

Detección de fragmentos de ADN de hongos y su posible relación con la síntesis de proteínas de actividad entomopatógena

Detection of Fungi DNA fragments and their possible relation with entomopathogenic protein synthesis activity

K. Zambrano Bullones¹, M. Dávila¹ y M. A. Castillo²

Resumen

Beauveria bassiana, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* son hongos con la capacidad de causar enfermedad en larvas de *Diatraea saccharalis*. Como tal, tienen un gran potencial como controladores biológicos siempre que se logre masificar aislamientos específicos, virulentos y eficientes. Esto se puede conseguir a través de la transformación genética, que ya esto es posible para algunas características de interés de los mismos. En esta investigación a través de un análisis de perfiles de amplificación de segmentos de ADN de los tres hongos entomopatógenos aislados del insecto y utilizando la técnica de RAPD se consiguieron los fragmentos OPD-13₁₅₅₀, OPD-16₉₅₀, OPD-16₇₀₀, OPE-04₂₀₀₀, OPE-04₁₄₀₀, OPE-04₈₅₀, OPE-05₉₀₀, OPE-05₆₅₀, OPE-07₇₅₀, OPE-08₆₅₀, OPE-10₅₀₀, OPE-11₁₃₀₀, OPE-11₁₁₀₀, OPE-11₅₅₀, OPE-11₄₈₀, OPE-12₁₄₀₀, OPE-12₆₅₀, OPE-18₁₃₀₀, OPE-18₅₀₀, OPE-20₁₀₀₀, OPE-20₆₀₀ y OPE-20₄₅₀ comunes a los tres materiales biológicos, los cuales representan marcadores moleculares de utilidad para detectar secuencias de genes que contribuyen a la capacidad de causar enfermedad de estas especies. Estos resultados sugieren que la técnica RAPD podría ser de gran utilidad para el conocimiento de la secuencia que codifica para esta característica.

Palabras clave: entomopatógenos, caña de azúcar, *Diatraea*, RAPD.

Abstract

Beauveria bassiana, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* are fungi with great potential for causing disease in *Diatraea saccharalis* larva. As such, they have great potential as biological controllers as long as specific isolates with high virulence capacity and efficiency can be produced in large quantities. This task can be achieved through genetic transformation which is

Recibido el 9-1-2001 • Aceptado el 17-4-2002

1. Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado

2. Decanato de Medicina. Apartado 400. Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela e-mail: martha@sihca.zzn.com

possible today for some of the more interesting characteristics. In this research, utilizing the RAPD technique, through an analysis of amplification profiles of DNA segments from three entomo-pathogenic fungi isolated from the insect, fragments of OPD-13_{1550'}, OPD-16_{950'}, OPD-16_{700'}, OPE-04_{2000'}, OPE-04_{1400'}, OPE-04_{850'}, OPE-05_{900'}, OPE-05_{650'}, OPE-07_{750'}, OPE-08_{650'}, OPE-10_{500'}, OPE-11_{1300'}, OPE-11_{1100'}, OPE-11_{550'}, OPE-11_{480'}, OPE-12_{1400'}, OPE-12_{650'}, OPE-18_{1300'}, OPE-18_{500'}, OPE-20_{1000'}, OPE-20_{600'} y OPE-20_{450'} were found to be common to the three biological materials, which represent molecular markers of great utility to detect gene sequences that could confer to these fungi the capacity of causing disease in these species. These results suggest that this RAPD technique could be very useful in producing knowledge as to the codifying sequence for this characteristic.

Key words: Entomo-pathogens, sugarcane, *Diatraea*, RAPD.

Introducción

Las enfermedades de hongos en los insectos son comunes y frecuentemente diezman poblaciones completas. Los hongos entomopatógenos están asociados con insectos que habitan diversos ambientes, incluyendo ecosistemas agrícolas, forestales y pastoriles, así como en aguas dulces, suelos y aire (10).

