

# Caracterización molecular de aislados de *sclerotium cepivorum* mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar

Francisco  
Luna Martínez,  
Alberto  
Flores Martínez  
Patricia  
Ponce Noyola

## INTRODUCCIÓN

PUDRICIÓN BLANCA. Una de las enfermedades fúngicas más importantes, extendidas y destructivas de las especies del género *Allium* es la pudrición blanca. Ésta se propaga de manera rápida atacando plantas en cualquier suelo donde los cultivos estén en periodo de crecimiento y con igual magnitud en el desarrollo de la parte de la planta hospedera durante la temporada fría, la cual conduce al desarrollo y reproducción del patógeno *Sclerotium cepivorum*;<sup>2,3</sup> bajo estas condiciones, esta enfermedad se vuelve la mayor limitante en la producción de los cultivos de *Allium*.<sup>4</sup> A la fecha no se ha reportado la existencia de especies del género *Allium* resistentes a la infección por *S. cepivorum*.

Los síntomas iniciales que presenta la planta afectada por la pudrición blanca se caracterizan por una clorosis, seguida por el marchitamiento y caída de las hojas inferiores. Al arrancar una planta puede observarse que la base de las hojas, el bulbo y las raíces están necróticas y cubiertas por una pelusa blanca (micelio). También se pueden observar pequeñas manchas negras, debido a que el micelio tiende a formar esclerocios (formas de resistencia y de reproducción asexual del hongo), cuyos cuerpos son pequeños, esféricos y de color oscuro por la presencia de melanina.<sup>5</sup>

Los esclerocios de *S. cepivorum* pueden sobrevivir por más de 20 años en el suelo aun en la ausencia de la planta huésped y pueden diseminarse de un campo a otro por equipo contaminado o por el uso de semillas (dientes de ajo) contaminadas con el patógeno. Su germinación es estimulada a bajas temperaturas, tornándose óptima entre los 14-18°C y terminando abruptamente alrededor de los 24°C.<sup>6</sup>

*S. cepivorum* es un hongo fitopatógeno clasificado como un deuteromiceto ya que no se conoce su ciclo de vida sexual ni si produce esporas funcionales; se ha sugerido que es un ascomiceto ya que se ha reportado la formación de microconidias de 1.6 a 3.4 mm cuando se crece sobre agar agua.<sup>7</sup>

POLIMORFISMO DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD). El desarrollo de marcadores moleculares ha permiti-

TABLA 1. INICIADORES EMPLEADOS EN REACCIONES TIPO RAPD

INICIADOR	SECUENCIA (5' - 3')
OPA02	TGCCGAGCTG
OPA03	AGTCAGCCAC
OPA13	CAGCACCCAC
OPB10	CTGCTGGGAC
OPE14	TGCGGCTGAG
OPG02	GGCACTGAGG
OPG10	AGGGCCGTCT
OPH03	AGACGTCCAC
OPH18	GAATCGGCCA
OPH19	CTGACCAGCC
OPJ20	AAGCGGCCTC

ción de bases, inserciones, deleciones y translocaciones.<sup>8</sup> La tecnología molecular ha permitido la detección de esos polimorfismos, con lo que se puede hacer una eficiente discriminación entre individuos.<sup>9,10,11</sup> Muchos hongos filamentosos tienen pocos marcadores fenotípicos que pueden ser usados para diferenciar entre individuos en una población, esto limita el estudio sobre la biología de poblaciones en estos organismos. Los marcadores fenotípicos han sido útiles para diferenciar ciertos grupos entre algunas especies, pero no tienen suficiente resolución para distinguir entre individuos de una misma especie. La actual disposición de marcadores genéticos basados en diferencias en la secuencia de DNA ha hecho posible y práctico llevar a cabo estudios básicos de población y de biología evolutiva en hongos.<sup>8</sup>

