR, por lo que estas regiones pueden estar compartidas con otras regiones más grandes a lo largo del genoma de *P. fumosoroseus* y esto no permite la discriminación del hongo. Ante estas inconveniencias, se tuvieron que diseñar oligonucleótidos internos de la región comprendida por Pf150-1a y Pf150-1b, ésta región se acotó hacia la derecha para eliminar el sitio de restricción, por lo que el nuevo oligonucleótido (Pf110-2a) la elimina (ver esquema 1). De esta manera los oligonucleótidos (Pf150-1b y Pf110-2a) dan un producto de PCR de 124bp. Al probar su especificidad con DNA de cultivos monospóricos de *P. fumosoroseus* se obtuvo la banda esperada en todos los aislados, excepto en el cultivo EH-506/3, también se obtuvo amplificación con las cepas del Continente Americano (2 cepas de BR y 1 de EE.UU), estos resultados concuerdan con lo reportado por Tigano *et al.* 1995a; Cantone y Vandenberg 1998, quienes en su dendograma agruparon a estas cepas con la procedente de MX, por lo que este marcador es útil en el reconocimiento de aislados del continente americano.

Con el propósito de que este marcador reconociera todos los aislados de MX, se realizó una segunda amplificación con los oligonucleótidos internos (Pf110-2a/Pf110-2b), estos lograron identificar todos los aislados de MX, pero también identificaron otras especies de *Paecilomyces* (*P. farinosus*, *P. amoeneroseus* y *P. carneus*) así como de *Metarhizium* y *Verticillium*. Para eliminar esta inespecificidad se aumentó la temperatura de alineamiento a 66°C y se disminuyó la concentración de MgCl₂ a 1.5 mM, no obstante que se modificaron las condiciones de amplificación no fue posible detectar el aislado EH-506/3, pero se eliminó la reacción cruzada con las

otras especies de *Paecilomyces*. Es importante resaltar que el aislado EH-506/3 es el de mayor virulencia y el que menos esporula (*com. pers.* Dra. Toriello).

La inespecificidad con las otras especies de *Paecilomyces* puede sugerir el cambio en uno o más nucleótidos en la secuencia del marcador, ya que al aumentar la temperatura el reconocimiento se hace más específico. La segunda amplificación de la PCR semianidada aumentó la sensibilidad del marcador SCAR hasta 1fg.

El marcador SCAR (banda seleccionada) es una herramienta importante para realizar un seguimiento del hongo *P. fumosoroseus* en el campo, ya que hasta ahora solo se cuenta con los métodos tradicionales, como lo son los aislamientos *in situ* y la consiguiente identificación que implica la aplicación de numerosas pruebas fenotípicas, que tienen algunas limitaciones. Además estos marcadores son importantes en investigaciones taxonómicas como es el caso de Shimizu *et al.* (1993) quienes resaltan la importancia de obtener marcadores moleculares para la hibridación con el cariotipo electroforético e identificar específicamente al hongo, ya que estos investigadores solo determinaron la variación que existe en 3 aislados de *P. fumosoroseus* a través del cariotipo electroforético, y ellos plantean que el trabajo podría tener más valor taxonómico si se contara con estos marcadores. Por lo que la selección de los marcadores SCAR constituyen hoy en día, una herramienta indispensable que facilita la identificación y caracterización genética de diferentes organismos.

Consideramos que estos marcadores cumplen con las condiciones de especificidad y sensibilidad para identificar al hongo *P. fumosoroseus* en la naturaleza, sin embargo, cabe mencionar que mientras no se tengan secuenciados todos los organismos se correrá el riesgo de presentar problemas de cruce con organismos cuyas secuencias no estén incluidas en el GenBank, puesto que las sondas se diseñan con base en los datos existentes. Además la identificación molecular es dependiente de la calidad

de la secuencia depositada en el GenBank, puesto que en muchos casos existen huecos en las secuencias que puede conducir a resultados engañosos o a obtener resultados difíciles de interpretar (Millar *et al.* 2003).

Es claro que estos marcadores son útiles para la detección de propágulos de *P. fumosoroseus* en muestras del ambiente, sin embargo es importante mencionar que se hace necesario comentar que en estudios de viabilidad para estudiar la persistencia del mismo en el ambiente, se lleven a cabo paralelamente cultivos del hongo, ya que los métodos moleculares no detectan viabilidad en la naturaleza.