En la actualidad la preocupación de conservar el medio y evitar al máximo los riesgos de salud asociados con el uso de insecticidas químicos ha estimulado los esfuerzos por desarrollar agentes de control biológico como alternativa o suplementos al uso de químicos. En consecuencia, el desarrollo de micoinsecticidas ha tenido una gran aceptación, con lo cual, ha habido un gran auge en su comercialización (25). Para desarrollar hongos con este fin, es preciso conocer las características del sistema patógeno-hospedero (1).

El control microbiano es parte del control biológico y actualmente ambos son elementos importantes en el nuevo

sistema de controlar las plagas, el cual es denominado Manejo Integrado de Plagas (MIP) ó Producción Integrada (PI) y se ha convertido en un componente fundamental de las iniciativas de la agricultura sostenible (4). El comportamiento o potencialidad para “matar plagas” por parte de los microorganismos entomopatógenos, llamado comúnmente virulencia, está determinado por las características genéticas del individuo (3).

Los hongos entomopatógenos presentan variaciones genéticas debido a su característica de parasexualidad. Los análisis moleculares del ADN permiten detectar las variaciones entre los aislamientos, por ejemplo razas o patotipos diferentes (15). La importancia de estos estudios radica en la exactitud de las identificaciones, permitiendo a la industria de bioplaguicidas contar con aislamientos más puros haciendo así más eficiente el proceso.

El control biológico se vislumbra como una de las estrategias más prometedoras dentro del marco del manejo

integrado de las enfermedades que afectan la producción de nuestros cultivos. El antagonismo microbiano, la resistencia inducida en plantas, la protección cruzada, el uso de cepas hipovirulentas, el uso de plantas con propiedades antagonistas y el desarrollo de plantas transgénicas son estrategias de control biológico que en un futuro no muy lejano serán de aplicación práctica (25).

El combate biológico basado en los enemigos naturales de *D. sacharalis* es el método más reciente que se ha utilizado para contrarrestar los daños ocasionados en el cultivo de la caña de azúcar (14). Se ha reportado que los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. Fumoso roseus* pueden causar hasta un 95% de mortalidad en larvas invernantes del insecto (2).

La posibilidad de mejorar genéticamente a los hongos entomopatógenos por los métodos tradicionales está limitada por el hecho de que muchos de ellos carecen de una fase sexual. La recombinación parasexual, la hibridación somática y la ingeniería genética constituyen métodos alternativos para vencer este problema. Los estudios de los mecanismos moleculares de la infección y de la producción de toxinas están avanzando rápidamente y ya se han desarrollado sistemas para la obtención de hongos transgénicos. Lo anterior abre la posibilidad de aumentar la efectividad de los hongos entomopatógenos mediante la manipulación de los genes involucrados en el reconocimiento del huésped, la adhesión, la actividad enzimática y la producción de toxinas, entre otros (14, 19).

El uso de los nuevos marcadores bioquímicos y moleculares disponibles han facilitado estudios acerca de algunas estructuras de las especies y de la

distribución geográfica. Por ejemplo, recientemente, con el uso de isoenzimas se determinó la distancia genética entre grupos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, indicando que cada uno representa un agregado de especies (10).

Los marcadores moleculares RAPD (24) han revolucionado el análisis genético y la caracterización de genomas (5, 7, 8, 23). Uno de los atractivos de esta técnica es que proporciona información en un corto período de tiempo relativamente a bajo costo, no requiere sondas de ADN o información de la secuencia del iniciador, resultando ser un punto de partida relativamente sencillo y económico para emprender estudios de mayor envergadura.

La gran mayoría de las investigaciones sobre hongos entomopatógenos basadas en estudios de ADN han sido aplicadas a la identificación de cepas y especies de gran importancia para las biofabricas, estudios de campo y de significancia ecológica. Sin embargo, las investigaciones relacionadas con la patogenicidad, como el entendimiento del modo de acción del entomopatógeno y su uso, son los estudios que proporcionarían agentes de biocontrol con una eficiencia mejorada en cuanto al rango de hospederos, agresividad, tolerancias climáticas, entre otros obteniéndose de esta forma, nuevas oportunidades y un "nuevo y brillante futuro para los hongos entomopatógenos" en el control de plagas generado por la biotecnología (16)

En esta investigación, se planteó como objetivo la detección por comparación mediante la técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ó amplificación al azar de

fragmentos polimórficos de ADN) de los fragmentos de ADN de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* (Bals), *M. anisopliae* (Metcht) Sor. y *P. fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith

aislados de larvas del insecto *D. saccharalis* F., como indicadores de bandas de ADN posiblemente relacionadas con la patogenicidad de estos hongos.

