



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Variabilidad genotípica del hongo *Metarhizium anisopliae*
aislado de la mosca pinta de los pastos (*Aeneolamia* spp.) en
México

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

HORTENSIA NAVARRO BARRANCO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

MEXICO, D.F.

FEBRERO DE 2006



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.

La caracterización fenotípica de este trabajo se realizó en el laboratorio de Micología Básica bajo la dirección de la Dra. Concepción Toriello Nájera. La caracterización genotípica se llevó en el laboratorio de Micología Molecular bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Reyes Montes. Ambos laboratorios se ubican en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación forma parte del megaproyecto de investigación “Caracterización genotípica y fenotípica de hongos entomopatógenos: Instrumentos para optimizar su selección como insecticidas biológicos contra plagas agrícolas” clave G-31451-B, el cual fue financiado por CONACYT.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutoral por su valioso apoyo

Dra. Concepción Toriello Nájera

Dra. María del Rocío Reyes Montes

Dra. Irma Rosas Pérez

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación forma parte del megaproyecto de investigación “Caracterización genotípica y fenotípica de hongos entomopatógenos: Instrumentos para optimizar su selección como insecticidas biológicos contra plagas agrícolas” clave G-31451-B, el cual fue financiado por CONACYT.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutoral por su valioso apoyo

Dra. Concepción Toriello Nájera

Dra. María del Rocío Reyes Montes

Dra. Irma Rosas Pérez

A mi familia con todo mi amor dedico esta tesis por su gran comprensión, paciencia y el apoyo que siempre me han brindado.

A la Dra. Conchita Toriello Nájera con gran cariño y admiración por todas sus enseñanzas, confianza y el constante apoyo que siempre he recibido.

A la Dra. Rocío Reyes Montes, mi más sincero agradecimiento por su valiosa asesoría y consejos pero sobre todo por su amistad.

A la QFB Amelia Pérez Mejía gracias querida amiga, por tu gran amistad y apoyo para seguir adelante

Un especial agradecimiento al Biól. David Basilio, Biól. Elena Montoya y al M: en C. Miguel Ayala por su paciencia y ayuda en la elaboración de este trabajo A: la M. en C. Gina Cavallazi, M. en C. Claudia Cano, Biól. Patricia Jiménez. A todos ellos, por formar un bonito equipo de trabajo y haber compartido tan gratos momentos pero ante todo gracias por su amistad.

Agradezco al M. en C. Víctor Hernández V y a la Bióloga Angélica Berlanga del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico-SAGARPA, Tecomán, Colima por brindar los aislados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

ÍNDICE

Pág.

RESUMEN
ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO GENERAL	12
6. OBJETIVOS PARTICULARES	12
7. MATERIAL Y MÉTODOS	13
7.1 .Material fúngico	13
7.2.Obtención de cultivos monospóricos	13
7.3.Comparación y selección de cultivos originales y monospóricos	16
a) Crecimiento radial	16
b) Esporulación	16
c) Tamaño de conidios	17
d) Análisis estadístico	17
e) Selección de cultivos monospóricos	17
7.4.Mantenimiento y conservación de cultivos originales y monospóricos seleccionados	17
a) Conservación en agua destilada estéril	17
b) Conservación en nitrógeno líquido	17
c) Conservación en aceite mineral	18
7.5.Caracterización fenotípica de los aislamientos a estudiar por medio de la termotolerancia	18
a) Termotolerancia	18
b) Análisis estadístico	18
7.6.Caracterización genotípica de los cultivos originales y monospóricos	
a) Extracción de DNA	19
b) Cuantificación del DNA por electroforesis	20
c) Obtención del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)	20
d) Análisis estadístico	21

8. RESULTADOS	23
8.1. Obtención de cultivos monospóricos	23
8.2. Caracterización fenotípica de cultivos originales y monospóricos para su selección	23
a) Crecimiento radial	23
b) Esporulación	24
c) Tamaño de conidios	24
d) Selección de cultivos monospóricos	25
8.3. Termotolerancia de aislamientos originales y cepas de referencia	27
8.4. Caracterización genotípica de los cultivos originales y monospóricos	33
a) Extracción de DNA	33
b) Estandarización del polimorfismo por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)	34
• Curva de dNTP's	35
• Curva de oligonucleóido	35
• Curva de cloruro de magnesio	35
c) Obtención del polimorfismo del DNA por amplificación al azar utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)	37
9. DISCUSIÓN	42
10. CONCLUSIONES	49
11. BIBLIOGRAFÍA	50
12. ANEXOS	58
a) Anexo 1	58
b) Anexo 2	64
c) Anexo 3	65
ÍNDICE DE TABLAS	76
ÍNDICE DE FIGURAS	77
ÍNDICE DE ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS	
	Págs.
1. Clasificación del género <i>Metarhizium</i> basada en caracteres morfológicos y en taxonomía molecular	3
2. Datos de <i>Metarhizium anisopliae</i> aislados de la mosca pinta (<i>Aeneolamia</i> spp.) en cultivos de caña de azúcar.	14
3. Características de las especies tipo del género <i>Metarhizium</i>	15
4. Iniciadores y secuencias utilizadas en la técnica de RAPD-PCR	22
5. Programas de amplificación utilizados en la técnica de RAPD-PCR	22
6. Aislamientos de <i>M. anisopliae</i> estudiados, número de cultivos monospóricos obtenidos, tasa de crecimiento, producción de conidios y largo de conidios.	26
7. Diámetro colonial final a 15, 25, 30 y 35 °C de los cultivos originales y especies tipo de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> en estudio.	30

ÍNDICE DE FIGURAS	
1. Morfología del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i>	2
2. Mecanismo de infección por hongos entomopatógenos	4
3. Estados ganaderos y productores de caña de azúcar afectados por el salivazo de los pastos	5
4. Obtención de cultivos monospóricos	16
5. Comparación entre un cultivo original y monospóricos obtenidos	23
6. Curva de crecimiento de un cultivo original y monospóricos obtenidos	24
7. Gráfica del número de conidios/ mL del aislamiento EH-465 y cultivos monospóricos obtenidos	25
8. Promedio del crecimiento a 25 °C de aislamientos de <i>M. anisopliae</i> en MX	31
9. Promedio del crecimiento a 30 °C de aislamientos de <i>M. anisopliae</i> en MX	31
10. Promedio del crecimiento a 15, 25, 30 y 35 °C de aislamientos de <i>M. anisopliae</i> en MX	32
11. Curva de DNA del fago λ y del obtenido de los cultivos monospóricos de <i>M. anisopliae</i>	33
12. Estandarización del programa de amplificación de PCR, utilizando los programas de Driver <i>et al.</i> (2000) y Cobb y Clarkson (1993)	34
13. Curva de oligonucleótidos utilizando DNA del aislamiento EH-469/7	35
14. Curva de dNTPs utilizando el oligonucleótido OPA-04 con DNA del aislamiento EH-469/7	36
15. Curva de MgCl ₂ utilizando el oligonucleótido OPA-04 con DNA de CSIRO F-147 y del aislamiento EH- 478/1	36
16. Patrón polimórfico del aislamiento EH-465/8 con 11 oligonucleótidos	37
17. Patrón polimórfico utilizando el oligonucleótido OPA-01 y el DNA de aislamientos de MX	38
18. Patrón polimórfico utilizando el oligonucleótido OPA-8 y el DNA de	39

aislamientos de MX	
19. Patrón polimórfico utilizando el oligonucleótido OPH-02 y el DNA de aislamientos de MX	39
7.720. Fenograma que muestra las relaciones entre especies tipo e) Extracción de DNA f) Cuantificación del DNA por electroforesis y los aislamientos del género <i>Metarhizium</i>	40
21. Análisis de componentes principales (ACP)	41
22. Análisis de Árbol de Tendido Mínimo (ATM)	41

ÍNDICE DE ANEXOS	
ANEXO 1. Resultados de la tasa de crecimiento, producción de conidios y largo de conidios de los aislamientos originales y sus monospóricos.	61
ANEXO 2. Tasa de crecimiento a 15, 25, 30 y 35 °C de los cultivos y las cepas de referencia de <i>M. anisopliae</i> .	66
ANEXO 3. Prueba de Tukey aplicada a datos de termotolerancia.	67
ANEXO 4. Matriz de presencia/ausencia en todos los aislados y cepas de referencia de <i>M.anisopliae</i> .	71

RESUMEN

Metarhizium es uno de los géneros mejor conocidos de hongos entomopatógenos. Dado su relevancia como agente microbiano de control biológico, es necesario conocer las características fenotípicas y genotípicas de las especies utilizadas. Para ello se estudiaron 18 aislamientos de *M. anisopliae* de la mosca pinta de los pastos (Homoptera: Cercopidae). Se utilizaron once cepas de referencia del género *Metarhizium* de las colecciones ARSEF (EEUU) y CSIRO (Australia) que representan diez grupos (clados) taxonómicos de *Metarhizium* propuestos por Driver *et al.* (2000). Para contar con poblaciones genéticamente homogéneas, se seleccionaron cultivos monospóricos obtenidos a partir del cultivo original aislado del insecto. La selección se llevó a cabo considerando tres características fenotípicas: velocidad de crecimiento, tamaño de conidios, y esporulación. Se estimó la termotolerancia del hongo a 15, 25, 30, 35 y 40 °C, de los 18 cultivos monospóricos seleccionados y cepas de referencia. La caracterización genotípica de los aislados de MX se llevó a cabo utilizando el método del polimorfismo del DNA amplificado al azar utilizando 14 oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR). Con los marcadores obtenidos se construyó una matriz de presencia (1) ausencia (0). A partir de esta matriz se construyó un dendrograma por medio del método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA). Se calculó el coeficiente de correlación cofenética. Se estableció la relación de los cultivos monospóricos y cepas de referencia, usando el análisis de componentes principales (ACP) y árbol de tendido mínimo (ATM). En la caracterización fenotípica se obtuvieron de 5 a 12 cultivos monospóricos. Debido a que no se observaron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los cultivos originales y monospóricos obtenidos, la característica de selección del cultivo monospórico fue aquel que mostró la mayor esporulación. La tasa de crecimiento a 25 y 30°C entre los aislados de MX y la cepa de referencia FI 1029 de *M. a. var. anisopliae* mostró un patrón similar, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.01$). En la caracterización genotípica, los 14 oligonucleótidos utilizados amplificaron 339 marcadores en los perfiles moleculares de RAPD-PCR. El dendrograma agrupó a los aislamientos de MX en un grupo separado de los 10 clados taxonómicos del género *Metarhizium* previamente reportados. Los aislamientos de MX se relacionaron con el clado 9 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* representado por la cepa CSIRO FI-1029, de Eritrea. El coeficiente de correlación cofenética alcanzando un valor de $r = 0.94$, demostrando que el dendrograma generado no es producto del azar, sino un fenómeno biológico claro. Los métodos de ordenación (ATM y ACP) nos permitieron un análisis tridimensional de todos los aislamientos donde se corrobora la clasificación del dendrograma y se muestra un mayor agrupamiento entre los aislamientos de MX con el clado 9. El análisis genotípico muestra variabilidad entre los aislamientos de México estudiados.

ABSTRACT

Metarhizium is one of the best known genera of entomopathogenic fungi. Given its relevance as microbial agent of biological control it is necessary to know the pheno- and genotypic characteristics of the species to be used in the field. We studied 18 isolates of *M. anisopliae* from the spittlebug (Homoptera: Cercopidae), from the collection of the Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) in Tecomán, Colima. We used 11 reference strains of the genus *Metarhizium* from the ARSEF (USA) and CSIRO (Australia) collections, which represent the 10 taxonomic groups (clades) of *Metarhizium* proposed by Driver *et al.* (2000). To have genetically homogeneous populations, we chose monospore cultures obtained from an original culture isolated from the insect. Selection was performed considering three phenotypic characteristics: growth rate, size of conidia, and sporulation. Thermotolerance of the fungus was estimated at 15, 25, 30, 35, and 40 °C, in the 18 selected monospore cultures and the reference strains. Genotypic characterization of the MX isolates was achieved by means of randomly amplified DNA polymorphism using 14 arbitrary oligonucleotides (RAPD-PCR). With the obtained markers, a presence (1) absence (0) matrix was constructed and the Jaccard index was calculated, obtaining a paired genetic similarity matrix among isolates. From this matrix a dendrogram was constructed by means of the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). The cophenetic correlation coefficient was calculated. The relation of the monospore cultures and the reference strains was established by means of principal components (PCA) and minimum scanning tree (MST) analyses. Phenotypic characterization yielded 5 to 12 monospore cultures. Because no significant differences ($P > 0.01$) were observed in the three analyzed characteristics between the original and monospore cultures, the selection criterion of the monospore culture corresponded to the one showing the largest sporulation. The growth rates at 25 and 30°C of the MX isolates and the reference CSIRO strain FI 1029 of *M. a. var. anisopliae* depicted a similar pattern; no significant differences ($P > 0.01$) were observed. Regarding genotypic characterization, the 14 oligonucleotides used amplified 339 markers in the RAPD-PCR molecular profiles. The dendrogram grouped the MX isolates in a separate group from the 10 taxonomic clades of the *Metarhizium* genus previously reported. The MX isolates were related with clade 9 of *M. anisopliae var. anisopliae* represented by the reference CSIRO strain FI-1029, from Eritrea. The cophenetic correlation coefficient reached a value of $r = 0.94$, demonstrating that the generated dendrogram is not a random product, but a clear biological phenomenon. The ordination methods (MST and PCA) allows a tridimensional analysis of all the isolates that corroborated the dendrogram's classification, and revealed a better grouping of the MX isolates with clade 9. The genotypic analysis revealed variability among the studied MX isolates.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el hombre se enfrenta ante la necesidad de una gran producción de alimentos para una población en constante crecimiento y por esta razón ha sido necesario implementar métodos que permitan combatir las plagas que afectan cultivos de importancia económica. Sin embargo, el uso indiscriminado de insecticidas sintéticos por muchos años ha provocado gran contaminación ambiental. El control biológico mediante el empleo de hongos entomopatógenos representa una alternativa eficiente ya que plantea la regulación de la plaga por sus enemigos naturales favoreciendo el mantenimiento de procesos importantes en los ecosistemas y la conservación de recursos naturales (Lomer *et al.*, 2001).

Existe una gran diversidad de especies de hongos entomopatógenos, su especificidad puede variar respecto a su hospedero y así una sola especie puede afectar diferentes órdenes de insectos (Samson *et al.*, 1988). Alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenos han sido reportados pero solo diez de ellas han sido desarrolladas para el control de insectos, como: mosquita blanca, áfidos, termitas, saltamontes, langosta y escarabajos entre otros (Butt *et al.*, 2001). Varios productos con base en *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas, *Aschersonia aleyrodis* Webber, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (ahora *M. anisopliae* var. *acridum*), y *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, actualmente son utilizados comercialmente (Ferron *et al.*, 1991; Zimmermann, 1993; Lacey *et al.*, 2001).

Metarhizium anisopliae es un importante entomopatógeno que ha coevolucionado en asociación con insectos en un hábitat dado (Bidochka *et al.*, 2001). Fue identificado por primera vez por Metschnikoff en 1879 al ser aislado del escarabajo *Anisoplia austriaca* y se le denominó *Entomophthora anisopliae* (Zimmermann, 1993). *M. anisopliae* tiene una distribución mundial encontrándose en varios tipos de hábitat desde el ártico hasta los trópicos y es frecuentemente aislado del suelo (Bidochka & Small, 2005). Este hongo se identifica fácilmente pues desarrolla colonias de varios tonos de color verde y

algunas veces en color sepia o isabelino (Figura 1a), forma filioconidios compactos con cadenas largas de conidios, que al adherirse lateralmente forman columnas en empalizada. Los conidios son cilíndricos o elipsoidales (Figura 1b) y miden de 5-7 X 3-4.5 μm (Domsch *et al.*, 1980; Tulloch, 1976).

La clasificación de este género se ha hecho con base en sus caracteres morfológicos principalmente (Tabla 1) y tradicionalmente se han reconocido tres especies: *M. album*, Petch; *M. anisopliae* con dos variedades var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin y var. *majus* Tulloch; *M. flavoviride* con dos variedades: var. *flavoviride* Gams & Rozsypal, 1976; Rombach *et al.*, 1986; Rombach *et al.*, 1987).

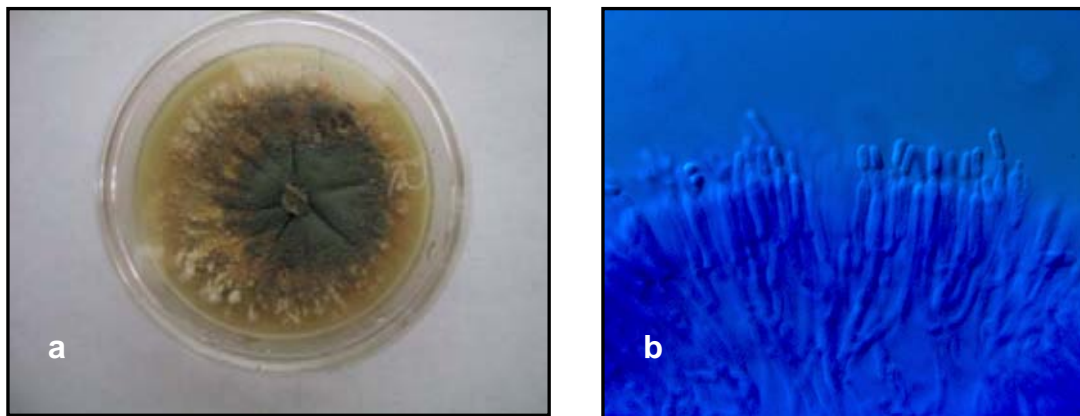


Figura 1. Morfología del hongo *Metarhizium anisopliae*. a: imagen macroscópica de una colonia en agar papa y dextrosa (APD) de 14 días a 28°C; b: conidióforo con conidios en el ápice encontraste diferencial de Nomarski 100X.

Estudios recientes han planteado una clasificación con base en estudios moleculares para este género. Entre ellos destaca el trabajo de Driver *et al.* (2000) quienes al comparar las secuencias de las regiones ITS, 28S y D3 del DNA ribosomal (Tabla1) encontraron una gran diversidad separando el género *Metarhizium* en diez grupos (clados).

TABLA 1. Taxonomía del género *Metarhizium* con base en caracteres morfológicos y moleculares.

Taxones reconocidos morfológicamente*	Taxones reconocidos molecularmente**
<p><i>M. album</i> (Petch)</p> <p><i>M. anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin var. <i>anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin var. <i>majus</i> (Tulloch)</p> <p><i>M. flavoviride</i> (Gams& Roszypal) var. <i>minus</i> (Rombach) var. <i>flavoviride</i> (Gams& Roszypal)</p>	<p>Diez grupos (Clados)</p> <p><i>M. album</i> (1)</p> <p><i>M. flavoviride</i> tipo E (2)</p> <p><i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i> (3)</p> <p><i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i> (4)</p> <p><i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i> (5)</p> <p><i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> (6)</p> <p><i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i> (7)</p> <p><i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> (8)</p> <p><i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (9)</p> <p><i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i> (10)</p>

*Samson *et al.* (1988); Hawksworth *et al.* (1995); Tulloch 1976; Rombach *et al.* 1986; Rombach *et al.* 1987).

**Driver *et al.* (2000).

El mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos es básicamente similar. En general, se inicia una vez que el conidio se adhiere a la cutícula del insecto, donde se forma una estructura denominada apresorio, que emite un tubo germinativo produciendo algunas proteasas, siendo la más activa la PR-1 (Figura 2). Las enzimas degradan la cutícula, el hongo invade el hemocele y se disemina en los tejidos del insecto hasta provocarle la muerte. Al final el hongo emerge a la superficie del insecto, esporula e inicia otra vez el ciclo en otros insectos (St. Leger, 1995; Bidochka *et al.*, 2000).