PERSPECTIVAS

Los marcadores SCARs se utilizarán para valorar la eficacia y persistencia del hongo *P. fumosoroseus* particularmente en campos agrícolas mexicanos, debido a que éstos fueron diseñados a partir de aislados procedentes de MX, es decir contamos con un marcador autóctono, además este marcador tiene ventajas sobre otros métodos morfológicos como dilución en placa, debido a que presenta alta sensibilidad. Otra ventaja de estos marcadores es que permiten valorar la presencia de poblaciones nativas en el campo, puesto que éstas pueden enmascarar o aumentar el efecto de la cepa fúngica introducida (micoinsecticida). Por otro lado estos SCARs se pueden utilizar para evaluar la variación genética entre los aislados de *P. fumosoroseus* así como determinar su estructura de poblaciones.

Debido a que el marcador no reconoce a todos los aislados de México, como fue el caso del EH-506/3, y siendo este el mejor candidato para ser utilizado como micoinsecticida debido a su alta virulencia, es que se tratará de perfeccionar el diseño de los oligonucleótidos para la identificación de este aislado.

Con ayuda de la secuenciación del aislado EH-506/3, en las condiciones donde se obtiene una amplificación del marcador SCAR, se mandará secuenciar para determinar las variantes en la secuencia de este aislado con respecto a la secuencia obtenida del marcador generado por AFLP.

CONCLUSIONES

1. El AFLP es una técnica con la que se pueden obtener marcadores moleculares especie-específicos, los cuales son más sensibles que otras técnicas de "fingerprinting" como el RAPD.
2. Los dos pares de oligonucleótidos específicos Pf150-1b/Pf110-2a y Pf110-2a/Pf110-2b amplifican una banda de 124 y 110bp respectivamente, del hongo *P. fumosoroseus*. Con un porcentaje de reconocimiento del 94% de los aislados utilizados.
3. La segunda amplificación de la PCR semianidada identifica a *P. fumosoroseus* de México, excepto el aislado EH-506/3 procedente de Campeche. Además detecta aislados de EE.UU y BR. Lo que nos indicaría que el marcador reconoce a la gran mayoría de los aislados procedentes del Continente Americano.
4. Los pares de oligonucleótidos específicos para *P. fumosoroseus*, no amplifican DNAs del género *Metarhizium*, *V. lecanii* y las cepas *P. farinosus*, *P. amoeneroseus* y *P. carneus*.
5. La segunda amplificación de la PCR semianidada aumenta la sensibilidad del marcador SCAR. Los oligonucleótidos de la primera amplificación Pf150-1b/Pf110-2a detectan hasta 1pg de DNA de *P. fumosoroseus*. Mientras que los oligonucleótidos de la segunda amplificación Pf110-2a/Pf110-2b detectan hasta 1fg.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Altre J, Vandenberg J, Cantone F. 1998. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to Diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed and attachment to cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 332-338.
- Altschul S, Madden T, Schäffer 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.
- Arroyo E. 2005. Obtención de marcadores de regiones amplificadas de secuencias caracterizadas, para la identificación del hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 58 pp.
- 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.

- Butt T, Jackson C, Magan N. 2001. Fungi as biocontrol agents. Progress, Problems and Potential. CABI Publishing. Wallingford. UK.
- Cantone F, Vandenberg J. 1998. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 102: 209-215.
- 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.
- Cavallazzi G. 2002. Caracterización genotípica de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith aislados en México y análisis de su virulencia *in vitro* en la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Tesis de maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 70 pp.
- Chew J, Strongman D, Mackay R. 1998. Comparisons of twenty isolates of the entomopathogen *Paecilomyces farinosus* by analysis of RAPD markers. *Mycol. Res.* 102: 1254-1258.
- Domsch K, Gams W, Anderson T. 1980. Compendium of Soil Fungi Academic Press, New York. Pp. 529-530.
- 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.

- Entz S, Jonson D, Kawchuk L. 2005 Development of PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycol. Res.* 109: 1302-1312.
- Fargues J, Bon M. 2004. Influence of temperature preference of two *Paecilomyces fumosoroseus* lineages on their co-infection pattern. *J. Invertebr. Pathol.* 87: 94-104.
- 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.
- García J, Gutiérrez A. 1998. Impacto de *P. fumosoroseus* contra la mosca blanca *B. tabaci* en Quintana Roo. En XXI Congreso Nacional de Control Biológico. SAGAR. Tamaulipas, México. Nov 5-6. pp: 189-192.
- Glare T, Milner R, Baeton C. 1996. Variation in *Metarhizium*, a genus of fungal pathogens attacking Orthoptera: Is spore morphology a useful criterion? *J. Orthop. Research.* 5: 19-27.
- 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.
- Hu X, Nazar R, Robb J. 1993. Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 23-36.