Materiales y métodos

Las especies *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus* utilizadas para generar las poblaciones se obtuvieron del Laboratorio PROBIOAGRO, Estado Portuguesa, Venezuela, donde se producen de la siguiente manera: obtención de insectos del campo, infectados por los hongos en estudio, aislamiento en medios de PDA (papa, dextrosa, agar), pH 7,0, purificación de los aislamientos en PDA + antibióticos, mantenimiento en PDA o silicagel a 4°C, activación y reaislamiento de los hongos del insecto hospedero.

Las larvas del insecto *D. saccharalis* se obtuvieron del laboratorio de Servicios Biológicos (SERBIO), Estado Yaracuy, Venezuela, donde se mantienen en crecimiento con dietas artificiales. Se preparó una suspensión de conidios de los hongos (individualmente) reactivados en *Diatraea* a la concentración de 1×10^7 conidios por mililitro. El hospedero desinfectado (larvas) se sumergió en esta solución por diez segundos, luego se colocó en cajas de petri con papel húmedo individualmente a temperaturas de 25°C por tres días.

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizaron micelios, obtenidos del crecimiento de esporas y micelios en Caldo Sabouraud Dextrose (SDB+Y) modificado (Bactopeptona 10 g L⁻¹, Dextrosa 40 g L⁻¹, Extracto de levadura

5 g L⁻¹, pH 7,5) (2) colocados en baño de María con agitación a 27 °C por 24 – 48 horas. Pasado este tiempo, el contenido de cada tubo de ensayo se colocó en tubos eppendorf y se centrifugó 5 min a 10000 rpm, para separar los micelios del medio. Por último, los micelios obtenidos se lavaron con agua destilada para eliminar los restos del medio. A partir de los micelios obtenidos se procedió a realizar la extracción del ADN genómico total, siguiendo el protocolo descrito en Skroch y Nienhuis (18). De 100 a 200 mg de tejido seco se incubaron por 1 h a 60 °C en 1000 ml de buffer de extracción (NaCl 0,7M, 0,1M buffers Tris pH 7,5; 0,01M EDTA pH 8, BME 1 % y CTAB= bromuro de alkyltrimetil-amonio 1 %, Sigma) más 0,1 % de β-mercaptoethanol (βME), agitando moderadamente cada 5-10 min. Después de la incubación, a cada muestra se le adicionó 200 ml de NaAc 3 M, se colocó a -20 °C durante 20 min para luego ser centrifugada por 10 min a 10000 rpm. Para la precipitación del ADN se tomó 750 ml del sobrenadante y se colocó en tubos eppendorf nuevos. A este sobrenadante se le adicionó 2 ml de ARNasaA + 8 ml de su respectivo buffer y se dejó a 37 °C por 30 min. El sobrenadante se precipitó con 750 ml de isopropanol enfriado a -20°C por 20 min. Después de una centrifugación por 20 min a 14000 rpm el precipitado se lavó 3 veces con etanol 70 %, se dejó secar

a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 ml de buffer TE 1X (1 mM tris, 0,1 mM EDTA). La solución de ADN se guardó a -20°C.

Luego de este procedimiento, la muestra de ADN se sometió a una digestión con la enzima de restricción EcoR I. A 5 ml del ADN, se añadió 1 ml de la enzima, 5 ml de buffer H 10X y se llevó a un volumen final de 50 ml con agua destilada estéril. Se colocó en incubación a 37 °C durante toda la noche y por último 10 min a 65 °C (17)

Amplificación del ADN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR system 2400. La mezcla final de 10 ml consistió de 2 ml de cada muestra de ADN mas 8 ml de una mezcla de reacción (0,1mM DNTP; 0,5 unidades de Taq polimerasa (Promega); 0,4 mM de iniciador (primer), 1X de buffer de reacción, 2 mM MgCl₂, 50 mM tris pH 8,5; 20 mM KCl y 0,5 mg ml⁻¹ seroalbúmina bovina). La amplificación se dividió en dos pasos, para los dos primeros ciclos el perfil térmico fue de 1 min. a 90° C, 7 s a 36° C y de 70 s a 72° C. Seguidamente 40 ciclos adicionales se llevaron a cabo con desnaturalización por 1 s a 92° C,

alineación a 36° C por 7 s y elongación a 72° C por 70 s. Luego de estos 42 ciclos se mantuvo constante la temperatura a 72° C por 4 min.