La relevancia de *Metarhizium* en el control biológico se ha puesto en evidencia por la aplicación de diversas especies para el control microbiano de plagas agrícolas importantes en todo el mundo. En Brasil, desde hace varias décadas se han utilizado diversas formulaciones para el control de la cigarrinha (Homoptera: Cercopidae) en pastos forrajeros y en la caña de azúcar. Esta plaga (*Mahanarva postica* y *M. fimbriolata*) es considerada la plaga más importante en Brasil, donde afecta aproximadamente 800,000 ha de cultivos de

caña de azúcar, causando el 11% de pérdidas de las cosechas (Alves *et al.*, 2002).

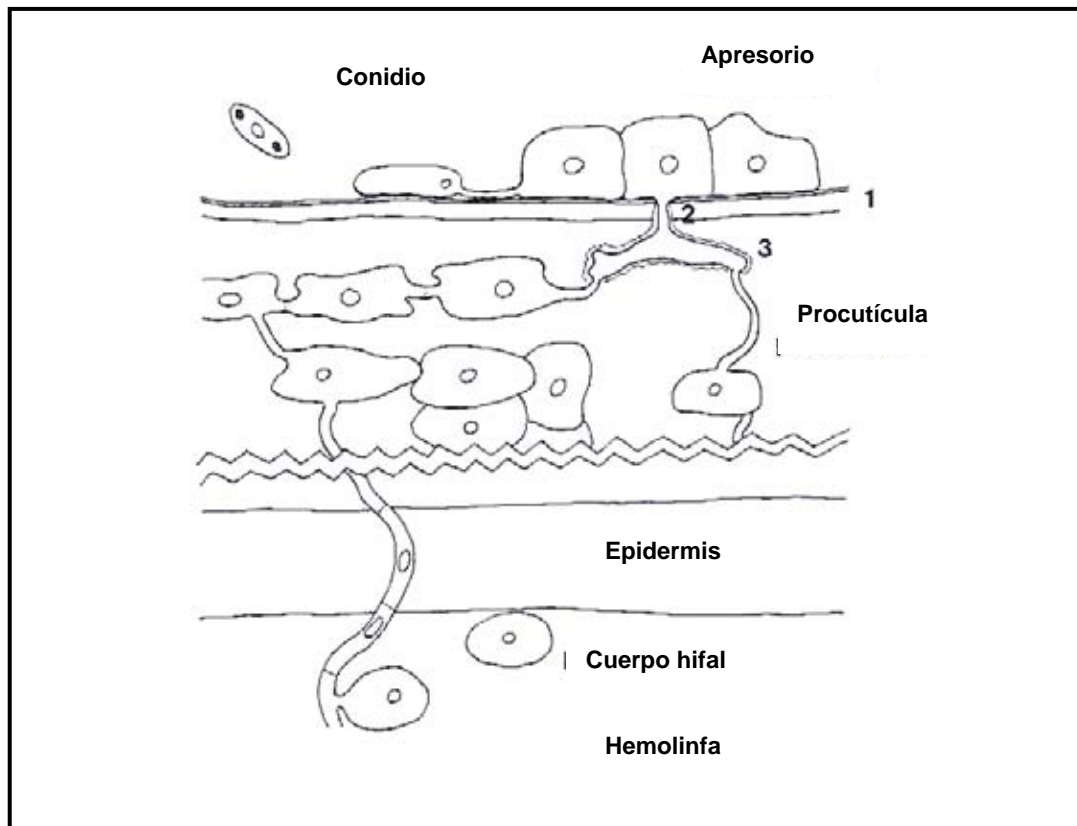


Figura 2. Mecanismo de infección por hongos entomopatógenos. 1: epicutícula; 2: gancho fúngico de penetración; 3: placa de penetración (Tomado de Charley & St. Leger, 1991).

En México, esta plaga es conocida como mosca pinta o salivazo de los pastos, está constituida principalmente por *Aeneolamia albofasciata* Walk y *Prosapia simulans* Walk (Homoptera: Cercopidae) y afecta la productividad de caña de azúcar, pastizales y otras gramíneas.

Su distribución abarca las zonas cañeras y ganaderas del centro del país, áreas litorales del Golfo de México y del Océano Pacífico (Figura 3), principalmente en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Tabasco, Yucatán, Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Nayarit y Sinaloa (Coronado, 1978).

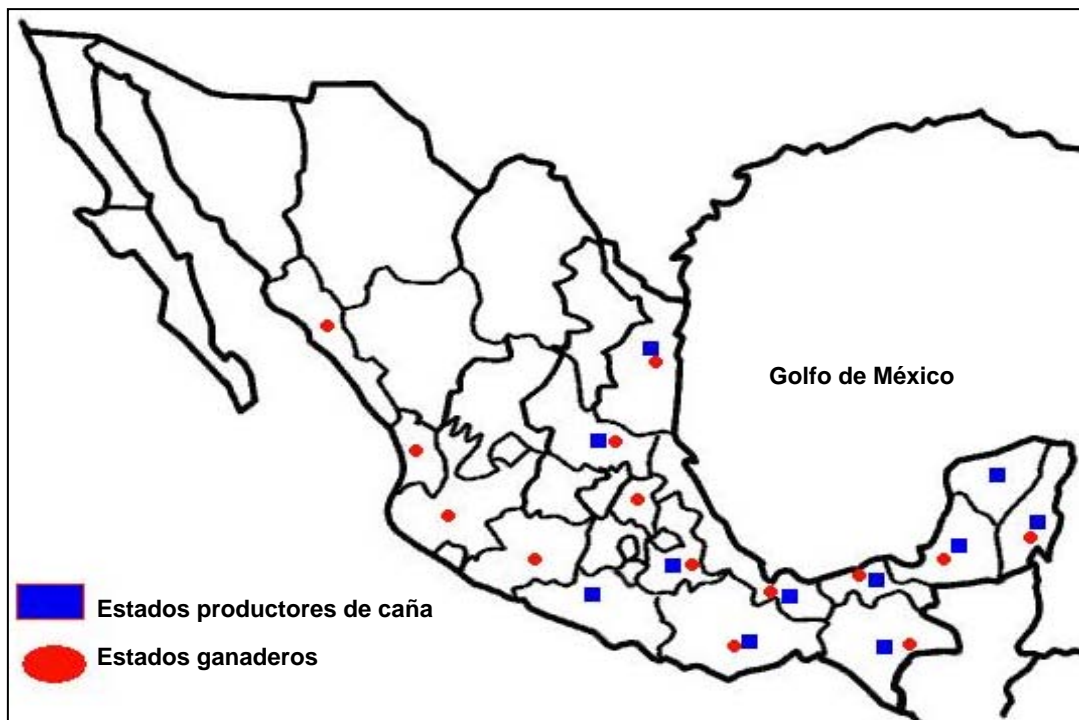


Figura 3. Mapa de México con los estados ganaderos y productores de caña de azúcar afectados por el salivazo de los pastos (Modificado de Coronado, 1978).

El ciclo de vida del insecto consta de tres estadios: huevecillo, ninfa y adulto. La denominación de salivazo de los pastos se refiere al estado ninfal, ya que es cuando los insectos cubren su cuerpo con una secreción blanquecina que tiene consistencia y aspecto de saliva (Flores, 1995). El daño causado por esta plaga varía ya que las ninfas se alimentan de los jugos de la raíz y los tallos. El adulto se alimenta de retoños y hojas, causando fitotoxemia al inocular enzimas aminolíticas y oxidantes lo que provoca la aparición de manchas amarillas disminuyendo su actividad fotosintética (Coronado, 1978; St Leger & Roberts, 1997).

El combate de esta plaga ha sido tradicionalmente a través del uso de insecticidas sintéticos, algunos de ellos prohibidos por la OMS debido a su efecto tóxico en el hombre. Una alternativa para disminuir el uso de estos plaguicidas es la aplicación del control biológico utilizando el hongo *M. anisopliae*. Algunas ventajas que presenta este micoinsecticida es que no requiere ser ingerido pues actúa por contacto, lo que implica baja toxicidad en vertebrados, su inocuidad para el hombre y mamíferos (Toriello *et al.*, 1999;

Toriello *et al.*, 2005) así como la facilidad para su producción y su relativa especificidad (Desphande, 1999).

La efectividad de *M. anisopliae* para el control del salivazo de los pastos, requiere de innumerables estudios multidisciplinarios, así como el desarrollo de técnicas para el monitoreo e identificación de aislados con un alto grado de virulencia que garantice su eficiencia en el campo. La elaboración de un micoinsecticida debe realizarse con cepas autóctonas, de ahí la importancia de hacer estudios fenotípicos y genotípicos de los aislamientos de México. Asimismo, es de absoluta relevancia la genotipificación de éstos, para su monitoreo y en el caso de las casas comerciales para la identificación de cepas particulares (Leal *et al.*, 1994).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El daño a la salud del hombre y la elevada contaminación de la flora, fauna y ambiente por los insecticidas sintéticos ha planteado la necesidad de buscar alternativas para la protección de los cultivos contra el ataque de insectos nocivos que causan grandes pérdidas a la agricultura. *M. anisopliae* var. *anisopliae* es un hongo que permite controlar la plaga de la mosca pinta o salivazo de los pastos. Con el propósito de aplicar en México este bioinsecticida es necesario caracterizar fenotípicamente y genotípicamente los aislamientos de este hongo recolectados en México, para poder seleccionar los más adecuados de esta región para la elaboración de un micoinsecticida eficiente contra esta plaga.

2. ANTECEDENTES

Las estrategias clásicas para la identificación de hongos entomopatógenos con base en características morfológicas y fisiológicas. Los métodos bioquímicos como los patrones de isoenzimas han sido de gran utilidad y se han aplicado para estudiar la variabilidad inter e intraespecífica de hongos como *N. rileyi* y *B. bassiana*. Sin embargo, pequeñas diferencias a nivel de DNA pueden causar cambios en la estructura de las enzimas dando como resultado bajos niveles de polimorfismo (Joslyn & Boucias, 1981).

También se han combinado análisis bioquímicos con caracteres morfológicos. Por ejemplo, St Leger *et al.* (1992) realizaron estudios con isoenzimas de aislamientos de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. y encontraron gran variabilidad genética identificando cinco especies crípticas dentro del género *Metarhizium*. Riba *et al.* (1986) compararon cepas a través del tamaño de sus conidios, virulencia y perfil enzimático, demostrando una gran variabilidad genética y una homogeneidad relativa en aislamientos de *M. anisopliae* var. *majus* aislado de *Oryctes* sp. (Coleoptera: Dynastidae). Yip *et al.* (1992) y Rath *et al.* (1995) caracterizaron aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *frigidum* de suelos de pastos en Tasmania, combinando germinación y crecimiento a dos temperaturas, utilización de carbohidratos, color de la colonia y tamaño de los conidios con la virulencia en el escarabajo *Adoryphorus couloni* (Coleoptera: Scarabaeidae) encontrando algunas cepas de este hongo podrían ser agrupadas como biocontroladores importantes.

Uno de los principales obstáculos para la aplicación de un hongo entomopatógeno como agente de control biológico es la poca información sobre su caracterización genotípica. En los últimos años se han desarrollado técnicas con marcadores moleculares específicos para el estudio de la variación genética, determinación del origen y estructura de poblaciones, mapeo genético, determinación de patrones biogeográficos, reconstrucción de filogenias e identificación de microorganismos de interés (Otero *et al.*, 1997).

Entre las técnicas moleculares que se han utilizado para estos fines están: el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphisms: RFLPs), amplificación al azar del polimorfismo del DNA (random amplified polymorphic DNA: RAPD), polimorfismo de la

longitud de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism: AFLP), el análisis de las regiones ITS, 28S y D3 del rDNA. De éstas técnicas el RAPD-PCR es una herramienta muy útil para identificar y detectar el DNA de interés ya que emplea oligonucleótidos cortos que se alinean a secuencias múltiples. El método ofrece varias ventajas: se pueden utilizar un conjunto de primers al azar para el análisis genómico de una amplia variedad de especies; no requiere técnicas preliminares como obtención de sondas, membranas de hibridación ó secuenciación nucleotídica; y cada marcador RAPD es el equivalente de un sitio de unión del primer a la secuencia de DNA (Williams *et al.*, 1990).

El RAPD-PCR se ha utilizado para estudiar variación genética en hongos entomopatógenos. Entre los hongos entomopatógenos, Obornik *et al.* (2000) llevaron a cabo un análisis de la variabilidad genética y las relaciones filogenéticas entre aislamientos de *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *V. lecanii* y *Aschersonia* sp. con base en el uso de RAPD-PCR, en el que concluyen que el análisis es útil para la reconstrucción de relaciones inter e intraespecíficas de estos hongos. Estudios previos realizados por Tirano-Milani *et al.* (1995) permiten considerar esta técnica como una poderosa herramienta para mejorar la taxonomía del género *Paecilomyces*.

Tigano & Aljanabi (2000) a partir de análisis de RAPD encontraron una gran variabilidad genética entre 28 aislamientos de *N. rileyi*, encontrando este método como una herramienta útil de investigación en la dinámica de poblaciones.

Aislamientos del género *Metarhizium* se han caracterizado también mediante el uso de RAPD-PCR. Cobb & Clarkson en 1993, fueron los primeros en utilizar esta técnica para determinar el polimorfismo de ADN entre aislamientos del patógeno *M. anisopliae* y *M. flavoviridae* a través de RAPD-PCR obteniendo fragmentos polimórficos entre 0.3 y 2.7 Kb mediante el uso de 10 oligonucleótidos. Cada aislamiento fue diferente en cuanto al tamaño y número de productos de RAPD indicando un polimorfismo considerable. Calculando la relativa similitud genética se diferenciaron los aislados en dos grupos principales separando en el primer grupo la mayoría de los 10 aislados de *M. anisopliae* y de *M. flavoviride*. Sin embargo, un aislamiento de *M.*

anisopliae de Australia presentó un alto grado de similitud al grupo de *M. flavoviride*. Los aislados de *M. anisopliae* fueron agrupados en 3 subgrupos que no estuvieron relacionados a su origen geográfico y aunque se observó un gran polimorfismo, tampoco se encontró una aparente asociación entre el genotipo y su hospedero original. Fegan *et al.* (1993), encontraron también un alto grado de diversidad genética en aislamientos de *M. anisopliae* obtenidos de insectos en cultivos de caña de azúcar, sugiriendo que el RAPD-PCR puede ser útil para proporcionar una “huella digital” del hongo, ya que presenta persistencia del genotipo en regiones específicas.

Posteriormente, Rakaotonirany *et al.* (1994) analizaron la relación filogenética entre aislamientos del género *Metarhizium* a través de la secuencia de la región 28S rRNA e isoenzimas. El análisis filogenético mostró la separación entre *M. flavoviride*, *M. anisopliae* y *M. anisopliae* var. *majus*. Esto fue confirmado a través de análisis isoenzimático. Bidochka *et al.* (1994), diferenciaron por RAPD-PCR aislamientos de *M. flavoviride* que presentaban características morfológicas intermedias de *M. anisopliae* y *M. flavoviride*. Mavridou & Typas (1998) realizaron estudios del polimorfismo de *M. anisopliae* var. *anisopliae* usando análisis de RFLP de rADN y mtADNA, logrando clasificar 25 aislamientos en 20 diferentes grupos genéticos.

Driver *et al.* (2000) analizaron 123 aislamientos de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* y *M. album* a través de patrones de RAPD-PCR y secuencias de las regiones ITS y 28S rDNA D3. Estos revelaron un alto grado de diversidad reclasificando estos aislamientos en diez clados distintos descritos en la tabla 1. Dentro del mismo estudio realizaron ensayos de termotolerancia de algunas cepas representativas de cada clado. Los resultados mostraron relación entre la región geográfica de la cepa y su tolerancia a temperaturas asociadas a la región. Estas observaciones concuerdan con resultados obtenidos por Bidochka *et al.* (2001) quienes realizaron análisis de genética de poblaciones de 83 aislamientos de *M. anisopliae*, de una área forestal y agrícola de Ontario, Canadá, separándolos en dos grupos, los cuales fueron asociados al diferente tipo de hábitat no así al grupo de hospedero. El grupo de áreas forestales mostró una capacidad para crecer a temperaturas bajas (8 °C), mientras que el grupo del área agrícola presentó un buen crecimiento a altas temperaturas (35

°C) así como resistencia a la exposición a rayos UV. Los dos grupos mostraron una estructura poblacional recombinante y clonal. La estructura de población de este hongo así como su asociación con su hábitat tiene gran relevancia para su uso como agente de control biológico.

Por otro lado, el uso de marcadores moleculares es de gran utilidad para identificar fácilmente las cepas liberadas en campo y poder monitorearlas. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar genotípicamente aislamientos de México de la mosca pinta (*Aeneolamia* sp.), así como determinar la temperatura óptima de crecimiento con la finalidad de que los aislamientos seleccionados como agentes microbianos para el control biológico de este insecto en México, estén debidamente caracterizados y puedan ser utilizados en las zonas del país donde se necesiten.

4. HIPÓTESIS

El polimorfismo del DNA de los aislamientos fúngicos de México encontrados a través del método de RAPD-PCR, así como su termotolerancia, es diferente de los aislamientos del mismo hongo que habita otras regiones geográficas.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente y genotípicamente aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* recolectados de insectos en México.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener cultivos monospóricos de 18 aislamientos de *M. anisopliae* aislados de insectos en México de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Nacional Biological Control Reference Center-Ministry of Agriculture: CNRCB-SAGAR) de Colima.
- Seleccionar y conservar cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* con base en la velocidad de crecimiento, esporulación y tamaño de conidios.
- Caracterizar fenotípicamente los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* estudiados por medio de la termotolerancia (crecimiento a diferentes temperaturas).
- Obtener DNA de todos los aislamientos del hongo de México y cepas de referencia de otros países de las colecciones de la Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, EEUU (ARSEF) y Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia (CSIRO), correspondientes a los diez clados propuestos por Driver *et al.*, (2000).
- Caracterizar genotípicamente los aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, por medio de la amplificación al azar del polimorfismo del DNA, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR).
- Analizar y comparar el polimorfismo del DNA de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* de México y de las cepas de referencia.

- Analizar y comparar la termotolerancia de los aislamientos de México y de las cepas de referencia.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Material fúngico

Se utilizaron 18 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* colectados de la mosca pinta (*Aeneolamia* spp.) en México, de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, de Colima y 11 cepas de referencia representativas de los 10 clados descritos por Driver *et al.* (2000). Las características de los hongos pueden observarse en las Tablas 2 y 3. Cada aislamiento obtenido directamente del insecto se conservó en agua destilada, aceite mineral y nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para los diferentes ensayos se sembraron en medio APD (infusión de papa blanca 30 %, dextrosa 2 %, agar 1.5 %) y agar de Sabouraud (SAB) (Bioxón de México) y se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.2. Obtención de cultivos monospóricos

El trabajo se llevó a cabo a partir de cultivos monospóricos de los aislamientos obtenidos del insecto, de acuerdo al método modificado de Goettel & Inglis (1997). Se colocaron 2.5 mL de agar (Bioxón) al 1.5 % en un portaobjetos estéril. Se ajustó una suspensión de *M. anisopliae* a 1×10^4 conidios/mL en Tween 80 al 0.5 % con la cámara de Neubauer. Se colocaron y plaquearon 10 μL de esta suspensión sobre el portaobjetos con agar. Con el objetivo de 10 X se localizó un conidio y con el objetivo de 40 X se verificó que se encontrara un solo conidio en dicho campo. Se colocó el conidio exactamente al centro del campo. Se cerró el diafragma hasta que solamente se observó un pequeño haz de luz sobre la región donde estaba localizado el conidio (área de 2 mm^2 aprox.). Se practicaron pequeños cortes con un bisturí de manera que se formó un cuadrado en torno a la circunferencia del haz de luz. Se volvió a verificar que el área delimitada tuviera solamente un conidio, todo bajo condiciones de esterilidad. Se tomó la fracción de agar que contenía el conidio y se colocó en una caja de Petri con APD, y se incubó a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se revisó el cultivo diariamente para constatar la aparición de una sola colonia a partir del conidio seleccionado (Figura 4). Los aislamientos monospóricos obtenidos se conservaron en agua destilada estéril, aceite mineral y nitrógeno líquido a -196°C .