- 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.
- Jiang S, Matte M, Matte G, Huq A, Colwell R. 2000. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 148-153.
- Li K, Rouse D, German T. 1994. PCR primers that allow intergeneric differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium ssp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 60(12): 4324-4331.
- 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.
- Millar B, Jiru X, Walker J, Evans J, Moore J. 2003. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right?. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5778-5780.
- Nazar R, Hu X, Schmidt J, Culham D, Robb J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 1-11.

- Oborník M, Marek K, Lukáš Z. 2000. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. *Can. J. Bot.* 78(9): 1150-1155.
- Oborník M, Jirku M, Doležel D. 2001. Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecilomyces* polyphyletic?. *Can. J. Microbiol.* 47: 813-819.
- Osborne L, Landá Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Fla. Entomol.* 75: 456-471.
- Ortega A. 1991. Mosquitas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) vectores de virus en hortalizas. En: Plagas de hortalizas y su manejo en México. Amaya S, Bautista N (eds.). Centro de Entomología y Acarología, Sociedad Mexicana de Entomología.
- Pineda-Guillermo S, Alatorre-Rosas R. 1995. Potencialidad de los hongos entomopatógenos *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* sobre la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum*. En: XVIII Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Chiapas, México. Nov 9-10. pp. 77-78.
- Ramírez J. 1996. Manejo integrado de la mosquita blanca de la hoja plateada. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía, Culiacán, Sinaloa. México.
- Ribá G, Ravelojoana A. 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. *Can. J. Microbiol.* 30: 926-929.

- Riba G, Bouvier-Fourcade I, Caudal A. 1986. Isoenzyme polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. *Mycopathologia*. 96: 161-169.
- 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.
- SAGARPA. 2001. Taller internacional de transferencia de tecnología en control microbiano de langosta *Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker. 2-5 Octubre, Yucatán, Mérida. México.
- Salguero R. 1994. Análisis del complejo mosca blanca-virosis en tomate. En: Biología y Manejo del Complejo Mosca Blanca-Virosis. Mata M, Dardón d, Salguero V (eds.). Antigua, Guatemala. pp. 16-22.
- Savelkoul P, Aarts H, Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker J, Schouls L, Lenstra J. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3083-3091.
- Shimizu S, Yoshioka H, Matsumoto T. 1993. Electrophoretic karyotyping of the entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16: 183-186.
- Souza A, Sosa D, Rodríguez M, Pelegrinelli M. 2000. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes)

- against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (Homoptera: Aleyrodidae). *Genet. Mol. Biol.* 23: 61-63.
- St Leger R, Frank J, Roberts D, Staples R. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 313: 1-7.
 - St Leger R. 1993. Biology and mechanisms of invasion of deuteromycete fungal pathogens. *Parasites Pathogens Insects* 2: 211-229.
 - St Leger R. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J. Bot.* 73(1): S1119-S1125.
 - St Leger R, Joshy L. 1997. Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. New York. pp. 367-393.
 - Stehlik I, Blattner F. 2004. Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex nivialis* (Polygonaceae) and implications for the evolution of sex chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 108: 238-242.
 - Tigano M, Honeycutt R, Lacey L, Assis R, McClelland M, Sobral B. 1995a. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 274-282.
 - Tigano M, Samson R, Martins I, Sobral B. 1995b. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology.* 141 (1): 239-245.

- Tigano M, Driver F, Trueman J, Inglis P, Milner R. Phylogeny of *Paecilomyces* species revealed by analysis of ribosomal RNA ITS sequences. In XXI International Congress of Entomology. 1999. Foz do Iguaçu, Abstract Book 1, p. 544.
- Tigano M, Aljanabi S. 2000. RAPD analysis of *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 75: 240-242.
- Torres A, Vidal Y, López V, Torre M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva* 21: 291-295.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- 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.
- Yañez M. 1990. La mosquita blanca. Agromundo, Sepomex. México. pp. 14-22.