Williams y cols.<sup>11</sup> escribieron un ensayo de polimorfismos de DNA de hongos en general, basado en la amplificación al azar de fragmentos de DNA con iniciadores de tamaño pequeño y de secuencia arbitraria. Dichos polimorfismos pueden ser usados para construir mapas genéticos de gran variedad de especies. Ellos sugieren que dichos polimorfismos sean llamados marcadores de Polimorfismo de Fragmentos Amplificados al Azar: RAPD (del inglés: *Random Amplified Polymorphic DNA*). La característica "al azar" de RAPD se refiere al iniciador cuya secuencia es arbitraria. En el RAPD, los iniciadores se alinean a su secuencia complementaria a lo largo de todo el genoma durante la reacción y por ello se requieren bajas temperaturas de alineación, generalmente de 30 a 37°C. Los RAPDs han sido empleados para diferenciar algunas cepas de la misma especie en plantas, bacterias, animales y hongos.<sup>11</sup>

La variación en la efectividad de las prácticas de control de la pudrición blanca puede estar asociada con la variabilidad genética de *S. cepivorum*.<sup>8</sup>

Existen algunos antecedentes en torno a la variabilidad genética de *S. cepivorum* empleando la técnica de RAPD. Márquez-



© Patricia Lagarde, de la serie *Herbolaria*.

do una intensa investigación y la caracterización genética en hongos. La ventaja de los marcadores moleculares es que permiten utilizar información sobre eventos naturales y mutaciones fenotípicamente neutrales dentro de las poblaciones. La mayoría de las poblaciones tiene relativamente altas frecuencias de polimorfismos debidos a pequeños cambios en el DNA, gracias a mutaciones puntuales tales como sustitui-

TABLA 2. CLAVE, NOMBRE Y ORIGEN DE LOS AISLADOS Y CEPAS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO.

1	FD1	GTO	20	FD27	GTO	39	AC1	AGS
2	FD2	GTO	21	FD28	GTO	40	AC2	AGS
3	FD4	GTO	22	FD31	GTO	41	AC6	AGS
4	FD5	GTO	23	FD32	GTO	42	AC8	AGS
5	FD6	GTO	24	FD34	GTO	43	FAZ1	ZAC
6	FD8	GTO	25	FD42	GTO	44	FAZ2	ZAC
7	FD11	GTO	26	M1A	GTO	45	FAZ3	ZAC
8	FD12	GTO	27	M2A	GTO	46	FAZ4	ZAC
9	FD14	GTO	28	C2	GTO	47	FAZ5	ZAC
10	FD15	GTO	29	SC	GTO	48	2FD30E	Inglaterra
11	FD16	GTO	30	INI1	AGS	49	MCG1	Canadá
12	FD17	GTO	31	INI2	AGS	50	MCG2	Canadá
13	FD18	GTO	32	INI4	AGS	51	MCG3	Canadá
14	FD19	GTO	33	INI5	AGS	52	MCG4	Canadá
15	FD20	GTO	34	INI6	AGS	53	MCG5	Canadá
16	FD21	GTO	35	INI7	AGS	54	MCG6	Canadá
17	FD22	GTO	36	INI8	AGS	55	<i>Sclerotium rolfsii</i>	CINVESTAV
18	FD23	GTO	37	INI9	AGS	56	<i>Rhizoctonia solani</i>	CINVESTAV
19	FD24	GTO	38	INI10	AGS	57	<i>Botrytis cinerea</i>	CINVESTAV
						58	<i>Macrophomina phaseolina</i>	CINVESTAV

Lona,<sup>12</sup> empleando 20 aislados de *S. cepivorum* provenientes de Celaya, Gto. probó 200 iniciadores (Operon Technologies, Inc) de los cuales propone 12 para realizar el análisis RAPD con este fitopatógeno (tabla1). Asimismo, Pérez-Moreno<sup>13</sup> en un total de 31 aislados de *S. cepivorum*, probó 30 iniciadores (BioSynthesis, Inc.) y con cinco de ellos encontró amplificación al realizar RAPDS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