Tabla 2. Datos de *Metarhizium anisopliae* aislados de la mosca pinta (*Aeneolamia* spp.) en cultivos de caña de azúcar de México.

Clave UNAM¹	Clave CNRCB²	Origen MX
EH-465	MaZC1A	Veracruz
EH-466	MaZC2N	Veracruz
EH-467	MaZC3A	Veracruz
EH-468	MaGBA	Veracruz
EH-469	MaGB3A	Veracruz
EH-470	MaGB4	Veracruz
EH-471	MaNL18	S.L. Potosí
EH-472	MaNP1	S.L. Potosí
EH-473	MaNL1	S.L. Potosí
EH-474	MaNL2	S.L. Potosí
EH-475	MaNM1	S.L. Potosí
EH-476	MaNM2	S.L. Potosí
EH-477	MaOPS1	Oaxaca
EH-478	MaOPS2	Oaxaca
EH-479	MaMV	Veracruz
EH-480	MaZP	Veracruz
EH-481	MaBA	Veracruz
EH-482	MaPA1	Tuxtepec, Oaxaca

¹ UNAM = Universidad Nacional Autónoma de México

² CNRCB = Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

³ MX = México

Tabla 3. Características de las especies tipo de *Metarhizium*.

Clave ARSEF* CSIRO**	Hospedero	Origen	Nombre	Nombre Actual***	Clado***
1941*	<i>Nephotettix virescens</i> (Homoptera)	Filipinas	-----	<i>M. album</i>	1
2948*	Homoptera	Brasil	<i>M. f.</i> ¹ var. <i>minus</i>	<i>M. flavoviride</i> Tipo E	2
FI-698**	Lepidoptera	Nueva Zelanda	<i>M. a.</i> ² var. <i>anisopliae</i>	<i>M. f.</i> var. <i>novazealandicum</i>	3
FI-72**	<i>Pemphigus treherni</i> (Homoptera)	Inglaterra	<i>M. a.</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>M. f.</i> var. <i>pemphigum</i>	4
2037*	<i>Niliparvata lugens</i> (Homoptera)	Filipinas	-----	<i>M. f.</i> var. <i>minus</i>	5
1184*	<i>Otiorhynchus sulcatus</i> (Coleoptera)	Francia	-----	<i>M. f.</i> var. <i>flavoviride</i>	6
FI-985**	<i>Austracis guttulosa</i> (Orthoptera)	Australia	<i>M. a.</i> ² var. <i>anisopliae</i>	<i>M. a.</i> ² var. <i>acridum</i>	7
FI-987**	<i>Ornithacris cavroisi</i> (Orthoptera)	Nigeria	<i>M. f.</i> var. <i>minus</i>	<i>M. a.</i> var. <i>acridum</i>	7
FI-147**	<i>Lepidiota consobrina</i> (Coleoptera)	Australia	<i>M. a.</i>	<i>M. a.</i> var. <i>lepidiotum</i>	8
FI-1029**	<i>Schistocerca gregaria</i> (Orthoptera)	Eritrea	-----	<i>M. a.</i> var. <i>anisopliae</i>	9
1914*	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	Filipinas	-----	<i>M. a.</i> var. <i>majus</i>	10

*ARSEF = Agricultural Research Service of Entomopathogenic fungi, EEUU.

** CSIRO = Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia.

*** Nombre y clados de *Metarhizium* caracterizados genó y fenotípicamente por Driver *et al.* (2000).

¹ *M. f.* = *Metarhizium flavoviride*, ² *M. a.* = *Metarhizium anisopliae*

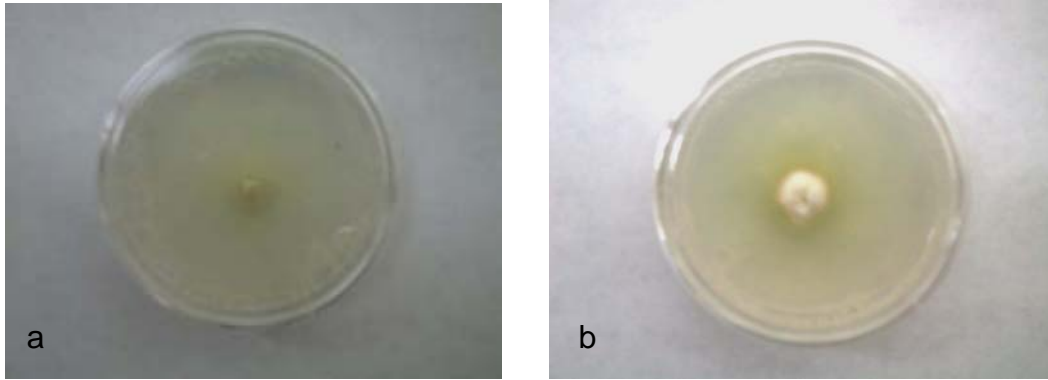


Figura. 4. Obtención de cultivos monospóricos. a) bloque de agar con cultivo obtenido de un solo conidio. b) cultivo monospórico de 72 horas aproximadamente.

7.3. Comparación y selección de cultivos originales y monospóricos

Para seleccionar, el cultivo monospórico para ser utilizado en las pruebas posteriores, de caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos se tomaron en consideración los siguientes criterios:

a) Crecimiento radial

El cultivo original y los monospóricos obtenidos se sembraron en placas con APD. En el centro de la caja de Petri de 100 mm de diámetro se hizo un pozo de 0.6 cm de diámetro y se le agregó 100 μL de una suspensión de 1×10^6 conidios/mL de cada cultivo. Las cajas se incubaron a 28 $^{\circ}\text{C}$, cada tercer día se registró el crecimiento de la colonia en cm (en dos planos perpendiculares para sacar el promedio) hasta que la colonia alcanzó el borde de la caja a los 17 días.

b) Esporulación

Al final del crecimiento radial de los cultivos (17 días) se agregaron 10 mL de Tween 80 al 0.5 % estéril en la superficie de la placa y con ayuda de un asa se raspó para extraer el total de conidios. De esta forma se obtuvo una suspensión de conidios que fue cuantificada en la cámara de Neubauer.

c) Tamaño de Conidios

A los 10 días de cultivo en APD se tomó una muestra del cultivo original y de cada cultivo monospórico obtenido. Se midieron diez conidios, registrando la longitud y anchura en μm , con ayuda de un ocular calibrado en un microscopio óptico Olympus CH-2.

d) Análisis estadístico

Para seleccionar el cultivo monospórico de cada aislamiento, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a los datos que se obtienen de cada característica, para observar significancias entre los cultivos originales y los monospóricos obtenidos.

e) Selección de cultivos monospóricos

Para seleccionar el cultivo monospórico se compararon los resultados de las pruebas arriba mencionadas entre los aislamientos y sus monospóricos. Como en ninguna de las pruebas se encontró diferencia significativa, el criterio que se tomó para la selección fue del cultivo monospórico que presentó mayor número de conidios/mL, debido a que esta estructura es el ingrediente activo de un micoinsecticida.

7.4. Mantenimiento y conservación de cultivos originales y monospóricos seleccionados

a) Conservación en agua destilada estéril

Se sembraron los hongos en cajas de Petri con APD, una vez que se obtuvo suficiente crecimiento se cortaron tres fragmentos redondos de 5 mm de diámetro y se colocaron en frascos de vidrio de 5 mL con agua destilada estéril. Se taparon, engargolaron, etiquetaron y guardaron a 4°C para su conservación.

b) Conservación en nitrógeno líquido

A partir de cultivos frescos de cada hongo se hizo una suspensión de conidios con glicerina al 10 % y se colocó en criotubos de 2 mL. Se dejaron a 4°C por 2 horas, luego se colocaron durante 12 horas a 0°C para luego almacenarlos a -196 °C, previa identificación específica.

c) Conservación en aceite mineral

Se sembraron los cultivos en tubos de plástico de 5 mL con tapón de rosca y con 2.5 mL de APD y se incubaron a 28 °C. Una vez que alcanzaron un buen

crecimiento se agregó aceite mineral estéril de modo que cubriera por completo el APD. Se almacenaron a 4 °C.

7.5. Caracterización fenotípica de los aislamientos a estudiar por medio de la termotolerancia

a) Termotolerancia

Para determinar la tolerancia de los aislamientos a diferentes temperaturas, se sembraron los aislamientos del hongo en Agar de Sabouraud-dextrosa adicionado de extracto de levadura (peptona de soya al 1 %, glucosa al 4 %, extracto de levadura al 1 % y agar al 1 %) (SDYA) durante 7 días a 28 °C. A partir de estos cultivos se realizó una suspensión de 1×10^8 conidios/mL. En el centro de una caja con medio SDYA se colocó un círculo de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro y se impregnó con 2 µL de la suspensión conidial (2×10^5 conidios). Se incubaron 5 cajas para cada temperatura a evaluar (10, 25, 30, 35 y 40 °C). Se midió el crecimiento (diámetros perpendiculares de la colonia) durante 14 días. De esta forma se pudo determinar la temperatura óptima de crecimiento de cada. Se calculó la tasa de crecimiento mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{\text{Diámetro final} - \text{Diámetro inicial}}{\text{Días totales del ensayo}}$$

b) Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0.05$) para detectar diferencias significativas entre aislamientos y entre temperaturas. Cuando se encontraron significancias se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey.

7.6. Caracterización genotípica de los cultivos originales y monospóricos

a) Extracción de DNA

Se obtuvo DNA de los aislamientos originales, de las once cepas de referencia y de los monospóricos seleccionados de *M. anisopliae*. Debido a que en trabajos previos con otros entomopatógenos no se encontraron diferencias entre cultivos polispóricos y monospóricos en la prueba de RAPD-PCR

(Toriello y Reyes-Montes, com. pers.), solamente se trabajó con los cultivos monospóricos. La masa micelial se obtuvo de cultivos en medio líquido de SDYA incubados a 28 °C durante 10 días en agitación a 150 rpm. Posteriormente, se separó el micelio por filtración con un embudo Büchner con papel Whatman No. 1 y se lavó con agua destilada estéril. El micelio se colocó en papel filtro estéril, se secó y se pasó a un mortero al cual se le agregó nitrógeno líquido para macerar la masa micelial hasta obtener un polvo fino. Este material se colocó en un tubo Eppendorf estéril, se agregaron 600 µL de buffer de lisis (Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 3 %, mercaptoetanol 1 %), agitando firmemente el tubo hasta obtener una mezcla homogénea y se centrifugó a 20 000 X g durante 5 minutos. El sobrenadante se separó, se le añadió proteinasa K (Dako, US) (200 µg/mL concentración final), y se agitó firmemente. Se incubó la muestra a 55 °C por 1.5 h. Se agregó RNAsa (Qiagen, Alemania) (500 µg/mL) incubando a 37 °C por 2 h. Luego se agregó 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Invitrogen) y se agitó firmemente hasta obtener una muestra con un aspecto lechoso. Se centrifugó a 20 000 X g, por 15 min y se separó la capa más superficial del sobrenadante para transferirla a un tubo Eppendorf nuevo. Se agregó proteinasa K y se incubó a 55 °C, por 30 min. Se repitió el tratamiento de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se obtuvo de nuevo el sobrenadante. Para iniciar la precipitación se añadió 10 µL de una solución de acetato de sodio al 3 %. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto (JB Baker) conservado a -20°C el tubo se invirtió varias veces hasta visualizar la precipitación del DNA. Se almacenó a – 20 °C hasta el día siguiente. Posteriormente, la muestra se centrifugó por 2 min a 20 000 X g para obtener el precipitado en el fondo del tubo. Se decantó el etanol y se lavó dos veces con etanol al 70 % sin perturbar la pastilla y se centrifugó 2 min a 20 000 X g. Se decantó el alcohol y se secó el DNA invirtiendo el tubo por 10 min. El DNA obtenido fue resuspendido en agua Milli-Q estéril, y se almacenó a –20 °C hasta su uso.

b) Cuantificación del DNA por electroforesis

El DNA extraído se cuantificó por electroforesis en gel de agarosa (al 0.8 % con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio), en amortiguador TBE 0.5 X (1.34 M tris base, 0.45 M ácido bórico y 0.025 M de EDTA). En los primeros carriles del gel se colocaron cinco concentraciones (10, 20, 50, 100, y 200 ng) del fago

lambda (Gibco BRL, US) y en los siguientes carriles se colocó una mezcla de 2 μ L de DNA de cada aislamiento y 2 μ L de amortiguador de muestra concentrado (0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xicolcianol, 25 % Ficol 400). El corrimiento electroforético se realizó a 100 V para observar el DNA usando un transiluminador de luz ultravioleta T1202 (Sigma). La imagen de los geles se capturó con un foto documentador Synoptics (Syngene Cambridge) y se imprimió en una impresora térmica Sony 650 (Tokio). La cuantificación del DNA se realizó por comparación de las muestras con la curva obtenida de diferentes concentraciones (10, 20, 50, 100 ng) del fago lambda (Gibco BRL).

c) Obtención del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)

Se utilizaron 14 oligonucleótidos arbitrarios (Tabla 4) propuestos por Cobb & Clarkson (1993) y Driver *et al.* (2000). Se analizaron todos los DNAs de las cepas de referencia, así como del monospórico seleccionado de los aislamientos del hongo *M. anisopliae*. Para la estandarización del método se probaron los programas de amplificación descritos por Cobb & Clarkson (1993) y Driver *et al.* (2000) (Tabla 5).

Las reacciones de RAPD-PCR se llevaron a cabo en tubos para PCR de 250 μ L en un volumen final de reacción de 25 μ L. La mezcla de reacción estuvo formada por amortiguador de PCR (1 X), 2.5 mM de $MgCl_2$ (Rocher), 2 mM de la mezcla de deoxinucleótido trifosfato: dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Gibco), 0.2 mM de cada oligonucleótido (Operon), 10 ng de DNA, 1 U de Taq polimerasa recombinante (Rocher, Francia) y se ajustó el volumen con agua Milli Q estéril (Driver *et al.*, 2000).

La amplificación del DNA se hizo en un termociclador Cyclyer (Bio Rad, Hercules, CA). Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5 X y se tiñeron con bromuro de etidio a 10 μ g/mL, se utilizó como referencia una escalera de peso molecular de 123 bp (Gibco). La imagen de los geles se capturó con un foto documentador Synoptics (Syngene) y se imprimió en una impresora térmica Sony 650 (Tokio).

d) Análisis estadístico

Los productos de amplificación de los aislamientos y de las cepas de referencia se analizaron mediante la construcción de una matriz de presencia/ausencia de bandas. Se calculó el grado de similitud de acuerdo al coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908, Real & Vargas, 1996) y con ella se elaboró un fenograma por medio del programa UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average).

Para medir la veracidad del resultado del fenograma con la matriz de similitud original, se calculó el coeficiente cofenético de correlación (Sneath & Sokal, 1973). Se estableció multidimensionalmente la relación de los cultivos monospóricos y cepas de referencia usando el análisis de componentes principales y árbol de tendido mínimo. Los análisis mencionados se llevaron a cabo con el programa NTSYS-PC (Numerical taxonomy and multivariate analysis system) ver. 2.0 (Rohlf, 1993).

Tabla 4. Iniciadores y secuencias utilizadas en la técnica de RAPD-PCR.

INICIADOR	SECUENCIA
H01*	5'-GGTCGGAGAA-3'
H02*	5'-TCGGACGTGA-3'
F06*	5'-GGGAATTCGG-3'
F07*	5'-CCGATATCCC-3'
F08*	5'-GGGATATCGG-3'
F10*	5'-GGAAGCTTGG-3'
OPA01**	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA04**	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA05**	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA08**	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA09**	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA10**	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA16**	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA19**	5'-CAAACGTCGG-3'

* Driver et al., 2000.

** Cobb & Clarkson, 1993.

Tabla 5. Programas de amplificación utilizados en la técnica de RAPD-PCR.

Driver et al. (2000)	Cobb & Clarkson (1993)*
Activación de la Taq polimerasa	Activación de la Taq polimerasa
94°C 5 min	94°C 5 min
Primer ciclo	Primer ciclo
94°C 5 min	94°C 5 min
40°C 2 min	32°C 2 min
72°C 3 min	72°C 2 min
39 ciclos	45 ciclos
94°C 1 min	94°C 1 min
40°C 90 seg	35°C 1min
72°C 2 min	72°C 2 min

*Programa utilizado en este trabajo

8. RESULTADOS

8.1. Obtención de cultivos monospóricos

Se obtuvieron entre 5 y 15 cultivos monospóricos de los aislamientos de *M. anisopliae* como se muestra en la tabla 6. En la figura 5 se muestra la comparación de una colonia original del aislamiento EH-465 y seis de los cultivos monospóricos obtenidos a partir de ella.

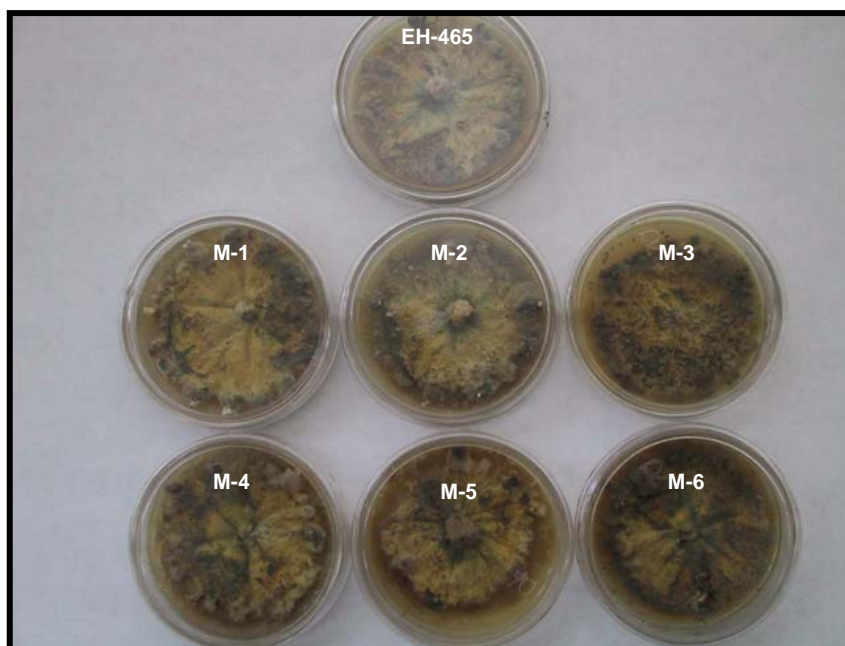


Figura 5. Comparación entre cultivo original EH-465 y los seis monospóricos obtenidos (M-1 a M-6) de los aislamientos del hongo *M. anisopliae*.

8.2. Caracterización fenotípica de cultivos originales y monospóricos para su selección

a) Crecimiento radial

En la figura 6 se muestra un ejemplo de la curva de crecimiento del cultivo original EH-466 y los nueve monospóricos obtenidos (Figura 6). Las tasas de crecimiento calculadas como está descrito en material y métodos se muestran en la tabla 6. La tasa de crecimiento entre todos los aislamientos varió de 0.325 a 0.573 cm/día y no se observó diferencia significativa entre ellos (Anexo 1).