Para la amplificación se utilizó en la mezcla de reacción los iniciadores o primers de Operon Technology, serie E (OPE-01 – OPE-20) y serie D (OPD-01 – OPD-20). Como patrón de peso molecular de 100 pares de base, se utilizó el ADN del fago I digerido con la enzima de restricción Hind III.

Electroforesis en agarosa

Cada muestra se analizó por electroforesis en geles compuestos de 1,0 % (p/v) de agarosa ultrapura disuelta en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA 0,5M pH 8), a 80 voltios y sometido luego a tinción con bromuro de etidio (de una solución stock al 1%), para ser observado a través de un trasiluminador de luz ultravioleta (22).

Nomenclatura de los marcadores RAPD

El tamaño del marcador RAPD se determinó por comparación a la banda más próxima de 50 pares de base (pb) del marcador 1 . A cada marcador RAPD se le denominó por las letras y el número que lo identifica en el kit de Operon Technologies y la longitud aproximada (pb) en subíndice (12).

Resultados y discusión

Doce de los iniciadores probados produjeron bandas comunes en las tres especies estudiadas (cuadro 1). Resultando ser de alta eficiencia los iniciadores OPE-11 y OPE-20 en relación al número de bandas amplificadas comunes a los tres hongos. Sólo se detectó una

amplificación común con los iniciadores OPD-13, OPE-07, OPE-08, OPE-10 y el resto de ellos amplificaron dos o tres regiones comunes para *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus*.

El iniciador OPE-10 (con la secuencia 5' CACCAGGTGA 3') produjo un patrón de amplificación que fue

Cuadro 1. Bandas Comunes Amplificadas entre *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus*

| Iniciador | Peso (Pares de Bases) |
|-----------|-----------------------|
| OPD-13 | 1550 |
| OPD-16 | 950 |
| OPD-16 | 700 |
| OPE-04 | 2000 |
| OPE-04 | 1400 |
| OPE-04 | 850 |
| OPE-05 | 900 |
| OPE-05 | 650 |
| OPE-07 | 750 |
| OPE-08 | 650 |
| OPE-10 | 500 |
| OPE-11 | 1300 |
| OPE-11 | 1100 |
| OPE-11 | 550 |
| OPE-11 | 480 |
| OPE-12 | 1400 |
| OPE-12 | 650 |
| OPE-18 | 1300 |
| OPE-18 | 500 |
| OPE-20 | 1000 |
| OPE-20 | 600 |
| OPE-20 | 1600 |
| OPE-20 | 600 |
| OPE-20 | 450 |

constante entre el ADN de los materiales estudiados. Una banda de amplificación de 500 pares de base fue obtenida del ADN de cada hongo (figura 1).

En otros sistemas de patógeno-hospedero, se han utilizados los marcadores RAPD como base para el diseño de otros tipos de marcadores mas específicos y altamente reproducibles como los denominados SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (9, 13). Diah *et al.* (6) realizaron un mapa de ligamiento para los genes de avirulencia

en *Megaporthe grisea*, hongo fitopatógeno en arroz utilizando marcadores RFLP y RAPD. De los marcadores RAPD identificados, el OPE-10 resultó ser una secuencia de copia única ligado estrechamente al gen de avirulencia AVR 1-Ku 86 cerca del extremo del cromosoma 1.