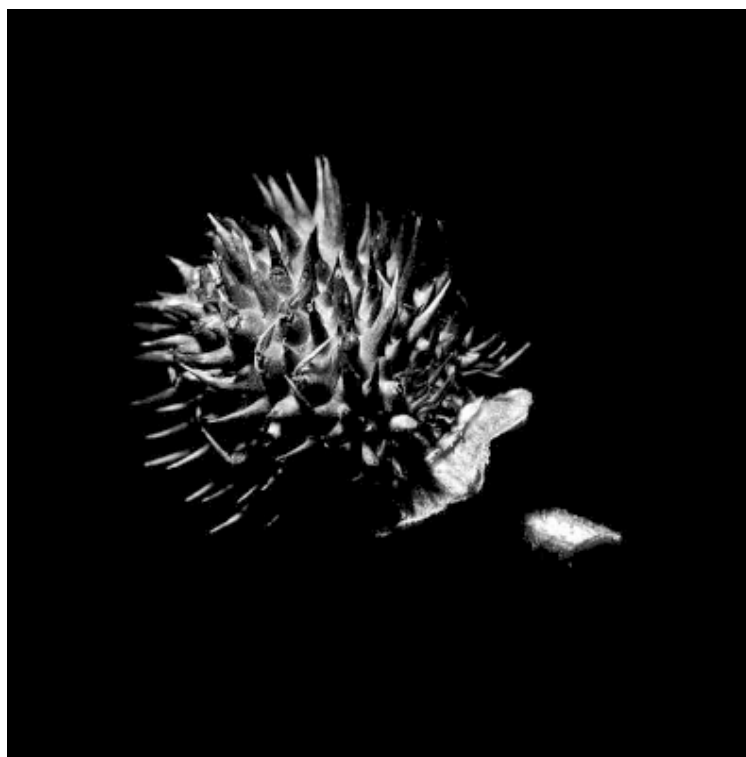
**AISLADOS Y CEPAS EMPLEADOS.** La lista de aislados y cepas que fueron empleados en este estudio (tabla 2) puede dividirse de la siguiente manera: 1) Cepas de referencia de *S. cepivorum*. Seis cepas, cada una representando un Grupo de Compatibilidad Micelial (MCG) diferente (proporcionadas por la Dra. Linda Kohn, de la Universidad de Toronto, Canadá). Una cepa proveniente de Inglaterra denominada 2FD30E (proporcionada por Felipe Delgadillo del INIFAP-Celaya). 2) Aislados de *S. cepivorum*. Se utilizaron 47 aislados mexicanos provenientes de tres estados productores de ajo: 29 de Guanajuato, 13 de Aguascalientes y 5 de Zacatecas. 3) Otros hongos. Se utilizaron 4 cepas de hongos fitopatógenos, los cuales son también formadores de esclerocios: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* y *Macrophomina phaseolina*.

**CULTIVO DE AISLADOS Y CEPAS EMPLEADOS.** Se utilizaron dos medios de cultivo: Agar Extracto de Malta (Bioxon) y Papa Dextrosa Agar (Bioxon). Todos los cultivos de *S. cepivorum* y de *B. cinerea* se incubaron a una temperatura entre

18 y 21 °C, mientras que cultivos de *S. rolfsii*, *R. solani* y *M. phaseolina* se incubaron a 28°C.

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL DNA.** Se siguió el procedimiento para extraer el DNA descrito por Flores-Martínez y col.<sup>14</sup> La calidad del DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la cuantificación se tomó una alícuota de la suspensión de DNA y se midió la densidad óptica a 280 y 260 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600. Con esta información, se ajustó la concentración a 100 ng/μL de DNA de cada muestra para su posterior utilización.

**REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN TIPO RAPD.** Para las reacciones tipo RAPD se utilizaron los 12 iniciadores reportados por Márquez-Lona<sup>12</sup> y que se muestran en la tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo (3 min/ 95°C),



© Patricia Lagarde, de la serie *Herbolaria*.

cuarenta ciclos (1 min/95°C, 40 s/30°C, 2 min/72°C), un ciclo (10 min/72°C), y un ciclo (10 min/ 6°C). Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador RoboCycler Gradient 40 de Stratagene. Estas condiciones siempre se mantuvieron constantes durante todas las amplificaciones.

**ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS EN REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN.** Los productos de amplificación se separa-

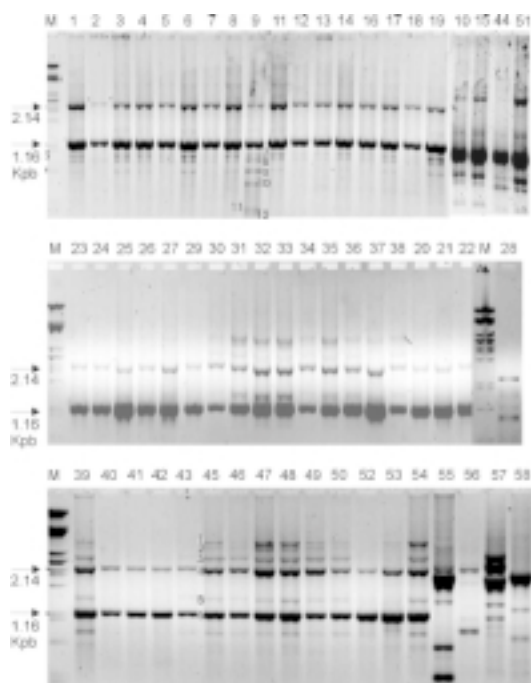


FIGURA 1. RAPD con el iniciador OPH19. Electroforesis en gel de agarosa 1.4% teñido con BrEt. M, marcador de tamaño molecular. Los números de los aislados se presentan en la Tabla 2. Los números dentro de cada gel indican las bandas analizadas.

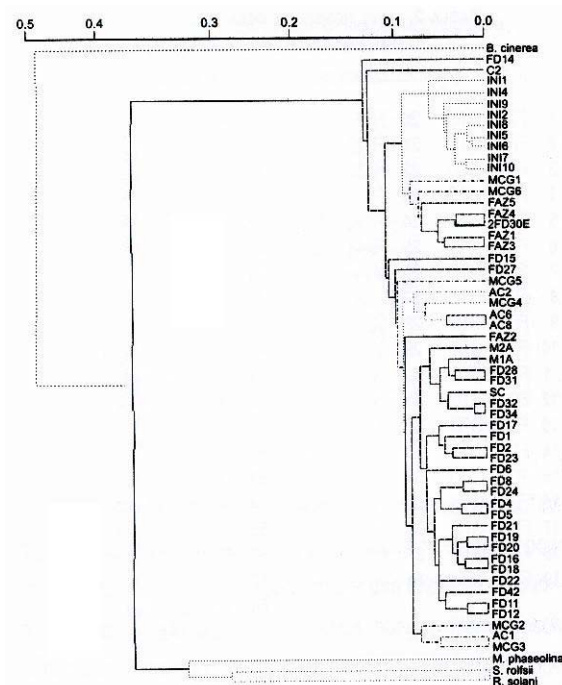


FIGURA 2. Distribución de los aislados en función de sus patrones genéticos. Dendrograma construido usando el método de los promedios no ponderados (UPGMA), empleando los coeficientes de apareamiento simple. La escala mide el coeficiente de disimilitud.

ron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.4% que contenían Bromuro de Etidio, para posteriormente visualizar las bandas en un transiluminador de luz UV, la imagen se grabó en un registrador de información Eagle eye II de Stratagene.