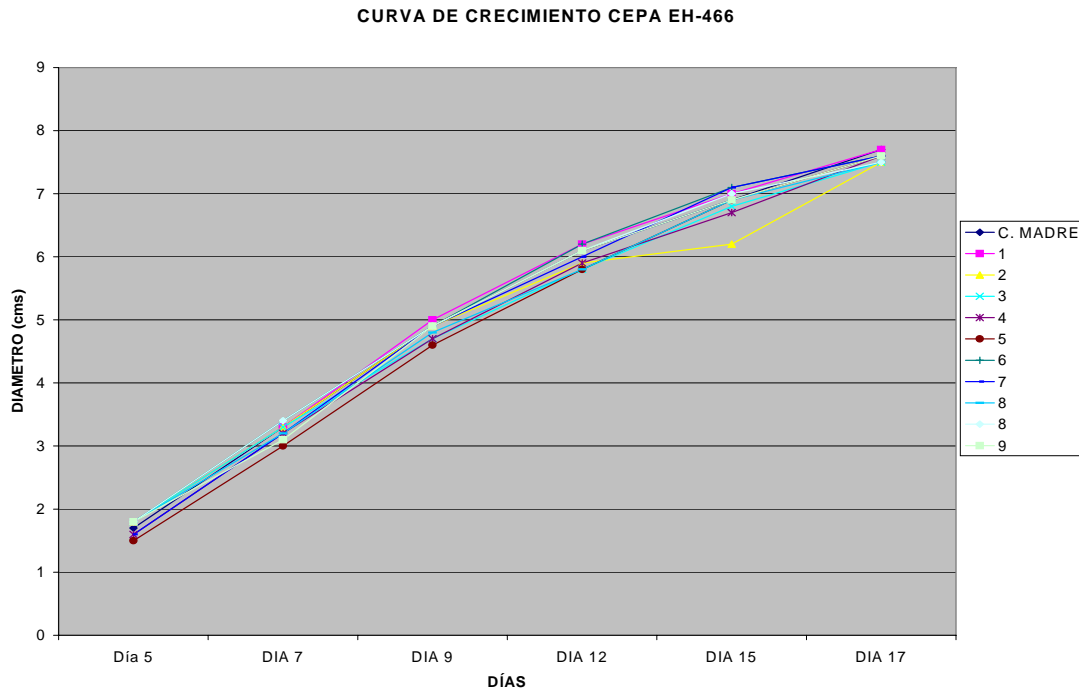


Figura 6. Curva de crecimiento del aislamiento EH-466 original y los nueve cultivos monospóricos obtenidos del hongo *M. anisopliae*.

b) Esporulación

La producción de conidios después de 17 días de incubación no mostró diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los cultivos monospóricos obtenidos y el original de los 18 aislamientos estudiados. En la figura 7 se muestra un ejemplo de los conidios/ml de cada cultivo monospórico en comparación con el cultivo original.

c) Tamaño de conidios

Las medidas de los conidios (largo y ancho) después de 10 días de incubación no mostraron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los cultivos monospóricos y el original de cada aislamiento. El largo de los conidios de todos los aislamientos y monospóricos varió de $7.4 \mu\text{m}$ a $8.47 \mu\text{m}$, mientras que el ancho fue de $2.54 \mu\text{m}$ para todos (Tabla 6).

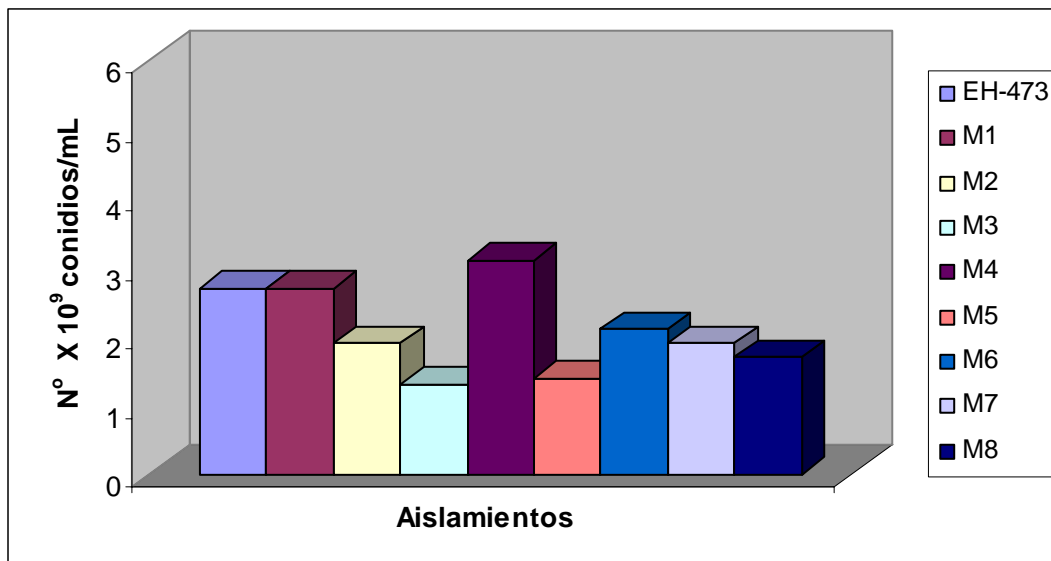


Figura 7. Número de conidios/ml del aislamiento EH-473/4 original y ocho cultivos monospóricos

d) Selección de cultivos monospóricos

Para seleccionar el cultivo monospórico se compararon los resultados del análisis de varianza para cada prueba entre los aislamientos y sus monospóricos obtenidos. En ninguna de las pruebas se encontraron diferencias significativas por lo que el criterio que se tomó para su selección fue el cultivo monospórico que presentó mayor número de conidios/ml. Los monospóricos seleccionados aparecen en la tabla 6. Toda la caracterización genotípica posterior se llevó a cabo con el cultivo monospórico seleccionado, asignándole a cada aislamiento el número del monospórico, por ejemplo EH-473/4.

Los resultados de las tres pruebas y el análisis estadístico de cada aislamiento y los monospóricos obtenidos se incluyeron en el anexo 1.

Tabla 6. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* estudiados, número de cultivos monospóricos obtenidos, tasa de crecimiento, producción de conidios y largo de conidios.

Aislamiento	Monospóricos obtenidos	Tasa de crecimiento (cm/d)	Producción de conidios/ml*	Largo de conidios* (µm)	Monospórico seleccionado
EH-465	10	0.540	1.98 X 10 ⁹	7.692	8
EH-466	13	0.557	1.79 X 10 ⁹	7.692	2
EH-467	12	0.556	3.43 X 10 ⁸	7.353	6
EH-468	15	0.521	3.63 X 10 ⁹	7.371	1
EH-469	10	0.442	1.65 X 10 ⁹	7.692	7
EH-470	9	0.383	4.69 X 10 ⁸	7.947	6
EH-471	13	0.371	1.30 X 10 ⁶	7.692	3
EH-472	9	0.321	4.47 X 10 ⁷	7.691	6
EH-473	8	0.423	3.08 X 10 ⁸	7.435	4
EH-474	8	0.413	9.63 X 10 ⁵	7.692	6
EH-475	5	0.407	2.04 X 10 ⁷	7.692	2
EH-476	7	0.328	1.64 X 10 ⁵	7.692	3
EH-477	10	0.515	1.93X 10 ⁹	7.692	5
EH-478	8	0.456	3.96 X 10 ⁸	7.4	1
EH-479	10	0.509	4.20 X 10 ⁶	7.57	2
EH-480	10	0.506	5.62 X 10 ⁶	7.692	8
EH-481	5	0.557	4.33 X 10 ⁷	7.692	1
EH-482	14	0.552	2.53 X 10 ⁷	7.349	8

*Los datos muestran el promedio de cada parámetro entre el cultivo original y los monospóricos obtenidos.

8.3. Termotolerancia de aislados originales y cepas de referencia

Los resultados de crecimiento a diferentes temperaturas (°C) en cm diámetro conidial a los 14 días de los cultivos originales, y especies tipo se muestran en la tabla 7. Las tasas de crecimiento para cada temperatura se muestran en el anexo 2.

Los cultivos originales que mostraron mayor crecimiento a 15°C fueron EH-465, EH-466, EH-467 y EH 468, presentando una tasa de crecimiento de 0.134, 0.139, 0.132, y 0.137 y cm/día respectivamente (Anexo 2) y los de menor crecimiento fueron EH-472 y EH-481 que no tuvieron crecimiento al término del ensayo. El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los cultivos estudiados. La comparación de medias múltiple (Tukey) ordenó a los 18 aislamientos en 8 grupos diferentes (Tabla 7).

A esta temperatura la especie tipo que tuvo mayor desarrollo tuvo fue CSIROFI-1029, con una tasa de crecimiento $0.157 \text{ cm/día} \pm 0.009$ y la de menor crecimiento fue ARSEF1941 con 0.007 cm/día de tasa de crecimiento (Anexo 2). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre las cepas, y la prueba de Tukey ordenó a las once especies tipo en 6 grupos.

En la misma tabla 7 se muestra el crecimiento de los aislamientos a 25 °C, mostrando el mayor crecimiento EH-465, presentando una tasa de crecimiento de $0.047 \pm 0.005 \text{ cm/día}$ y el menor crecimiento EH-472 con una tasa de crecimiento de $0.264, \pm 0.019 \text{ cm/día}$ (Anexo 2). El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($P < 0.01$) en el crecimiento entre los aislamientos a 25 °C y la prueba de Tukey mostró 7 grupos diferentes. Con respecto a las especies tipo a esta temperatura la que mayor desarrollo alcanzó fue CSIRO FI-1029 con una tasa de crecimiento de $0.50 \pm 0.009 \text{ cm/día}$ y la de menor desarrollo, ARSEF1941 con una tasa de crecimiento de 0.050 cm/día (Anexo 2). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre cepas a esta temperatura con 7 grupos diferentes. Especie tipo CSIRO FI-1029 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* presentó un desarrollo similar a los aislamientos de México (Tabla 7).

A 30 °C, los aislamientos que mostraron el mayor crecimiento en esta temperatura fueron EH-467 y EH-468, los cuales presentaron una tasa de crecimiento de $0.501 \pm 0.007 \text{ cm/día}$ para el primero, y $0.507 \pm 0 \text{ cm/día}$ para el

otro (Anexo 2). El aislamiento que menor crecimiento mostró fue EH-480 con una tasa de crecimiento de 0.299 ± 0.001 cm/día (Anexo 2). El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($P < 0.01$) entre cepas y mostró un ordenamiento de los 18 aislamientos en 8 grupos.

Con respecto a las especies tipo a 30°C la que más desarrollo alcanzó fue CSIRO FI-1029, con una tasa de crecimiento de 0.387 ± 0.003 cm/día (Anexo 2). La cepa CSIRO FI-698 no mostró desarrollo al término del ensayo a esta temperatura. El análisis estadístico, reveló diferencias significativas ($P < 0.01$), en el desarrollo de las 11 especies tipo a esta temperatura, y la prueba de Tukey distribuyó las cepas en 9 grupos.

En la tabla 7 también se muestra el crecimiento de los aislamientos a 35 °C. El que mostró el mayor crecimiento a esta temperatura fue EH-471, el cual presentó una tasa de crecimiento de 0.032 cm/día. A esta temperatura la mayoría de los aislamientos no crecieron: EH-465, EH-466, EH-468, EH-470, EH-472, EH-474, EH-476, EH-478, EH-480 y EH-482. El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($P < 0.01$), entre aislamientos y la comparación múltiple de medias (Tukey) distribuyó los 18 aislamientos en 4 grupos. El crecimiento en las especies tipo disminuyó considerablemente a esta temperatura, sólo mostraron crecimiento las cepas ARSEF 1914, CSIRO FI-985, CSIRO 987 y CSIRO FI-1029, con tasas de crecimiento bajas de 0.047 ± 0.013 , 1.45 ± 0.009 , 1.55 ± 0.047 , y 0.51 ± 0.01 cm /día respectivamente. En las cepas restantes no hubo desarrollo alguno; el análisis estadístico reveló diferencias significativas ($P < 0.01$), y la prueba de. Tukey distribuyó las cepas en 3 grupos, en uno de ellos todas las cepas que no crecieron, en otro grupo a CSIRO 1914 y CSIRO FI-987, y en el tercer grupo a las cepas que más crecieron CSIRO 985 y CSIRO FI-1029. A 40 °C no hubo crecimiento a excepción de los aislamientos EH-465 y EH-478, al mostrar un diámetro final de 0.7 cm y una tasa de crecimiento de 0.007 cm/día.

En las figuras 8 y 9 se muestra el crecimiento a 25 y 30 °C, temperaturas óptimas en las que se desarrollaron mejor los aislamientos tanto de México como las especies tipo, y de éstas, la cepa CSIRO FI-1029, que corresponde al hongo *M. anisopliae* var. *anisopliae*, misma variedad de los aislamientos de MX

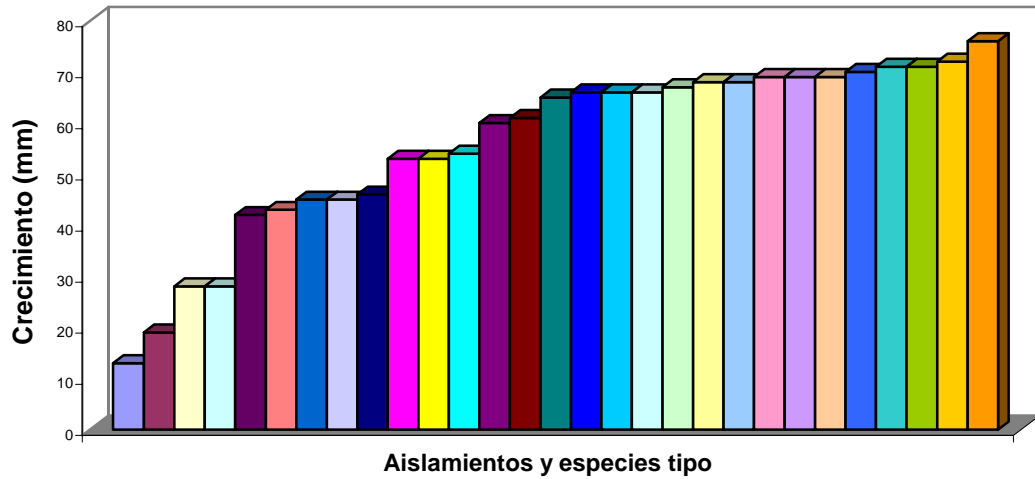
estudiados, desarrolló colonias con un crecimiento similar al promedio de los de MX como puede observarse en la figura 10.

Tabla 7. Diámetro colonial final a 15, 25, 30 y 35 °C de los cultivos originales y especies tipo de *Metarhizium anisopliae* en estudio.

Aislamientos	Diámetro final (cm)			
	15°C	25°C	30°C	35°C
EH-465*	2.48 ± 0.210 ^a	7.28 ± 0.083 ^a	7.400 ± 0 ^b	0.60 ± 0 ^d
EH-466*	2.55 ± 0.035 ^a	6.92 ± 0.057 ^{abcd}	7.00 ± 0.00 ^d	0.60 ± 0 ^d
EH-467*	2.45 ± 0.086 ^a	6.75 ± 0.050 ^{bcd}	7.62 ± 0.109 ^a	0.83 ± 0.044 ^b
EH-468*	2.53 ± 0.120 ^a	7.14 ± 0.82 ^{ab}	7.70 ± 0 ^a	0.70 ± 0 ^{cd}
EH-469*	2.00 ± 0 ^{bc}	6.96 ± 1.4 ^{abc}	7.20 ± 0 ^c	0.75 ± 0.093 ^{bc}
EH-470*	1.84 ± 0.054 ^{bc}	7.14 ± 0.65 ^{ab}	7.40 ± 0 ^b	0.60 ± 0 ^d
EH-471*	2.02 ± 0.044 ^{bc}	5.27 ± 0.58 ^f	5.64 ± 0.089 ^e	1.05 ± 0 ^a
EH-472*	0.60 ± 0 ^h	4.30 ± 0.272 ^g	5.18 ± 0.057 ^f	0.600 ± 0 ^d
EH-473*	1.70 ± 0 ^{cde}	5.99 ± 0.151 ^e	6.99 ± 0.022 ^d	0.82 ± 0.109 ^b
EH-474*	1.77 ± 0.043 ^{bcd}	6.52 ± 0.171 ^d	7.16 ± 0.041 ^c	0.60 ± 0 ^d
EH-475*	1.70 ± 0 ^{cde}	6.73 ± 0.130 ^{bcd}	6.98 ± 0.044 ^d	0.77 ± 0.44 ^{bc}
EH-476*	1.34 ± 0.041 ^{ef}	6.05 ± 0.086 ^e	6.95 ± 0.11 ^d	0.60 ± 0 ^d
EH-477*	1.40 ± 0 ^{def}	5.44 ± 0.041 ^f	6.97 ± 0.044 ^d	0.62 ± 0.044 ^d
EH-478*	1.96 ± 0.310 ^{bc}	6.62 ± 0.135 ^{cd}	7.18 ± 0.044 ^c	0.60 ± 0 ^d
EH-479*	2.20 ± 0.044 ^{ab}	6.56 ± 0.191 ^{cd}	7.20 ± 0 ^c	0.79 ± 1.29 ^{bc}
EH-480*	1.06 ± 0.044 ^{fg}	6.87 ± 0.143 ^{abc}	4.79 ± 0.022 ^h	0.60 ± 0 ^d
EH-481*	0.60 ± 0 ^h	6.59 ± 0.190 ^{cd}	4.93 ± 0.97 ^g	0.62 ± 0 ^d
EH-482*	0.78 ± 0.044 ^{gh}	6.85 ± 0.050 ^{abcd}	5.00 ± 0 ^g	0.60 ± 0 ^d
1941**	0.70 ± 0 ^g	1.30 ± 0 ^g	1.04 ± 0.065 ^h	0 ± 0 ^c
1914**	2.00 ± 0 ^b	4.67 ± 0.057 ^c	5.14 ± 0.089 ^b	0.66 ± 0.019 ^b
1184**	2.00 ± 0 ^b	4.58 ± 0.057 ^c	2.72 ± 0.109 ^e	0 ± 0 ^c
2037**	0.79 ± 0.022 ^{ef}	2.80 ± 0 ^e	2.70 ± 0.106 ^e	0 ± 0 ^c
2948**	0.900 ± 0 ^e	2.80 ± 0.339 ^e	1.57 ± 0.057 ^f	0 ± 0 ^c
985**	1.28 ± 0.027 ^d	4.23 ± 0.044 ^d	4.18 ± 0.109 ^c	2.04 ± 1.341 ^a
FI-147**	1.92 ± 0.125 ^{bc}	5.32 ± 0.083 ^b	3.82 ± 0.044 ^d	0 ± 0 ^c
FI-1029**	2.80 ± 0.136^a	7.62 ± 0.130^a	6.02 ± 0.044^a	2.180 ± 0.658 ^a
FI-698**	1.88 ± 0.057 ^{bc}	1.90 ± 0 ^f	0.60 ± 0 ⁱ	0 ± 0 ^c
FI-987**	0.900 ± 0 ^e	4.70 ± 0 ^c	3.97 ± 0.044 ^d	0.720 ± 0.178 ^b
FI-72**	1.86 ± 0.740 ^c	4.50 ± 0.061 ^c	1.39 ± 0.022 ^g	0 ± 0 ^c

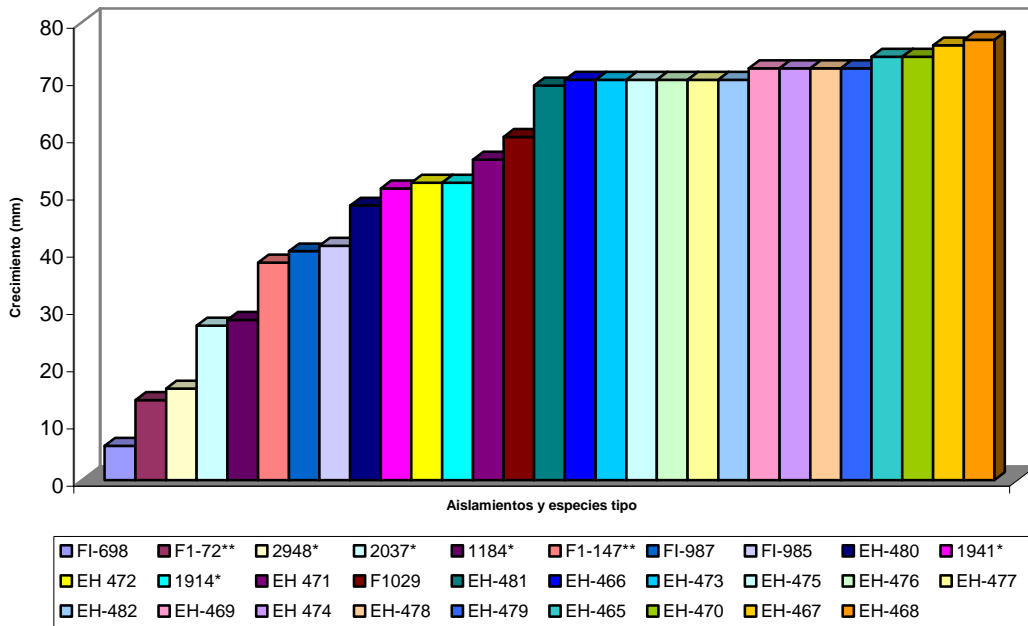
*Cultivos originales (F = 82.088; g.l. = 17; P < 0.001), en letras iguales no hay diferencia significativa).