Con el estudio de poblaciones se ha concluido que la intensidad del fragmento del ADN amplificado puede ser distinguida parcialmente entre individuos homocigóticos y heterocigóticos, sugiriendo que puede ser aproximadamente la

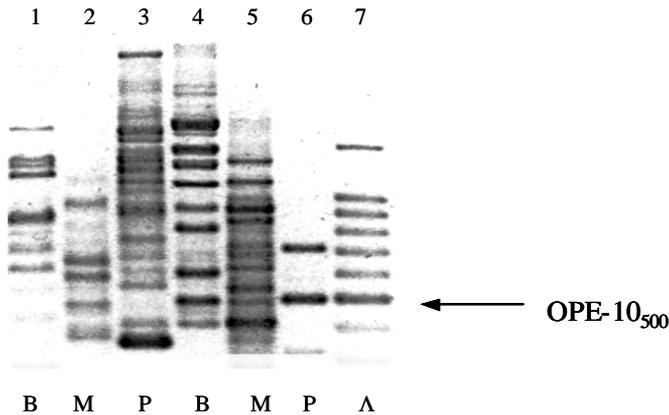


Figura 1. Productos de amplificación obtenidos usando la técnica RAPD en ADN digerido con la enzima Ecor I. Iniciadores OPE-09 (líneas 1 a 3), OPE-10 (líneas 4 a 6), Marcador de Peso Molecular \bar{e} (línea 7). Se indica el marcador OPE-10₅₀₀. B = *B. bassiana*, M = *M. anisopliae*, P = *P. Fumosoroseus*

mitad en individuos heterocigóticos comparados con los individuos homocigóticos. Más aún, es un hecho conocido que la estructura genética del material puede llevarnos a errores debido a la competencia y a la pobre reproducibilidad (11).

Los marcadores moleculares determinados en este estudio podrían ser igualmente útiles para otros sistemas plaga-patógeno, donde los agentes entomopatógenos sean *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus*. Tal es el caso de *Plutella xylostella* (Lepidoptero: Plutellidae) de la cual se ha aislado estos tres hongos (21).

En la actualidad, existe un banco de

diversos genes aislados de *Metarhizium* spp., muchos de los cuales codifican para potenciar y crear un agente insecticida selectivo. Los mismos están siendo usados para mejorar la patogenicidad de entomopatógenos y para otras aplicaciones de biotecnología, como por ejemplo la resistencia a insectos en plantas (20). St. Leger y Screen (19, 20) emplearon diversos genes de patogenicidad para generar productos comerciales de hongos mejorados genéticamente para el control de insectos plagas. Estos genes también se emplean para producir virus recombinantes y plantas, para incorporarlos en el manejo integrado de plagas (MIP).

Conclusiones y recomendaciones

En el estudio de los perfiles de los productos de la amplificación se detectaron bandas de igual peso mo-

lecular comunes a los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus*. Estos

fragmentos RAPD posiblemente representan segmentos homólogos o secuencias idénticas de algunas regiones del ADN de cada muestra. Estas bandas presentan un potencial para ser utilizadas como indicadores de la capacidad de virulencia de los hongos estudiados sobre las larvas del insecto *D. saccharalis*. Los marcadores moleculares detectados en este estudio deben ser aislados a partir del gel, para ser secuenciados mediante otras técnicas a fin de determinar si los fragmentos identificados están asociados a la virulencia. Con el conocimiento de la secuencia de estos genes se podría contribuir con la

protección de cultivos susceptibles a plagas agrícolas principalmente en lo que respecta a la determinación de cepas u obtención de aislamientos específicos y eficientes de hongos. Igualmente, pueden servir para asegurar la calidad al momento de masificar un agente de biocontrol viable.

Estudios más específicos de características genéticas deben ser llevados a cabo para precisar la utilidad de los marcadores RAPD. Se hace necesario en este sentido proceder a clonar y secuenciar las bandas detectadas para luego realizar hibridaciones específicas.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con el financiamiento del CDCHT-UCLA. Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. Artióm

Carmona, a SERBIO y PROBIOAGRO por su colaboración para la realización de este trabajo.