**MATRIZ DE DISIMILITUD GENÉTICA Y DENDOGRAMA.** Para analizar matemáticamente los patrones de bandeo obtenidos con los 12 iniciadores-RAPD utilizados y determinar la distancia genética entre cada par de aislados de *S. cepivorum* se empleó el coeficiente de disimilitud de apareamiento simple utilizando la fórmula para calcular la proporción de bandas no compartidas (DAP) propuesta por Skroch y col.<sup>15</sup>

Con los coeficientes de disimilitud de apareamiento simple, se construyó una matriz de disimilitud genética. Además se construyó un dendrograma usando el método de los promedios no ponderados (UPGMA, del inglés: *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**ANÁLISIS CUALITATIVO DE LOS PATRONES DE BANDEO DE RAPDS.** Se realizaron los ensayos tipo RAPD empleando los 12 inicia-

dores descritos por Márquez-Lona.<sup>12</sup> La figura 1 muestra el patrón de bandeo obtenido con el iniciador OPH19 para todos los aislados y cepas empleadas. Con todos los iniciadores se obtuvieron productos de amplificación. En general, no observamos muchas diferencias en el patrón de bandeo en los aislados y cepas de *S. cepivorum* con los iniciadores probados, pero sí fueron más notorias las diferencias con respecto al patrón de bandeo que presentaban los otros hongos fitopatógenos utilizados.

En el presente estudio, refiriéndonos a los patrones genéticos obtenidos con cada iniciador con los aislados y cepas de *S. cepivorum*, llamamos banda polimórfica a aquella banda que está presente en una frecuencia mayor al 1% y menor al 100%. Por lo tanto una banda que esté presente en todos los patrones genéticos tendrá una frecuencia del 100% y es llamada banda no polimórfica.

Para el análisis matemático realizado en el presente estudio, sólo se consideraron aquellas bandas que fueron capaces de ser distinguibles como presentes o ausentes dadas las condiciones propias de cada gel. Se tomaron como idénticas las bandas que tuvieron el mismo tamaño, la intensidad de las bandas no fue considerada un factor de polimorfismo. En la figura 1 se indica con un número las bandas seleccionadas. No sabemos aún a qué se debe este incre-

TABLA 3. BANDAS POLIMÓRFICAS OBTENIDAS CON CADA INICIADOR EN EL ANÁLISIS DE RAPDS.

INICIADOR	TOTAL DE BANDAS	BANDAS POLIMÓRFICAS	BANDAS NO POLIMÓRFICAS
OPA02	15	11	4
OPA03	14	11	3
OPA13	10	7	3
OPB10	14	13	1
OPE14	10	9	1
OPG02	13	13	0
OPG10	7	6	1
OPH03	11	8	3
OPH04	14	11	3
OPH18	15	13	2
OPH19	12	11	1
OPJ20	13	12	1
TOTAL	148(100%)	125 (84.5%)	23 (15.5%)

mento en la intensidad de las bandas, ni si tienen relación con alguna actividad fisiológica de los aislados, pero es posible que realizando estudios fisiológicos y bioquímicos se pueda correlacionar la ausencia o presencia de una banda o la mayor amplificación de ésta, con alguna característica fisiológica en estos aislados que lleve a obtener más información que permita controlar la pudrición blanca.

En la tabla 3 se anotó la cantidad de bandas analizadas en los patrones génicos obtenidos con cada iniciador, así como cuántas de ellas son bandas polimórficas y no polimórficas; la cantidad de bandas consideradas con cada iniciador-RAPD estuvo entre siete y quince. Aunque existe un alto porcentaje de bandas polimórficas (84.5%), los patrones génicos de *S. cepivorum* encontrados con cada iniciador son muy parecidos debido a que 66.7% de las bandas polimórficas tienen una frecuencia superior al 51.9% .