**Cepas de referencia (F = 1126.871; g.l. = 10; P < 0.001), en letras iguales no hay diferencia significativa).



1941*	FI-698	2037*	2948*	FI-985	EH-472
IMI-330189**	F1-72**	1184*	EH-471	F1-147**	EH-477
EH-473	EH-476	EH-474	EH-478	EH-479	EH-481
EH-475	EH-467	1914*	EH-466	EH-480	EH-482
EH-469	EH-468	EH-470	EH-465	F1029	

Figura 8. Promedio del crecimiento de 14 días a 25 °C de los 18 aislamientos de México de *Metarhizium anisopliae* y las 11 especies tipo del mismo género.



FI-698	F1-72**	2948*	2037*	1184*	F1-147**	FI-987	FI-985	EH-480	1941*
EH 472	1914*	EH 471	F1029	EH-481	EH-466	EH-473	EH-475	EH-476	EH-477
EH-482	EH-469	EH 474	EH-478	EH-479	EH-465	EH-470	EH-467	EH-468	

Figura 9. Promedio del crecimiento de 14 días a 30°C de los 18 aislamientos de México de *Metarhizium anisopliae* y las 11 especie tipo del mismo género.

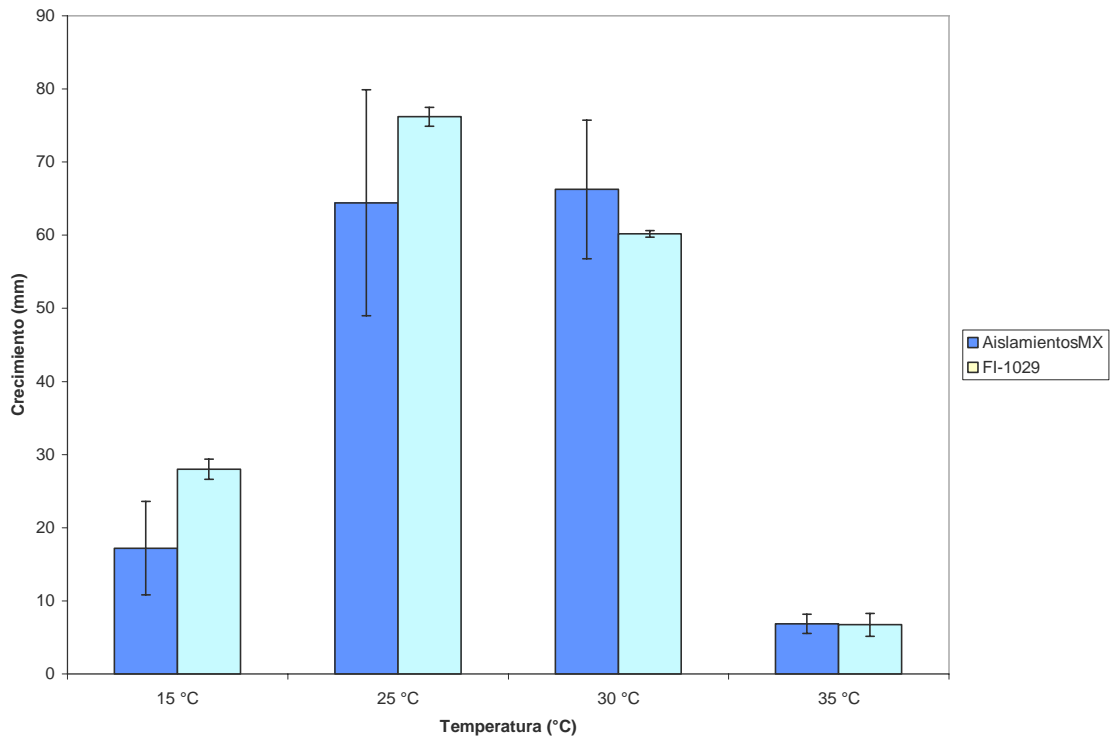


Figura 10. Promedios del crecimiento a 15, 25, 30 y 35°C de los 18 aislados de México del hongo *Metarhizium anisopliae* y especie tipo CSIRO FI-1029, de la misma especie y variedad.

8.4. Caracterización genotípica de los cultivos originales y monospóricos

a) Extracción de DNA

De acuerdo al método descrito anteriormente se obtuvo de los cultivos monospóricos seleccionados de *M. anisopliae* y de las once especies tipo. Solamente se trabajó con los cultivos monospóricos ya que en trabajos previos no se observaron diferencias entre los resultados de los cultivos originales y monospóricos en la prueba de RAPD-PCR (Cano, 2003). La cuantificación del DNA se realizó por comparación de las muestras con la curva obtenida de las diferentes concentraciones de fago λ (10, 20,30, 50, 100 y 200 ng). En la figura 11 se observa esta curva en el extremo izquierdo y en los siguientes carriles (1-14) se distingue el DNA de los 14 cultivos monospóricos. La cantidad obtenida varió entre 10 y 200 ng de DNA

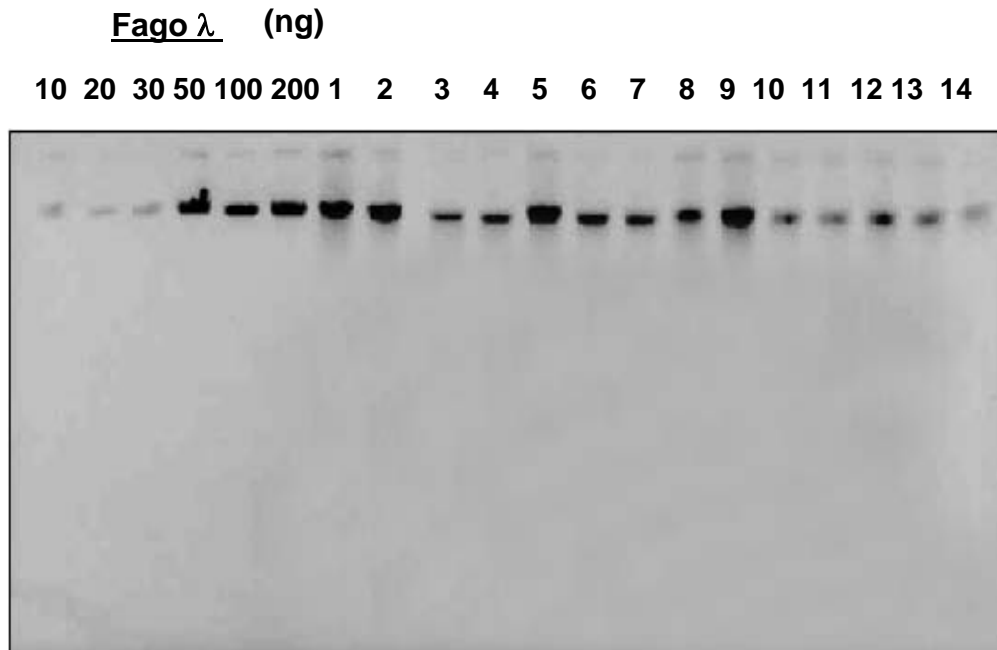


Figura 11. Análisis electroforético de DNA obtenido de 14 aislamientos de *M. anisopliae*. en gel de agarosa al 0.8% En los primeros seis carriles se observa la curva de DNA a diferentes concentraciones de fago lambda (10, 20,30, 50, 100 y 200 ng) y en los siguientes carriles (1-14) se observa el DNA de los aislamientos estudiados.

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

Para la estandarización del método se realizaron curvas: de DNA, oligonucleótidos, cloruro de magnesio y de dNTP's. Se probaron los programas de amplificación descritos por Cobb y Clarkson (1993) y Driver (2000) (Tabla 5). En la figura 12 se observan los patrones obtenidos con cada programa. Se utilizaron diferentes concentraciones de oligonucleótidos (200, 100 y 50 pM), con la especie tipo CSIRO F1-147 y el aislamiento EH-478/1 y dos oligonucleótidos (OPH1 y OPA-04). Esta prueba reflejó una mejor amplificación al utilizar el programa de Cobb y Clarkson (1993), eligiendo este último para continuar con la estandarización de la técnica.

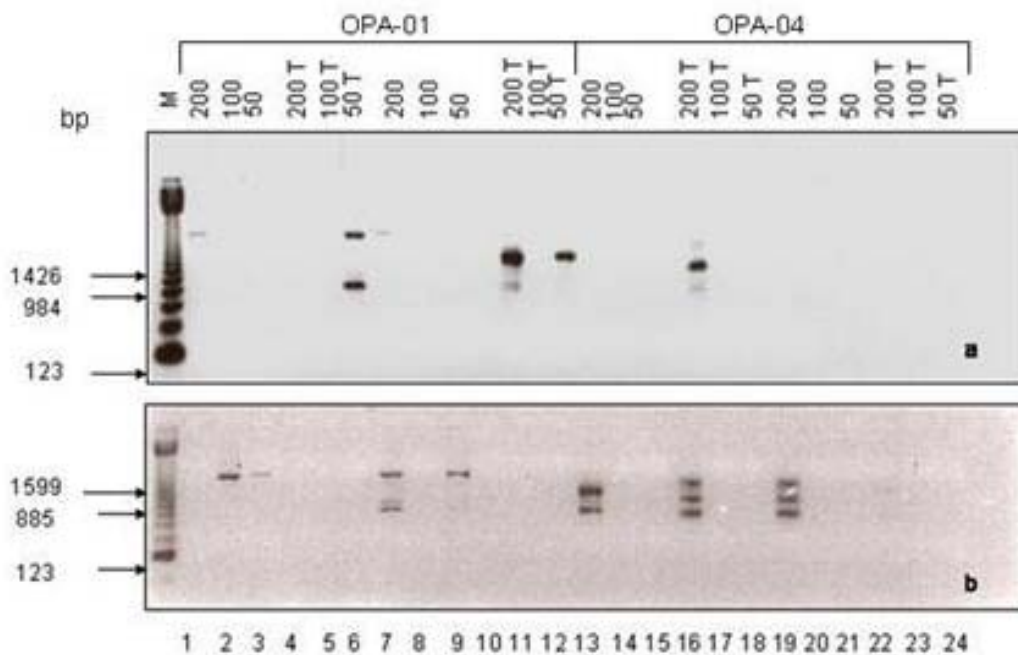


Figura 12. Estandarización del programa de amplificación para la PCR utilizando los programas de Driver *et al.*(2000) (a) y Cobb y Clarkson (1993) (b). M = Escalera de DNA de 123 bp. Carriles 1-12 con 200, 100 y 50 pM del oligonucleótido OPH-01 y carriles 13-24 del oligonucleótido OPA-04 y sus respectivos testigos (T). Testigo negativo (ausencia de DNA).

• Curva de Oligonucleótido

Se utilizó el oligonucleótido OPA-04 en diferentes concentraciones: 25, 50, 100, 200 y 300 pM, observando que con 25 pM no hay amplificación. De las

concentraciones restantes se obtuvieron patrones polimórficos más claros con 100 y 200 μM (Figura 13).

- **Curva de dNTP's**

En la figura 14 se muestra el perfil obtenido en el aislamiento EH-469/7 con diferentes concentraciones de dNTPs (50, 100, 200, 250, y 300 μM) y el oligonucleótido OPA-04. La mejor amplificación se obtuvo con 250 μM .

- **Curva de cloruro de magnesio**

Esta prueba se realizó utilizando el DNA de la cepa de referencia CSIRO FI-147 y del aislamiento EH-478/1 con el oligonucleótido OPA-04. Se probaron las siguientes concentraciones de cloruro de magnesio: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM. En la figura 15 se puede observar una mejor amplificación con 2.5 mM para las dos muestras de DNA utilizadas.

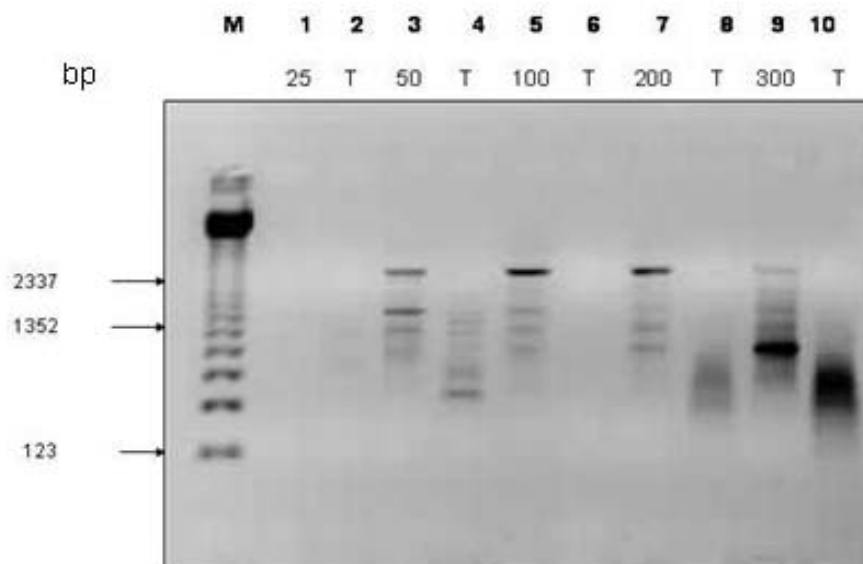


Figura 13. Curva de oligonucleótidos utilizando el DNA de EH-469/7. En el primer carril se muestra el marcador M = Escalera de DNA de 123 bp. En los carriles 1-10 se observan las diferentes concentraciones: 25, 50, 100, 200 y 300 μM con el oligonucleótido OPA-04 y sus respectivos testigos (T). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 100 V.

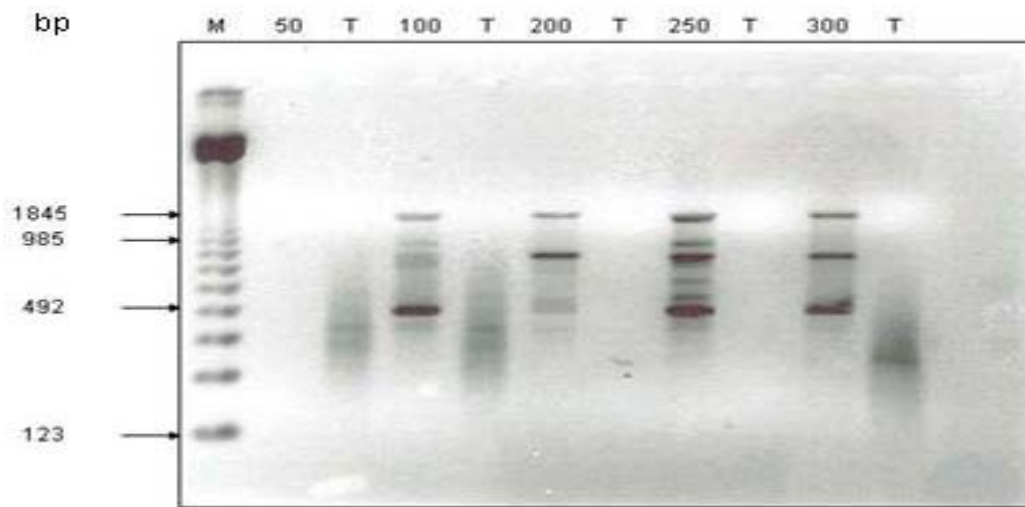


Figura 14. Curva de dNTP's utilizando 50,100, 200, 250 y 300 μ M. con DNA de EH-469/7 y el oligonucleótido OPA-04. M = Escalera de DNA de 123 bp. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V.

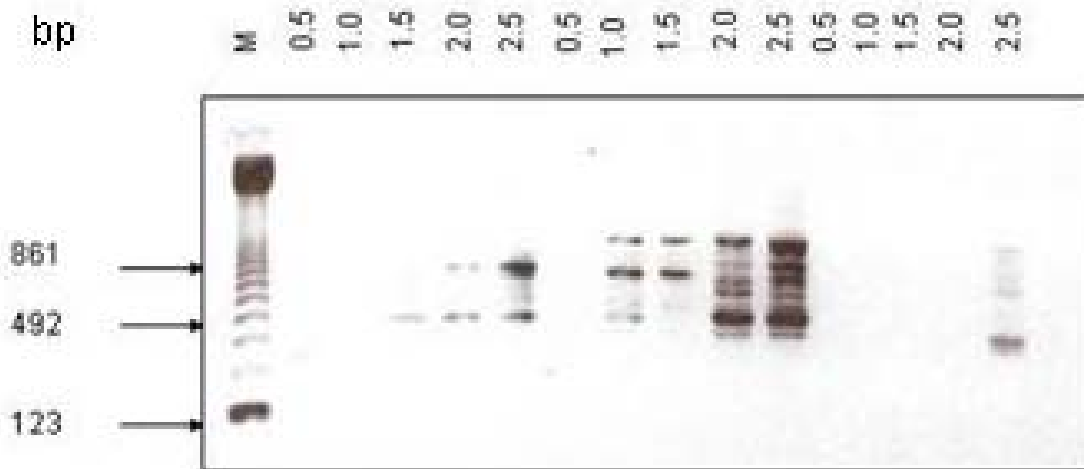


Figura 15. Curva de $MgCl_2$ utilizando el oligonucleótido OPA-04 y DNA de la especie tipo CSIRO F1-147 y del aislamiento EH-478/1. M = Escalera de DNA de 123 bp. Carriles con 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM de cloruro de magnesio. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5% a 100 V.

c) Obtención del polimorfismo del DNA por amplificación al azar, utilizando oligonucleótidos arbitrarios (RAPD-PCR)

Las condiciones óptimas para RAPD-PCR utilizando DNA del hongo *M. anisopliae* fueron : buffer (1X) (Applied Biosystems), 2.5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems), 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 200 pM de cada oligonucleótido (Qiagen), 1 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) y 10 ng de DNA en el caso de los aislamientos y 1 ng para las especies tipo. El volumen final de reacción fue de 25 µl.