Literatura citada

1. Alatorre, R. 1999. Hongos Entomopatógenos. In: X Curso Nacional de Control Biológico. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. p. 137-146.
2. Alves, S. 1986. Controle Microbiano de Insectos. Sao Paulo. Brasil. Edit. Manole. 407 p.
3. Burges, H. D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides. Klumer Academic Publ. London. 458 p.
4. Cruz, C. 2000. Control Biológico de Plagas en la Zona del Caribe. [On-line]. Disponible en: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/cruzspan.htm>.
5. Davila, M. 1997. RAPD Molecular Markers for the Genes Controlling Seedling Lethality and Plant Crippling in Common Beans. PhD Thesis. UNL. USA. 90 p.
6. Dioh, W., D. Tharreau, J. Notteghem, M. Orbach y M. Lebrum. 1999. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 217-227.
7. Gemas, V. J., M. J. Rijo-Johansen, R. Tenreiro y P. Fevereiro. 2000. Inter and Intra-varietal analysis of three *Olea europea* L. cultivars using the RAPD technique. J. Horticultural Science and Biotechnology 75: 312-319.
8. Gwanama, C., M. T. Labuschagne y A. M. Botha. 2000. Analysis of genetic variation in *Cucurbita moschata* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 113: 19-24.

9. Haymes, K. M., W. E. Van de Weg, J. L. Maas y B. Vosman. 2000. Development of SCAR Markers linked to a Phytophthora fragariae Resistanse Gene and their assessment in European and North American Strawberry Genotypes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125: 330-339.
10. Hajek, A. y R., St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.
11. Hallden, C., M. Hansen, N. Nilsson, A. Hjerdin y T. Sall. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 93:1185-1192.
12. Jung, G., D. P. Coyne, P. W. Skroch, J. Nienhuis, E. Arnaud, J. Bokosi, H. M. Ariyaratne, J. R. Steadman, J. S. Beaver y S. M. Kaeppler. 1996. Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight and rust in common beans. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:794-803.
13. Paran, I. y R. W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85: 985-993.
14. Papavizas, G. C. 1987. Genetic Manipulation to Improve the Effectiveness of Biocontrol Fungi for Plant Disease Control. In: Chet I (ed), Innovak Approaches to Plant Disease Control. John Wiley & Sons. New York. p193-212.
15. Riba, G. y Silvy, C. 1989. Combattre les ravageurs des cultures, enjeux et perspectives. INRA. PARIS. p. 126-130.
16. Roberts, D. 1999. Will Biotechnology Provide a Bright, New Future for Fungi as Biological Control Agents. Abstracts. Society for Invertebrate Pathology 32th Annual Meeting. University of California at Irvine. p. 66.
17. Sambrook, J., E. Fritsh y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor. N.Y. Vol. 1.
18. Skroch, P. y J. Nienhuis. 1995. Qualitative and Quantitative Characterization of RAPD Variation Among Snap Bean (*Phaseolus vulgaris*) Genotypes. Theor. Appl. Genet. 91: 1078-1085.
19. St. Leger, R. y S. Screen, 1999. Insect Pathogenic Fungi as a Resource of Genes for Biotechnology. In: Society for Invertebrate Pathology 32th Annual Meeting. University of California at Irvine. p. 72.
20. St. Leger, R. y S. Screen. 1999. Isolation of Pathogenicity Related Genes by EST Analysis of the Insect Pathogenic Fungus *Metarhizium* spp. In: Society for Invertebrate Pathology 32th Annual Meeting. University of California at Irvine. p 68.
21. Vega, F., G. Mercadier y M. Jackson. 1999. Insect Pathology at USDA's European Biological Control Laboratory. Abstracts. Society of Invertebrate Pathology 32th Annual Meeting. University of California at Irvine. p 77.
22. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff y W. Meyer. 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. Florida. USA. p. 9-209.
23. Whisson, S. C., A. Drenth, D. J. Maclean y J. A. G. Irwin. 1995. Phytophthora sojae avirulence genes, RAPD, and RFLP markers used to construct a detailed genetic linkage map. Molecular and Plant Microbe Interactions 8: 988-995.
24. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski y S. S. Tingey. 1990: DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.
25. Zavaleta, E. 1999. Control Biológico de Fitopatógenos. En: X Curso Nacional de Control Biológico. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. p. 162-163.