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS PATRONES DE BANDEO. El análisis de los patrones de bandeo obtenidos con los 12 iniciadores empleados es representado por una matriz de disimilitud. Del análisis estadístico de todos los coeficientes de disimilitud de apareamiento simple de los aislados y cepas de *S. cepivorum* podemos concluir que la disimilitud genética promedio entre la población analizada de *S. cepivorum* es de 9.4%, lo cual indica que el grado de variabilidad genética en ella es poca y que este hongo fitopatógeno ha llevado a un grado mínimo su recombinación genética. Existen estudios realizados en otros hongos que sirven como referencia para comparar el grado de variabilidad genética encontrada en este trabajo; en ellos, también se ha trabajado con una población de aislados de la misma especie y realizado su análisis empleando la técnica de RAPD. En *Sclerotinia homeocarpa* se encontró baja disimilitud genética

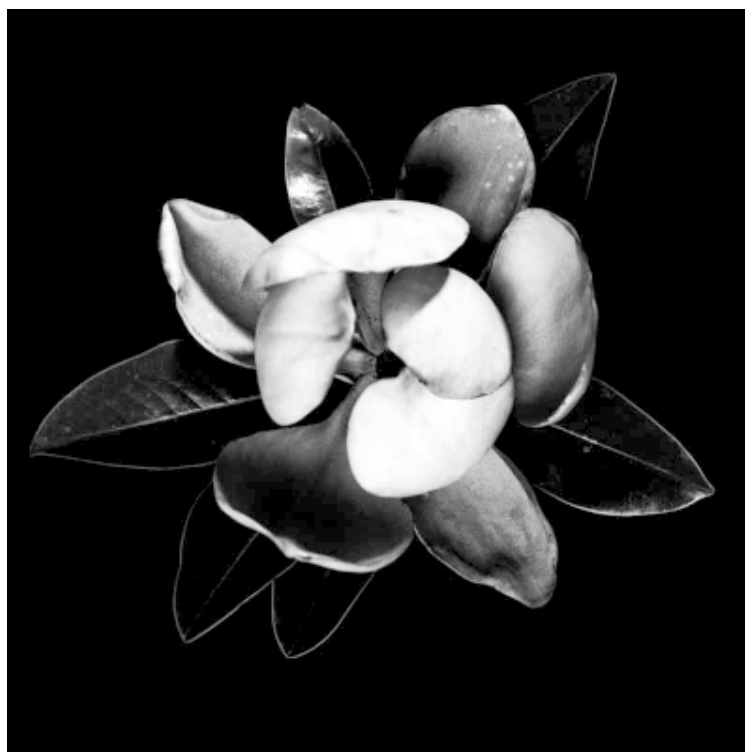
TABLA 4. BANDAS PROPUESTAS COMO MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICACIÓN DE *S. CEPIVORUM*.

INICIADOR	BANDAS	TAMAÑO MOLECULAR (kpb)
OPA02	5, 6, 7, 10	1.38, 1.28, 1.19, 0.89
OPA03	2, 4, 6, 7	2.79, 2.04, 1.47, 1.25
OPA13	4, 9	1.88, 1.20
OPB10	3, 4, 5	2.11, 1.90, 1.82
OPE14	1, 2	1.30, 1.13
OPG10	1	4.7
OPH03	3, 4, 6, 7, 8, 9	2.1, 1.82, 1.19, 1.0, 0.88, 0.7
OPH04	2, 3, 7, 11, 12	2.27, 1.89, 0.95, 0.66, 0.55
OPH18	3, 7, 9	2.73, 1.32, 0.81
OPH19	4	2.14
OPJ20	6, 12	1.12, 0.35

(< 20%).<sup>16</sup> En *Beauveria brongniartii* la disimilitud genética encontrada fue menor del 12%.<sup>17</sup>