Con base en la estandarización de las condiciones para RAPD-PCR, se utilizaron 14 oligonucleótidos con DNA de los 18 aislados de los cultivos monospóricos así como de las 11 especies tipo. Se obtuvieron 12 patrones de amplificación con 12 de los 14 oligonucleótidos de México, en tanto que con las especie tipo se lograron patrones de amplificación con todos los oligonucleótidos. En la figura 16 se observan los patrones polimórficos obtenidos al utilizar 11 oligonucleótidos con DNA del aislamiento EH-465/4.

bp M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

123

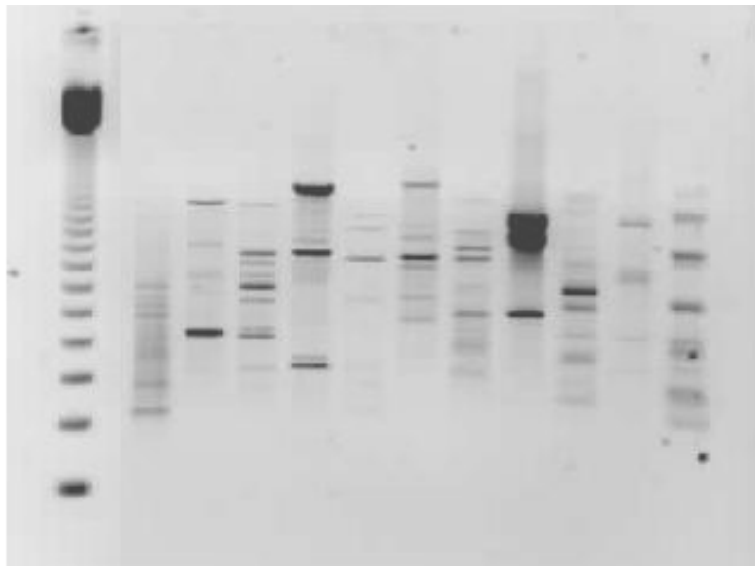


Figura 16. Patrón polimórfico de EH-465/8. Marcador M = Escalera de DNA de 123 bp en el primer carril y en carriles 1-11 los siguientes oligonucleótidos: OPA-01, OPA-04, OPA-05, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-16, OPA-19, OPH-01, OPH-02 y OPF-08.

Al comparar los perfiles de los aislamientos de MX obtenidos con el oligonucleótido OPA-01 se observa una gran variedad de bandas, sin embargo, sólo se comparten algunas con las obtenidas de las especies tipo, en particular con la cepa CSIRO FI-1029 correspondiente a *Metarhizium anisopliae* var.

anisopliae (Figura 17). En las figuras 18 y 19 se muestran los patrones obtenidos al utilizar los 18 aislamientos y las especies tipo con los oligonucleótidos OPA-08 y OPH-02 respectivamente.

Las especies tipo del género *Metarhizium* (clados 1-10) mostraron un patrón polimórfico diferente entre ellas. Se observaron algunas bandas compartidas entre los aislamientos de MX y la cepa CSIRO FI-1029 de Eritrea caracterizada como *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

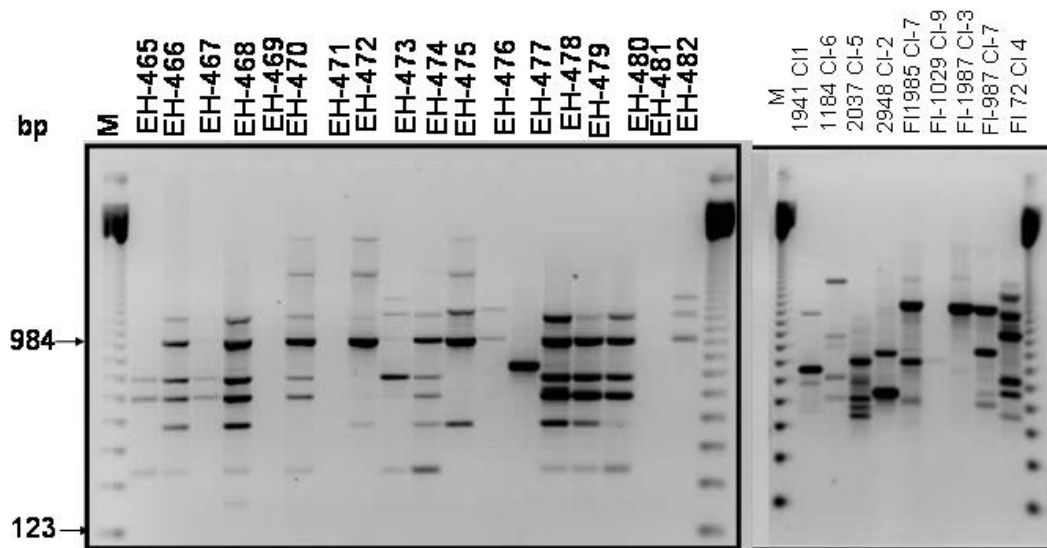


Figura 17. Patrón polimórfico obtenido con el oligonucleótido OPA-01 con DNA de los aislamientos de MX (izquierda) y las especies tipo (derecha). En el primer y último carril se muestra la escalera de DNA de 123 bp.

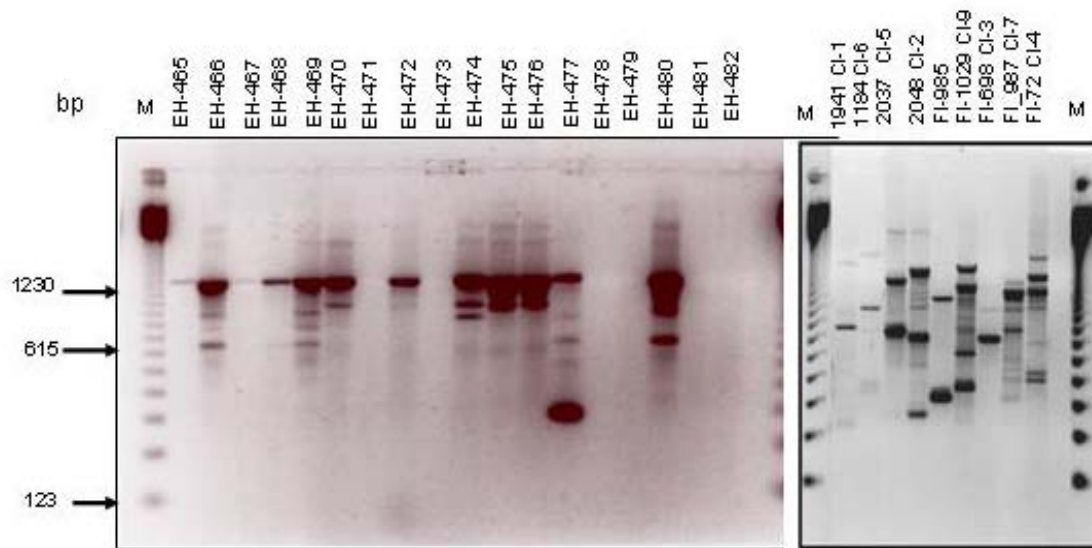


Figura 18. Patrón polimórfico obtenido con el oligonucleótido OPA-08 con DNA de los aislamientos de MX (izquierda) y las especies tipo (derecha). En el primer y último carril se muestra la escalera de DNA de 123 bp (M).

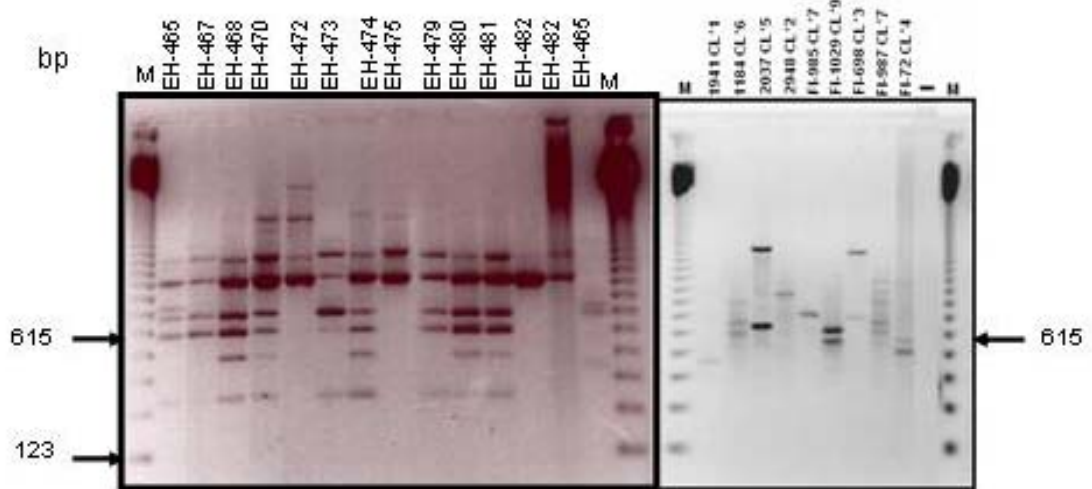


Figura 19. Patrón polimórfico obtenido con el oligonucleótido OPH-02 con DNA de los aislamientos de MX (izquierda) y las especies tipo (derecha). En el primer y último carril se muestra la escalera de DNA de 123 bp (M).

A partir de los patrones de amplificación obtenidos de los aislamientos y de las especies tipo se construyó una matriz de presencia-ausencia obteniéndose un total de 339 marcadores, con la cual se obtuvo un fenograma (Figura 20) que nos permitió comparar la relación entre aislamientos y especies tipo. En el árbol obtenido se observan altos niveles de variabilidad. Se observan dos grupos, uno que abarca todos los aislamientos de MX (I) y en el otro a todas las especies tipo (II). El coeficiente de correlación cofenética de $r = 0.94$ nos indica que los resultados que se obtuvieron son debido a un comportamiento biológico y no se deben al azar. En la figura 21 del análisis de componentes principales (ACP) se muestra el mismo fenómeno desglosado en el fenograma donde, se observan todos los aislamientos de México en un grupo diferente del que asocia a las especies tipo. El ACP (Figura 21) y el árbol de Tendido Mínimo (ATM) (Figura 22) agruparon siempre a todos los aislamientos de México.

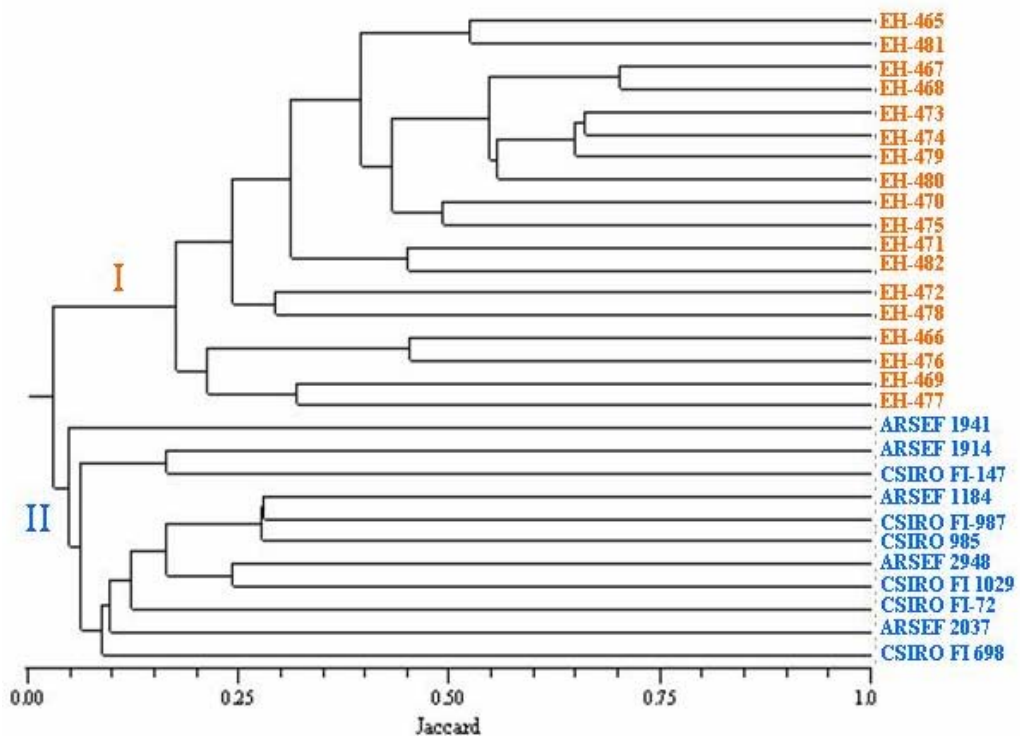


Figura 20. Fenograma que muestra las relaciones entre los aislamientos (I) y especies tipo del género *Metarhizium* (II). El fenograma fue generado a partir de una matriz de similitud genética obtenida a partir de una matriz de presencia-ausencia de 339 marcadores obtenidos por el método de RAPD-PCR.

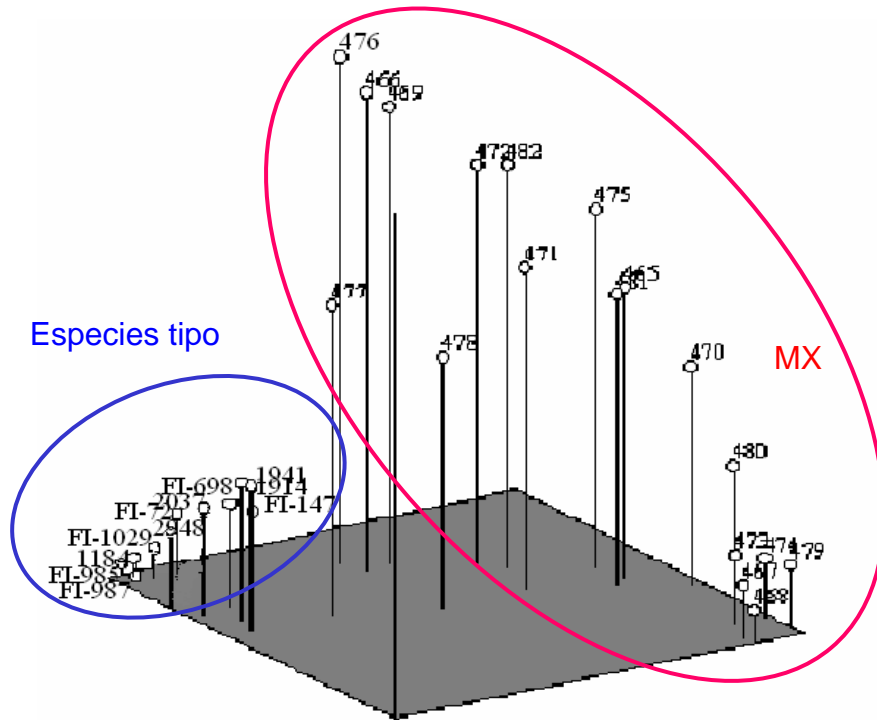


Figura. 21. Agrupamiento de aislamientos de *M. anisopliae* y de las especies tipo por medio del análisis de componentes principales.

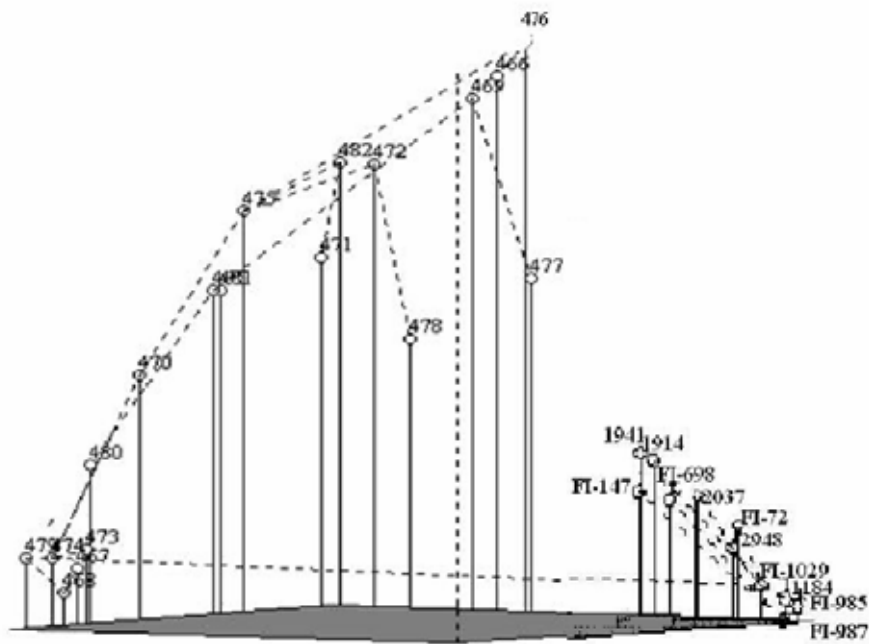


Figura 22. Árbol de tendido mínimo donde el grupo de aislamientos de México se relaciona con la especie tipo FI-1029 correspondiente al hongo *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

9. Discusión

Los hongos entomopatógenos parasitan un amplio espectro de hospederos en diversas regiones geográficas, lo que origina que aislamientos de la misma especie presenten una gran variabilidad genética. Por ello, es importante contar con aislamientos autóctonos del área donde se va aplicar un insecticida biológico. Una vez que se cuenta con ellos, es necesario hacer una selección con el objeto de escoger el más eficiente para controlar la plaga en cuestión (Charnley, 1992; Clarkson, 1992; Hernández-Velázquez, 2001). Para la producción masiva de bioinsecticidas fúngicos y su aplicación en el campo agrícola es relevante conocer el genotipo de la cepa que va a ser utilizada y que además pueda servir posteriormente para su monitoreo en donde sea liberado (Leal *et al.*, 1997).

En el presente trabajo se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de MX, por lo que fue importante contar con poblaciones genéticamente homogéneas (Goetel & Inglis, 1997); por esta razón toda la caracterización genotípica se llevó a cabo con cultivos monospóricos. En la selección de cultivos monospóricos no se encontraron diferencias significativas en relación al tamaño y producción de conidios y tasa de crecimiento, entre el cultivo polispórico y los monospóricos obtenidos de cada uno de los 18 aislamientos estudiados. Estos resultados concuerdan con trabajos previos al caracterizar los cultivos monospóricos de *M. anisopliae* var. *acridum* (Cano, *et al.*, 2002).

En otros estudios, al analizar características fenotípicas del hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecani*, se encontraron diferencias significativas entre cultivos monospóricos y polispóricos (Cortez-Madrigal *et al.*, 2003). No encontraron diferencias en relación a color, apariencia y tipo de micelio, pero si en relación al tamaño de los conidios, y clasificaron los aislamientos en tres grupos cuyo rango osciló entre 1.2 y 10.8 μm . Sin embargo, en general, el tamaño de conidios resultó muy similar entre aislamientos monospóricos y polispóricos. En ese mismo trabajo (Cortez-Madrigal *et al.*, 2003) encontraron diferencias con respecto a la producción de conidios, ya que, generalmente los polispóricos presentaron baja producción de conidios mientras que en los cultivos monospóricos la producción aumentaba. Por otro lado, al evaluar la tasa de germinación media conidial (GT_{50}), también encontraron diferencias, donde los cultivos monospóricos alcanzaron una GT_{50} mayor con respecto a los

polispóricos. En otros estudios, Ayala *et al.* (2005) evaluaron el crecimiento del hongo *L. lecanii*, aislado de insectos y de la roya del café, a diferentes temperaturas. Encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre cultivos monospóricos y polispóricos, mostrando una gran variabilidad fenotípica intraespecífica entre los aislamientos de MX y las especies tipo estudiadas. En otras investigaciones con cultivos monospóricos y polispóricos del entomopatógeno *P. fumosoroseus*, (Cavallazi *et al.*, 2001) no se encontraron diferencias en cuanto al tamaño de los conidios, sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento y esporulación entre algunos aislamientos originales y sus cultivos monospóricos

Todos los estudios anteriores comparando cultivos poli y monospóricos apuntan hacia una mejor obtención de características deseadas en los hongos al utilizar monospóricos adecuadamente seleccionados.

Existen varios factores que influyen sobre la eficiencia biológica de hongos entomopatógenos en el control biológico de plagas. Entre ellos, están la temperatura y la humedad relativa, ya que ambos factores pueden afectar su estabilidad en almacenamiento y su aplicación en el campo (Lecuona & Alves, 1995). Estos factores son fundamentales en la implementación del control biológico, ya que pueden afectar la germinación de conidios, el desarrollo y penetración del tubo germinal, la colonización y la reproducción de estos microorganismos (Alves, 2002; Glare & Milner, 1991). En el caso de la temperatura, la realización de estudios de termotolerancia puede ayudar en la selección de los mejores aislamientos de estos hongos para su liberación en diferentes regiones climáticas. En el presente estudio se evaluó la termotolerancia de aislamientos de MX y las especies tipo. Nuestros resultados indican que 25 y 30 °C son las temperaturas óptimas de crecimiento para los hongos estudiados, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Berlanga-Padilla & Hernández-Velázquez (2002), quienes encontraron a 27 °C altos porcentajes de germinación en cultivos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, mientras que *M. anisopliae* var. *acridum* presenta un mejor desarrollo entre 27 y 32 °C. Fargues *et al.* (1992) también reportó que *M. anisopliae* requiere para su crecimiento micelial una temperatura óptima entre 25 y 28 °C, mientras que los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *P. fumosoroseus* y *N. rileyi* requieren una temperatura de 25°C. Con respecto a los aislamientos

estudiados los que mayor crecimiento alcanzaron a 25 y 30 °C fueron los aislamientos EH-465, EH-468 y EH-470, provenientes del estado de Veracruz, región tropical de México.

Ouedrago *et al.* (1997) realizaron estudios de termotolerancia con aislamientos de *M. anisopliae* y *M. flavoviride* y encontraron que los correspondientes a la segunda especie fueron más tolerantes a la temperatura. Sin embargo, en la mayoría de los aislamientos que probaron, la temperatura óptima fue de 25°C y es a partir de 30°C que la tasa de crecimiento disminuyó, además, observaron que a 40°C el crecimiento fue nulo. Por otro lado, Thomas & Jenkins (1997) confirman que el crecimiento y virulencia de *M. flavoviride* es fuertemente afectado por la temperatura y reportan que la mayor producción de conidios se obtiene a 25 °C, mientras que a 30 °C se alcanza la máxima germinación (100 %). Estos datos también concuerdan con el crecimiento de algunos otros hongos entomopatógenos, como lo muestra el trabajo realizado por Hallsworth & Magan (1999), quienes probaron el efecto de la temperatura con *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus* y reportan como temperaturas de crecimiento óptimo 25, 30 y 20 °C respectivamente. Recientemente, Fargues *et al.* (1997) y Ouedrago *et al.* (1997) examinaron el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *B. bassiana* y *Metarhizium* de diferentes regiones climáticas del mundo y reportan que la temperatura óptima de crecimiento para estos hongos se encuentra en un rango de 25 a 32 °C. Con respecto a las especies tipo, en nuestro estudio, la que alcanzó un mayor crecimiento a 25 y 30 °C fue CSIRO FI-1029 que corresponde a *M. anisopliae* var. *anisopliae* de Eritrea de clima tropical. El comportamiento de esta última mostró un desarrollo muy similar a los aislamientos de MX (Basilio, 2004; Navarro-Barranco *et al.*, 2002).

Actualmente, el género de *Metarhizium* se ha clasificado en diez grupos (clados) con base en técnicas moleculares, entre otras, el RAPD-PCR, secuenciación de las regiones ITS, 28S, D3 del DNA ribosomal y algunas características fenotípicas como termotolerancia (Driver *et al.*, 2000). Diversos grupos de investigación han trabajado con el hongo entomopatógeno *Metarhizium* y se han esforzado por establecer un método conveniente para encontrar diferencias inter e intra específicas (Mavridou & Typas, 1998).

Berreta *et al.* (1998), al estudiar aislamientos de *B. bassiana* procedentes de Argentina y Brasil con la técnica de RAPD y marcas fluorescentes, detectaron altos niveles de variabilidad, sin encontrar relación con su origen geográfico ni hospedero. Consideran que esta técnica puede ser utilizada para caracterizar una cepa antes de ser liberada y asegurar la capacidad para detectarla en un ecosistema como agente de control biológico, además de ayudar como un control de rutina para verificar una estabilidad genética durante su producción en masa.

A través de análisis RAPD se han encontrado altos niveles de variación genética al comparar aislamientos de algunos otros hongos entomopatógenos (St. Leger *et al.*, 1992; Fegan *et al.*, 1993; Tigano-Milani *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, también mostraron una gran diversidad en los perfiles de RAPD-PCR, sin embargo, se logró separar en un solo grupo (I) a todos los aislamientos de MX, aunque no se pudieron subagrupar de acuerdo a las diferentes regiones de donde procedían. Por otro lado, en el grupo II quedaron distribuidas todas las especies tipo correspondientes a los 10 clados del género *Metarhizum* clasificados por Driver *et al.* (2000). Esta agrupación también se refleja en el análisis de componentes principales (Figura 20). Al obtener el análisis de tendido mínimo se observa una relación estrecha entre los aislamientos de MX y el clado 9 representado por la cepa CSIRO FI-1029 correspondiente al hongo *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

Bidochka *et al.* (2001), analizaron la genética de poblaciones de 83 aislamientos de *M. anisopliae*, procedentes de zonas boscosas y agrícolas en Ontario, Canadá, a través de aloenzimas, RAPD-PCR y RFLP-PCR del gen de la proteasa *pr1*. Sus resultados revelaron una alta variabilidad entre las cepas. Los dos grupos fueron asociados a los dos tipos de hábitat más no se encontró relación con el insecto hospedero. Concluyen que aún cuando *M. anisopliae* es un hongo mitospórico haploide se han encontrado poblaciones recombinantes y esto puede darse a través de un proceso parasexual.

Esta forma de reproducción fue descubierta por Pontecorvo *et al.* (1953) al estudiar la heterocariosis en el hongo *Aspergillus nidulans*. El ciclo parasexual del entomopatógeno *M. anisopliae* ya ha sido descrito por Al-Aidroos (1980) y Messias & Azevedo (1980), también ha sido reportado en el género *Paecilomyces* por Riba y Ravelojoana (1984), ambos en condiciones de

laboratorio. La importancia de la parasexualidad radica en que permite que se lleve a cabo la recombinación genética en hongos mitospóricos. El ciclo parasexual implica la fusión de hifas y protoplastos para generar heterocariones y finalmente heterocigotos diploides. Los diploides obtenidos son, generalmente, muy inestables y al tener recombinación permite la obtención de nuevos genotipos, lo cual podría explicar la gran variabilidad que presentan. Algunos diploides estables de hongos entomopatógenos parecen mostrar más efectividad para causar mortalidad que los propios mutantes de donde se originaron, lo cual es una característica muy importante para el control biológico (Valadares-Inglis & Azevedo, 1997).

En nuestro trabajo también se encontró una gran variabilidad tanto entre aislamientos de MX como entre las especies tipo. Se esperaba que los aislamientos de MX, caracterizados tradicionalmente con base en su morfología y características fisiológicas quedaran incluidos dentro del clado 9, que corresponde al hongo *M. anisopliae* var. *anisopliae*, de acuerdo a la clasificación de Driver *et al.* (2000). Sin embargo, formaron un grupo independiente del formado por las especies tipo.

La separación de este grupo de las especies tipo sugiere un grupo críptico como se ha reportado en el hongo patógeno *Coccidioides immitis* (Burt *et al.*, 1996). Para poder confirmar la posible existencia de una especie críptica, es necesario llevar a cabo más estudios taxonómicos utilizando marcadores moleculares que reflejen su presencia. La clasificación tradicional de *Metarhizium* con base en características morfológicas ha permitido distinguir al hongo *M. anisopliae* de *M. flavoviride* y se ha subdividido al género basándose en el largo de los conidios. Otras características que se han considerado incluyen formación de columnas, debidas a la adhesión lateral de conidios así como el color de la colonia fúngica (Humber, 1997). Un número de taxones adicionales se han descrito desde la clasificación de Tulloch, incluyendo *M. album*, *M. brunneum*, *M. flavoviride*, *M. pingshaese*, *M. cylindrospora*, *M. guizhonensis*, *M. taii*, *M. pinsahensis* y *M. biformispora* aunque no han sido formalmente reconocidas como especies separadas del género (Bidochka & Small, 2005). Estos autores sugieren que el género *Metarhizium* está compuesto de un gran número de grupos genéticos y especies crípticas. Dentro de un grupo genético se lleva a cabo la recombinación, pero entre

especies crípticas muy pocas veces puede presentarse este proceso. Además afirman que existe gran evidencia de que en climas templados algunos grupos genéticos de *Metarhizium* se adaptan a ciertas condiciones ambientales y por ello muestran un amplio rango de hospederos. En contraste, en climas tropicales y subtropicales hay evidencia de que este hongo muestra cierta preferencia hacia algún hospedero dado.

Cobb & Clarkson (1993) al analizar aislamientos de *M. anisopliae* y *M. flavoviride* mediante el uso de RAPD-PCR lograron reagruparlos en 3 subgrupos que no estuvieron relacionados a su origen geográfico y aunque se observó un gran polimorfismo tampoco encontraron una aparente asociación entre el genotipo y su hospedero original. Magalhaes *et al.* (2003) al realizar análisis de RAPD con aislamientos de *M. anisopliae* var. *acridum* y compararlos con los obtenidos de aislamientos de *M. anisopliae* var: *anisopliae* encontraron que presentaban patrones polimórficos muy diferentes confirmando así que esta técnica es de gran utilidad para analizar el polimorfismo entre variedades del género. Sin embargo, se requiere secuenciar las regiones ITS o las regiones IGS para permitir una mejor caracterización e identificación de estos hongos (Pantou *et al.*, 2003).

La disponibilidad y uso de marcadores obtenidos por isoenzimas y RAPD-PCR, podría mejorar el conocimiento acerca de las vías de migración, patogenicidad y la estructura de las poblaciones del género *Metarhizium* permitiendo, además, su monitoreo en campos agrícolas lo que representaría un apoyo para la lucha biológica contra plagas.

10. Conclusiones

- Los aislamientos poli y monospóricos no mostraron diferencias en la tasa de crecimiento, largo y producción de conidios, sugiriendo una población genéticamente homogénea.
- Los resultados de termotolerancia indican que la temperatura óptima de crecimiento de los aislamientos de MX, es de 25 a 30 °C, lo que sugiere la aplicación de este hongo en zonas climáticas acordes.
- Los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* de MX mostraron una alta variabilidad genética interespecífica con el método del RAPD-PCR.
- Los aislamientos de *M. anisopliae* de MX formaron un grupo separado de los 10 clados descritos por Driver *et al.* (2000).
- Se detectó una relación estrecha entre los aislamientos de MX y la especie tipo CSIRO FI-1029 del clado 9, correspondiente a la cepa *M. anisopliae* var. *anisopliae* procedente de Eritrea (Norte de África).

12. ANEXOS

Anexo1. Resultados de la tasa de crecimiento, tamaño de los conidios y producción de conidios de los aislamientos originales y sus monospóricos.

AISLADO EH-465	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL)	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.55	7.692	2.6E+09	
MONOSPÓRICOS				
1	0.55	7.692	6.60E+08	
2	0.535	7.692	1.40 E+09	
3	0.535	7.692	7.80E+08	
4	0.542	7.692	3.00E+09	
5	0.542	7.692	1.30E+09	
6	0.542	7.692	8.00E+08	
7	0.542	7.692	2.50E+09	
8	0.535	7.692	3.80E+09	8
9	0.535	7.692	2.10E+09	
10	0.542	7.692	2.40E+09	
PROMEDIO	0.540	7.692	1.94E+09	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.656$	No $P = 0.461$	No $P = 0.060$	

AISLADO EH-466	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.557	7.692	7.50E+05	
MONOSPÓRICOS				
1	0.559	7.692	2.90E+06	
2	0.555	7.692	3.80E+06	2
3	0.555	7.692	3.00 E+05	
4	0.550	7.692	1.20E+06	
5	0.559	7.692	1.10E+05	
6	0.557	7.692	5.00E+05	
7	0.555	7.692	2.50E+06	
8	0.556	7.692	2.50E+06	
9	0.555	7.692	4.00E+05	
10	0.550	7.692	1.00E+06	
11	0.559	7.692	9.50E+05	
12	0.558	7.692	1.85E+06	
13	0.555	7.692	1.00E+06	
PROMEDIO	0.557	7.692	1.791	
ANOVA $\alpha < 0.01$No $P = 0.450$	No $P = 0.420$	No $P = 0.240$	

AISLADO EH-467	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN N Conidios/MI	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.571	7.692	2.70E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	0.5357	7.225	3.20E+08	
2	0.557	7.225	3.70E+08	
3	0.564	7.458	3.30E+08	
4	0.571	7.692	2.80E+08	
5	0.564	7225	3.50E+08	
6	0.571	7225	4.20E+08	6
7	0.571	6.060	4.10E+08	
8	0.571	7.692	3.80E+08	
9	0.571	7.692	3.90E+08	
10	0.571	7.692	2.60E+08	
PROMEDIO	0.556	7.353	3.43E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.600$	No $P = 0.537$	No $P = 0.633$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

AISLADO EH-468	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.528	7.692	2.25E+09	
MONOSPÓRICOS		7.692		
1	0.507	7.692	8.90E+09	1
2	0.550	7.692	4.20E+09	
3	0.528	5.128	3.00E+09	
4	0.535	7.692	3.00E+09	
5	0.500	5.128	2.10E+09	
6	0.507	7.692	3.45E+09	
7	0.507	7.692	7.00E+08	
8	0.535	7.692	5.30E+09	
9	0.528	7.692	1.00E+09	
10	0.528	7.692	7.00E+08	
11	0.535	7.692	3.70E+09	
12	0.464	7.692	1.10E+09	
13	0.528	7.692	7.50E+09	
14	0.507	7.692	3.50E+09	
15	0.507	7.692	3.90E+09	
PROMEDIO	0.521	7.371	3.63E+09	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.500$	No $P = 0.455$	No $P = 0.665$	

AISLADO EH-469	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/MI	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.447	7.692	1.300E+09	
MONOSPÓRICOS				
1	0.441	7.692	5.30E+08	
2	0.447	7.692	5.40E+08	
3	0.435	7.692	5.10E+08	
4	0.452	7.692	9.65E+08	
5	0.429	7.692	1.03E+08	
6	0.452	7.692	4.40E+08	
7	0.452	7.692	2.80E+09	7
8	0.452	7.692	1.49E+08	
9	0.447	7.692	1.25E+08	
10	0.417	7.692	1.35E+08	
PROMEDIO	0.442	7.692	1.65E+09	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.664$	No $P = 0.495$	No $P = 0.599$	

AISLADO EH-470*	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.435	7.692	9.25E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	0.364	10.25	1.45E+08	
2	0.394	7.692	3.00E+08	
3	0.394	7.692	4.40E+08	
4	0.347	7.692	1.10E+08	
5	0.358	7.692	1.25E+08	
6	0.364	7.692	1.10E+09	6
7	0.364	7.692	5.26E+08	
8	0.388	7.692	5.40E+08	
9	0.423	7.692	4.85E+08	
PROMEDIO	0.383	7.947	0.469E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.610$	No $P = 0.624$	No $P = 0.978$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

AISLADO EH-471	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.370	7.692	1.35E+06	
MONOSPÓRICOS				
1	0.370	7.692	1.50E+06	
2	0.358	7.692	1.85E+06	
3	0.370	7.692	3.10E+06	3
4	0.370	7.692	1.28E+06	
5	0.370	7.692	7.30E+05	
6	0.388	7.692	8.50E+05	
7	0.341	7.692	3.50E+05	
8	0.352	7.692	1.70E+06	
9	0.370	7.692	1.05E+06	
10	0.370	7.692	1.95E+06	
11	0.370	7.692	1.75E+06	
12	0.370	7.692	1.45E+06	
13	0.429	7.692	6.00E+05	
PROMEDIO	0.371	7.692	1.30E+09	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.610$	No $P = 0.462$	No $P = 0.931$	

AISLADO EH-472	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.321	7.692	2.30E+07	
MONOSPÓRICOS				
1	0.557	7.692	5.40E+06	
2	0.285	7.692	4.00E+07	
3	0.298	10.25	1.50E+07	
4	0.207	7.692	7.70E+06	
5	0.321	7.692	5.20E+07	
6	0.271	5.128	5.94E+07	6
7	0.285	7.692	1.20E+07	
8	0.397	7.692	6.10E+06	
9	0.271	7.692	2.00E+07	
PROMEDIO	0.321	7.691	0.447E+07	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.510$	No $P = 0.589$	No $P = 0.832$	

AISLADO EH-473	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.435	7.692	2.70E+08	
MONOSPÓRICOS				
1	0.400	7.692	2.70E+08	
2	0.429	7.692	1.90E+08	
3	0.435	7.692	1.30E+08	
4	0.441	7.692	3.10E+08	4
5	0.429	7.692	1.40E+08	
6	0.452	7.692	2.10E+08	
7	0.388	7.692	1.90E+08	
8	0.400	7.692	1.70E+08	
PROMEDIO	0.423	7.435	2.08E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.586$	No $P = 0.442$	No $P = 0.918$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

AISLADO EH-474	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.423	7.692	9.51E+05	
MONOSPÓRICOS				
1	0.417	7.692	9.00E+06	
2	0.417	7.692	7.50E+05	
3	0.417	7.692	9.80E+05	
4	0.411	7.692	8.50E+05	
5	0.417	7.692	1.05E+06	
6	0.417	7.692	1.15E+06	6
7	0.382	7.692	9.50E+05	
8	0.417	7.692	1.00E+06	
PROMEDIO	0.413	7.692	9.53E+05	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.662$	No $P = 0.462$	No $P = 0.498$	

AISLADO EH-475	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** d µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.370	7.692	2.53E+07	
MONOSPÓRICOS				
1	0.435	7.692	1.50E+07	
2	0.382	7.692	4.15E+07	2
3	0.437	7.692	9.00 E+06	
4	0.411	7.692	1.08 E+07	
5	0.411	7.692	2.14 E+07	
PROMEDIO	0.407	7.692	2.04 E+07	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.694$	No $P = 0.442$	No $P = 0.151$	

AISLADO EH-476	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.342	7.692	2.50E+05	
MONOSPÓRICOS				
1	0.342	7.692	1.20E+05	
2	0.292	7.692	9.50E+04	
3	0.385	7.692	3.00E+05	3
4	0.307	7.692	9.30E+04	
5	0.321	7.692	1.00E+05	
6	0.321	7.692	2.70E+05	
7	0.321	7.692	8.90E+04	
PROMEDIO	0.328	7.692	1.646E+05	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.609$	No $P = 0.442$	No $P = 0.327$	

AISLADO EH-477	TASA CREC. Mm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0528	7.6925	3.30E+09	
MONOSPÓRICOS				
1	0.500	7.692	2.20E+08	
2	0.500	7.691	1.50E+09	
3	0.500	7.692	2.50E+08	
4	0.514	7.692	1.50E+09	
5	0.521	7.692	1.94E+09	5
6	0.514	7.692	1.40E+09	
7	0.528	7.692	2.10E+08	
8	0.514	7.692	1.50E+09	
9	0.514	7.692	1.60E+08	
10	0.528	7.692	3.10E+08	

PROMEDIO	0.515	7.692	1.93E+08
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.691$	No $P = 0.498$	No $P = 0.498$

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** 14 d = El ancho de los conidios fue de 2.564 μm en todos los cultivos originales y monospóricos

AISLADO EH-478	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** μm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.458	7.692	3.15E+08	