Para visualizar mejor la relación que existe entre los coeficientes de disimilitud genética contenidos en la matriz, se construyó un dendograma empleando el método UPGMA (método de los promedios no ponderados). En el dendograma se puede ver que la variabilidad existente entre la mayoría de los aislados es baja (figura 2). Además puede observarse cómo los otros hongos fitopatógenos analizados tienen un grado mucho mayor de disimilitud respecto a la población de aislados de *S. cepivorum*, es decir, el análisis tipo RAPD logra diferenciar a aislados de *S. cepivorum* de los que no lo son. Un análisis más fino del dendograma de la figura 2 permite descubrir que los aislados de *S. cepivorum* se agrupan en su mayoría de acuerdo al estado de donde provienen. La mayoría de los aislados y cepas se distribuyen en dos grandes ramas. Básicamente, en una rama se agrupan los aislados "INI" (de Aguascalientes) y "FAZ" (de Zacatecas) y en la otra rama, los aislados de Guanajuato y los "AC" (de Aguascalientes).

Dada la poca variabilidad genética que tiene la población de *S. cepivorum* analizada en este trabajo, puede suponerse que un mismo método de control debe tener similar efectividad en suelos de cultivo de distintas zonas agrícolas con similar densidad de esclerocios viables. Quizá las variaciones en la efectividad de las prácticas de control de la pudrición blanca son debidas a otros factores tales como las condiciones climáticas propias de cada región, diferentes tipos de suelo según su composición química y/o microbiológica, diferencias en la implementación del método de control, etcétera.



© Patricia Lagarde, de la serie *Herbolaria*.



Se analizó si en los aislados de Guanajuato había alguna correlación entre su agrupamiento y el municipio de procedencia, observándose que no hay ninguna correlación al respecto. Es probable que el intercambio anual de ajo que realizan los campesinos guanajuatenses provoquen un intercambio intenso de aislados de *S. cepivorum*.

Así pues, aquí se reporta que los aislados mexicanos de *S. cepivorum* logran discernirse mediante análisis RAPD según la entidad federativa de donde provienen. Aunque a la fecha desconocemos cuál es la presión selectiva que provoca dicha separación.

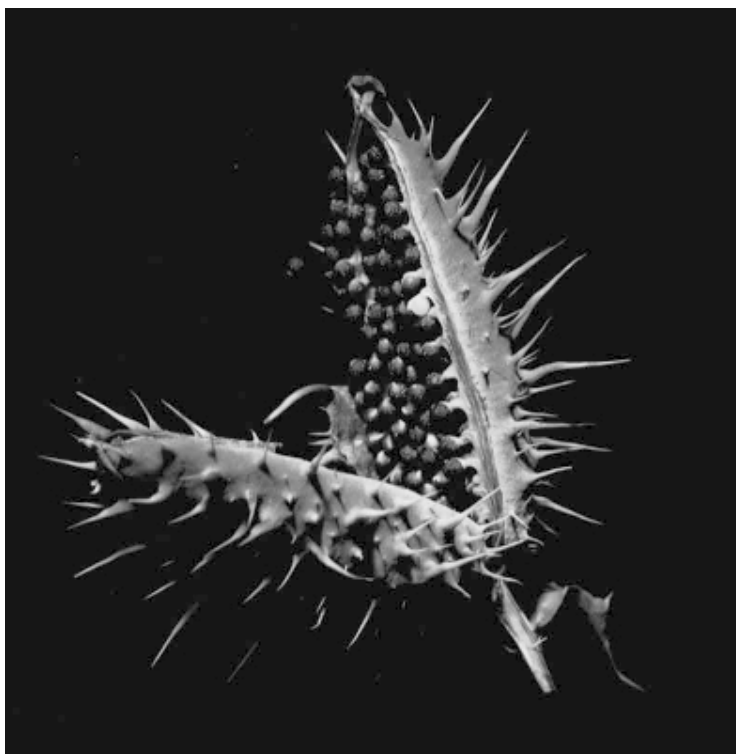
BANDAS PROPUESTAS COMO MARCADORES MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *S. CEPIVORUM*. Como se mencionó anteriormente, los patrones génicos obtenidos entre *S. cepivorum* y las cepas control (*S. rolfii*, *R. solani*, *B. cinerea* y *M. phaseolina*) son distintos entre sí, lo cual hace factible identificar bandas que se amplifican selectivamente en aislados de *S. cepivorum* y emplearlas para identificar muestras que presumiblemente sean de este hongo. Se seleccionaron aquellas bandas que tuvieran una frecuencia superior al 90%, que fueran nítidas dentro del patrón génico y que se les pudiera determinar su tamaño molecular. De las bandas exclusivas de *S. cepivorum* se proponen

33 bandas que cumplen los criterios antes mencionados y que podrían ser empleadas como marcadores moleculares para identificar a este organismo (tabla 4).