MONOSPÓRICOS

1	0.447	7.692	6.10E+08	1
2	0.464	7.692	5.80E+08	
3	0.458	5.128	2.85E+08	
4	0.458	7.692	5.90E+08	
5	0.458	7.692	5.10E+08	
6	0.458	7.692	1.25E+08	
7	0.458	7.692	3.10E+08	
8	0.447	7.692	2.50E+08	
PROMEDIO	0.456	7.400	3.96E+08	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.772$	No $P = 0.535$	No $P = 0.802$	

AISLADO EH-479	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** μm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
-------------------	----------------------	-----------------------------------	---------------------------	-----------------------------

CO* 0.514 6.41 1.60E+06

MONOSPÓRICOS

1	0.507	7.692	4.50E+06	2
2	0.507	7.692	6.20E+06	
3	0.507	7.692	5.80E+06	
4	0.50	7.692	5.60E+06	
5	0.507	7.692	6.10E+06	
6	0.507	7.692	3.40E+06	
7	0.500	7.692	4.40E+06	
8	0.521	7.692	2.60E+06	
9	0.521	7.692	3.10E+06	
10	0.514	7.692	2.90E+06	
PROMEDIO	0.509	7.57	4.20E+06	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.807$	No $P = 0.482$	No $P = 0.800$	

AISLADO EH-480	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** μm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
-------------------	----------------------	-----------------------------------	---------------------------	-----------------------------

CO* 0.514 7.692 6.45E+06

MONOSPÓRICOS

1	0.507	7.691	6.25E+06	8
2	0.507	7.692	7.00E+06	
3	0.500.	70692	7.30E+06	
4	0.500	7.692	6.60E+06	
5	0.507	7.692	2.90E+06	
6	0.507	7.692	4.00E+06	
7	0.500	7.692	2.25E+06	
8	0.520	7.692	8.70E+06	
9	0.500	7.692	3.10E+06	
10	0.507	7.692	7.30E+06	
PROMEDIO	0.506	7.692	5.62E+06	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No $P = 0.461$	No $P = 0.473$	No $P = 0.060$	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** = El ancho de los conidios fue de 2.564 μm en todos los cultivos originales y monospóricos

AISLADO EH-481	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** µm largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.564	7.692	5.90E+07	
MONOSPÓRICOS				
1	0.564	7.692	6.57E+07	1
2	0.550	7.692	6.00E+07	
3	0.564	7.692	9.00 E+06	
4	0.550	7.692	4.50E+07	
5	0.550	7.692	2.14 E+07	
PROMEDIO	0.557	7.692	4.33E+07	
ANOVA $\alpha < 0.01$	No P = 0.694	No P = 0.442	No P = 0.151	

20

AISLADO EH-482	TASA CREC. cm/día	CONIDIOS** m largo	PRODUCCIÓN Conidios/mL	MONOSPÓRICO SELECCIONADO
CO*	0.550	7.692	8.20E+06	
MONOSPÓRICOS				
1	0.557	7.692	8.50E+06	
2	0.550	7.692	3.500E+07	
3	0.557	7.692	2.15E+07	
4	0.550	7.692	2.85E+07	
5	0.564	5.128	3.00E+07	
6	0.542	7.692	2.85E+07	
7	0.542	7.692	9.00E+06	
8	0.550	7.692	3.80E+07	8
9	0.564	7.692	2.90E+07	
10	0.557	5.128	2.45E+07	
11	0.557	7.692	3.50E+07	
12	0.557	7.692	2.65E+07	
13	0.528	7.692	2.90E+07	
14	0.557	7.692	2.900E+07	
PROMEDIO	0.552	7.349	3.1800E+07	
ANOVA < 0.01	No P = 0.461	No P = 0.473	No P = 0.020	

CO* = Cultivo Original

CONIDIOS** = El ancho de los conidios fue de 2.564 µm en todos los cultivos originales y monospóricos

Anexo 2. Tasa de crecimiento a 15, 25, 30 y 35 °C de los cultivos y las especies tipo de *M. anisopliae* var. *anisopliae* en estudio.

Aislados y cepas de referencia	Tasa de crecimiento (cm/día) a 15 °C
EH-465*	1.34 ± 0.15
EH-466*	1.39 ± 0.02
EH-467*	1.32 ± 0.06
EH-468*	1.37 ± 0.08
EH-469*	1.00 ± 0.00
EH-470*	0.88 ± 0.03
EH-471*	1.01 ± 0.03
EH-472*	0.00 ± 0.00
EH-473*	0.78

		±
		0.00
	EH-474*	0.83
		±
		0.03
	EH-475*	0.78
		±
		0.00
	EH-476*	0.52
		±
		0.02
	EH-477*	0.57
		±
		0.00
	EH-478*	0.97
		±
		0.22
	EH-479*	1.12
		±
		0.03
	EH-480*	0.32
		±
		0.45
	EH-481*	0.00
		±
		0.00
	EH-482*	0.12
		±
		0.06
<hr/>		
	1941**	0.07
		±
		0.00
	1914**	1.00
		±
		0.00
	1184**	1.00

	±
	0.00
2037**	0.13
	±
	0.01
2948**	0.21
	±
	0.00
985**	0.48
	±
	0.01
FI-147**	0.94
	±
	0.08
FI-1029**	1.57
	±
	0.09
FI-698**	0.91
	±
	0.04
FI-987**	0.21
	±
	0.00
FI-72**	0.9
	±
	0.05

*Cultivo original (F = 61.370; g.l. = 17; P < 0.001), en letras iguales no hay diferencia significativa.
 **Cepa de referencia (F = 559.562; g.l. = 10; P < 0.001), en letras iguales no hay diferencia significativa.

Anexo 3. Matriz de presencia/ausencia en todos los aislados y especies tipo de *M.anisopliae*

OPA- 01	1	339	29	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	525	526	527	528	529	530	532	533	534	535	573	
307.5	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
418.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
455.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
467.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
492	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
529	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	
590.4	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
639.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
701.1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
707.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
762.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	
799.5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
811.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
947.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
984	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1266	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	
1353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
1660.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
1426	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1968	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4182	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

OPA - 04

258.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
307.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
313.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
405	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0		
455	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
467.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
492	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
528	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0		
615	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0		
639.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	
664.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
707.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
713	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
762.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
774	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
811.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
861	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
922.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
947.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
984	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
1119	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1131	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1137.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1180.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
1267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1408.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
4182	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

OPA - 05

246	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
295.2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
313.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
369	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

387.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
492	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
529	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
553.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
590.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
615	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
639.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
676	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
682.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
707.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
738	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
836	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
861	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
885.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
922.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
947.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
984	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
1107	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1180.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1230	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
1267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
1408.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1537.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1660.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1845	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2263.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
4182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0

OPA-08

270.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
326	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
369	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

387.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1			
510.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
615	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0		
664.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
738	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0		
762.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
811.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0		
830.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
861	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
922.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
947.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
984	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
1021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	
1107	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
1230	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	
1476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	
1722	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1894	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1968	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2091	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4182	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

OPA – 09

221.4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
295	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
307.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
332.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
369	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
393	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
479.7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
492	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

615	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
651.9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
682.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0		
725.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
738	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
768.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
799.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
830.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
836.4	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
861	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
885.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0		
953.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
1008.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
1033.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
1021	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	
1143.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1180.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	
1353	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
1402.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
1476	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
1549.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
1623.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1672.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1722	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
1845	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2127.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

OPA-10

344.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0		
369	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	
522.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
553.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
565.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
590.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

615	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
651.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
725	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
707.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
787.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
830	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
861	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
885.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
953.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
984	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1033.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1045.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
1180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1230	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1260.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1273	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
1316	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1402.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1623.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
1672.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2004.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

OPA - 16

246	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
270.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
369	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
442.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
455.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
559.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
578.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
615	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
762.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
811.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
836.4	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
861	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

904	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
922.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
953.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
984	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
996.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
1045.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0		
1107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1180.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0		
1230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1390	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1402.2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
1445.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1648.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

OPA-19

553	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1			
615	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
639.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
651.9	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
682.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
738	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	
762.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
811.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
861	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	
922.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0		
947.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
984	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
1107	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1180.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
1353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1660.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1722	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
2447.3	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4182 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0

OPH-01

282.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
313.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
319.8	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
387.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
455.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
492	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
510.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
615	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
664.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
682.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
733	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
738	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
762.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	
787.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
861	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
897	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
922.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	
947.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1070	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1537.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1722	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1845	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

OPH- 02

319	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
387.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
418.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

492	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
504	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1			
615	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0			
639.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
664	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0		
682.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
707.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
738	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
762.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
811.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
830.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
861	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
947.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
959	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
984	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
996.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	
1168	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2349	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

OPF- 08

387.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
492	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
553	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
590.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
615	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
639.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
701	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
762.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0

885.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
984	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
996.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
1107	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
1137.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
1230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
1310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1408.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1476	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1660.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
1758	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2091	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

11. Bibliografía

- AL-Aidroos K. 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Can J Genet Cytol 22: 309-314.
- Alves SB, Pereira RM, Lopes RB, Tamai MA. 2002. Use of entomopathogenic fungi Latin America. In: Upadhyay Ed. Advances in Microbiological Control of Insect Pests. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. pp.193-212.
- Ayala-Zermeño MA, Mier T, Sánchez RJ, Toriello C. 2005. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. Rev Mex Mic 20: 93-97.
- Basilio HD. 2004. Termotolerancia y producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en México. Tesis de licenciatura, UNAM. México.
- Berlanga-Padilla A, Hernández-Velázquez VM. 2000. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca picefrons picefrons*. MPI. 63: 51-55.
- Berreta MF, Lecuona RE, Zandomeni RO, Grau O. 1998. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent label. J Invertebr Pathol 71: 145-150.
- Bidochka MJ, McDonald MA, St. Leger RJ, Roberts DW. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Curr Genet 25: 107-113.
- Bidochka MJ, Kamp AM, Amritha De Croos JN. 2000. Insect pathogenic fungi: from genes to populations. In: Kronsia JW. (Eds.) Fungal Pathology. Kluwer Academic publishers, Netherland. pp.171-193.
- Bidochka MJ, Kamp AM, Lavender MT, Dekoning J, Amritha De Croos JN. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? Appl Environ Microbiol 67: 1335-1342.
- Bidochka, MJ. & Small CHL. 2005. Phylogeography of *Metarhizium* an Insect Pathogenic Fungus. In: Vega FE, Blackwell M. (Eds.). Insect-fungal Associations: Ecology and Evolution. Oxford University Press. pp. 28-50.

- Brand EM, Padhye AA, Mayer WL, Holloway PB. 1998. Utility of Random Amplified Polymorphic DNA PCR and TaqMan Automated Detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 36: 2057-2062.
- Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. Proc Natl Acad Sci USA 93: 770-773.
- Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001. Introduction-Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: Butt T M, Jackson C, Magan N (Eds.). Fungi as Biocontrol Agents. CAB International, Wallingford, UK. pp. 1-8.
- Cano RC, García GK, Hernández VM, Berlanga AM, C Toriello. 2002. Diferencia en la virulencia de cultivos monospóricos de aislados de México de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* en la langosta *Schistocerca gregaria*, p.407. In: Guzmán, Memorias del Congreso Latinoamericano de Micología. Mata G. (Eds.) Xalapa, Ver., mayo 13-17, 2002. México. Pp. 407.
- Cano RC. 2003. Caracterización genotípica de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* por medio de RAPD-PCR y determinación *in vitro* de su virulencia en langosta (Orthoptera: Acrididae). Tesis de maestría, UNAM. México.
- Cavallazi VG, Pérez-Mejía A, Berlanga-Padilla A, Hernández-Velázquez V, Toriello C. 2001. Selección de cultivos monospóricos aislados de *Paecilomyces fumosoroseus* con base en sus características fenotípicas. In: Memorias del XXIV Congreso Nacional de Control Biológico. Chihuahua, Chih., Agosto de 2001. pp. 109-112.
- Charnley AK. 1992. Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locust In: Lomer CT, Prior C (Eds.) Biological Control of Locust and Grasshoppers. CAB International, Redwood Press Ltd., Melksham, UK. pp. 191-190.
- Charnley AK, St. Leger RJ. 1991. The role of cuticle- degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole TG, Hoch CH. (Eds.). The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Press, New York. pp. 267-283.
- Clarkson JM. 1992. Molecular approaches to the study of entomopathogenic fungi. In: Lomer CJ, Prior C (Eds.). Biological Control of Locust and Grasshoppers. CAB International, Redwood Press Ltd, Melksham, UK pp. 191-199.

- Cobb BD, Clarkson JM. 1993. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. FEMS Microbiol Lett 112: 319-324.
- Coronado PR. 1978. Memoria de la campaña contra la mosca pinta. Dirección Gral. De Sanidad Vegetal SARH. Talleres gráficos de la Nación, México D.F.
- Cortéz-Madrugal H, Alatorre-Rosas R, Mora-Aguilera G, Bravo-Mojica H, Ortiz-García CF, Aceves-Navarro LA. 2003. Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. BioControl 48: 321-334.
- Deshpande MV. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. Crit Rev Microbiol 25: 229-243
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London. pp. 529-530.
- Driver F, Milner RJ, Trueman JWH. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol Res 104: 134-150.
- Fargues J, Maniania NK, Delmas JC, Smith N. 1992. Influence de la température sur la croissance in vitro d'Hyphomycetes entomopathogenes. Agronom 12: 557-564.
- Fegan M, Manners JM, Maclean DJ, Samuels KDZ, Holdon DG, Li DP. 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.
- Ferron P, Fargues J, Riba G. 1991. Fungi as Microbial Insecticides against Pests. In: Arora DK, Ajello L, Mukerji KG (Eds.) Handbook of Applied Mycology. Dekker, New. York. pp. 665-706.
- Flores CS. 1995. Las plagas de la caña de azúcar en México. Taller Servicios Gráficos, Córdoba, VZ, México.
- Glare TR, Milner RJ. 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. In: Arora DK, Ajello L, Mukerji KG (Eds.) Handbook of Applied Mycology. Dekker, New. York. pp. 547-612.
- Goettel MS, Inglis SD. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA. (Eds.). Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, USA. pp. 214-249.

- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. International Mycological Institute, Cab International, Cambridge.
- Hallsworth J E, Magan N. 1999. Water and temperature relations of growth of entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. J Invertebr Pathol. 74: 261-266.
- Hernández-Velázquez V M. 2001 Estrategia de Control Biológico de *Schistocerca picefrons* Walker In: Memoria de Taller Internacional de transferencia de tecnología en control microbiano de langosta *Schistocerca picefrons* Walker. SAGARPA. pp.16-23.
- Humber RA. 1997. Fungi-Identification. In: Lacey L. Manual of Techniques in Insect Pathology. (Ed.). Academic Press. London. pp. 153-185.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223-270.
- Joslyn DJ, Boucias DG. 1981. Isozyme differentiation among three pathotypes of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. Can J Microbiol 27: 364-366.
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vails P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biol Control 21: 230-248.
- Leal SCM, Bertioli DJ, Butt TM, Peberdy JF. 1994. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* by RAPD-PCR. Mycol Res 98: 1077-1081.
- Leal SCM, Bertioli DJ, Butt TM, Carder JH, Burrows PR, Peberdy JF. 1997. Amplification and restriction endonuclease digestion of the PR1 genes for the detection and characterization of *Metarhizium* strains. Mycol Res 101: 257-265.
- Lecuona ER, Alves S. 1995. Epizootiología. In: Lecuona PE (Ed.) Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. pp. 17-34.
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M. 2001. Biological Control of Locusts and Grasshoppers. Ann Rev Entomol 46: 667-702.
- Magalhães BP, Tigano MS, Martins I, Frazão H, Gómez RH. 2003. Characterization of a Peruvian Isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, a pathogen of grasshoppers. Pesq Agropec Bras 38: 1469-1475.

- Mavridou A, Typas MA. 1998. Intraespecific Polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. Mycol Res 102: 1233-1241.
- Messias CL, Azevedo JL. 1980. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. 75: 473-477.
- Navarro-Barranco H, Basilio HD, Hernández-Velázquez VM, Toriello C. 2002. Termotolerancia de aislados del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* In: Memorias del XIV Congreso Nacional de Control Biológico. Hermosillo, Son. Noviembre, 2002. pp. 218-220.
- Obornik M, Klič M, Žizka L. 2000. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. Can J Bot 78: 1150-1155.
- Otero AA, De la Cruz M, Oyama K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. Bol Soc Bot 60: 85-117.
- Ouedrago A, Fargues J, Goettel MS, Lomer CJ. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Mycopathologia 137: 37-43.
- Pantou MP, Mavridou A, Typas A. 2003. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. Fung Genet Biol 38: 159-174.
- Pontecorvo G, Roper JA, MacDonald, Bufton AWJ. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv Genet 5: 141-238.
- Rath AC, Carr CJ, Graham BR. 1995. Characterization of *Metarhizium anisopliae* starins by carbohydrate utilization (AP150CH). J Invertebrate Pathol 65: 152-161
- Rakotonirainy MS, Cariou ML, Brygoo Y, Riba G. 1994. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isoenzymes comparison. Mycol Res 98: 225-230.
- Real R, Vargas JM. 1996. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. Syst Biol 45: 380-385.
- Rholf F 1993. NTSYS-pc v 1.8 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Applied Biostatistics. Setuket, New York.

- Riba G, Bouvier-Fourcade I, Caudal A. 1986. Isoenzyme polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. Mycopathol 96: 161-169.
- Riba G, Ravelojoana MA. 1984. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) Brown & Smith. Can J Microbiol 30: 922-926.
- Rombach MC, Humber RA, Roberts DW. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. *minus*, var. *nov.*, a pathogen of plant leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Island. Mycotaxon 27: 87-92.
- Rombach MC, Humber RA, Evans HC. 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers. Trans Brit Mycol Soc 88: 451-459
- Samson RA, Evans HC, Latgé JP. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, The Netherlands.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973. Taxonomic Structure. In: Freeman WH (Ed.) Numerical Taxonomy. San Francisco. pp. 188-305.
- St. Leger R, Allee LL, Staples RC, Roberts DW. 1992. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. Mycol Res 96: 1007-1015.
- St. Leger RL. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. Can J Bot 73 (Suppl. 1):S1119-S1125.
- St Leger R, Roberts DW. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. Mol Mycol Center. 15: 83-85.
- Thomas MB, Jenkins NE. 1997. Effect of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegates*. Mycol Res 101: 1469-1474.
- Tigano-Milani MS, Honeycutt R, Lacey L, Assis R, McClelland M, Sobral. B. 1995. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. J Invertebr Pathol 65: 274-282.
- Tigano M.S, Aljanabi S. 2000. RAPD Analysis of *Nomuraea rileyi*. J Invertebr Pathol 75: 240-242.
- Toriello C, Navarro-Barranco H, Martínez-Jacobo A, Mier T. 1999. Seguridad en ratones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin aislado de *Aeneolamia* sp. (Homoptera: Cercopidae) en México. Rev Mex Mic 15: 123-125.

- Toriello C, Pérez-Torres A, Burciaga-Díaz A, Navarro-Barranco H, Pérez-Mejía A, Lorenzana-Jiménez M, Mier T. 2005. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicol Environ Saf* (In press).
- Tulloch M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Trans Brit Mycol Soc* 66: 407-411.
- Valadares-Inglis MC, Azevedo JL. 1997. Amylase and protease secretion in recombinant strains of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* following parasexual crosses. *Braz J Genet* 2: 171-175.
- Williams GKJ, Kubelik RA, Livak JK, Rafalski AJ, Tingey VS. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6135.
- Yip HY, Rath AC, Koen TB. 1992. Characterization of *Metarhizium anisopliae* from Tasmania pasture soils and pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). *Mycol Res* 96: 92-96.
- Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pestic Sci* 37: 375-379.