#### CONCLUSIONES

Tanto los aislados como las cepas de referencia de *S. cepivorum* mostraron patrones similares de morfología colonial y morfología de los esclerocios.

Todos los iniciadores probados dan bandas de amplificación. Se lograron condiciones de reproducibilidad en los RAPDs realizados. El 84.5% de las bandas analizadas son polimórficas. El análisis RAPD logra discernir claramente a los aislados de *S. cepivorum* de los otros hongos fitopatógenos empleados. Esto apoya la conclusión de que todos los aislados son *S. cepivorum*. Con los iniciadores empleados, los aislados y cepas de *S. cepivorum* dan un patrón similar entre sí, pero muy diferente al que mostraron los otros hongos fitopatógenos utilizados. La disimilitud genética promedio entre los aislados de *S. cepivorum* es de 9.4%. Ello implica que la recombinación genética en los aislados de este fitopatógeno es poca. El dendrograma, de manera general, agrupa a los aislados según la entidad federativa de donde provienen, pero no se logra agrupar a los aislados guanajuatenses según el municipio de origen.



© Patricia Lagarde, de la serie *Herbolaria*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al doctor Octavio Martínez de la Vega del CINVESTAV-Irapuato, por su ayuda en el análisis matemático de los datos, a los doctores Felipe Delgadillo (INIFAP-Celaya) y Alfredo Herrera-Estrella (CINVESTAV-Irapuato) por proporcionarnos las cepas analizadas. FLM fue becario de CONACYT. Este proyecto fue apoyado por SIHGO proyectos: ALIM 16/96 y 19990201016.

## NOTAS

<sup>1</sup> Laborde, J. A., *Coexistence of garlic white rot with commercial production in Central Mexico. Proceedings of the third International workshop on Allium white rot*, Sección 1, Entwistle, A. R. ed., Wellesbourne, UK: TW Printing Associates Ltd Leamington Spa, UK, p. 24, 1987.

<sup>2</sup> Coley-Smith, J. R. and Entwistle, A. R., Susceptibility of cultivars of garlic to *Sclerotium cepivorum*, *Plant Pathol.*, 37:261-26, 1988.

<sup>3</sup> Pinto, C. M., Maffia, L. A., Berguer, R. D., Mizobuti, E. S. and Casali, V. W., Progress of White Rot in garlic cultivars planted at Different times, *Plant Dis.*, 82:1142-1146, 1998.

<sup>4</sup> Crowe, F. J. and Hall, D. H., Soil Temperature and Moisture Effects on *Sclerotium* Germination and Infection of Onion Seedlings by *Sclerotium cepivorum*, *Phytopathology*, 70: 74-78, 1980.

<sup>5</sup> Kohn, L. M. and Grenville, D. J., Anatomy and Histochemistry of stromatal anamorphs in the *Sclerotiniaceae*, *Can. J. Bot.*, 67: 371-393, 1989.

<sup>6</sup> Coley-Smith, J. R., Studies of the biology of *S. cepivorum* Berk. IV. Germination of sclerotia, *Ann. Appl. Biol.*, 48:8-18, 1960.

<sup>7</sup> Little, E. R. and Rahe, J. E., Sclerotial morphogenesis in *Sclerotium cepivorum* in vitro, *Can. J. Bot.*, 70:772-778, 1992.

<sup>8</sup> Rosewich, U. and McDonald, B. A., DNA Fingerprinting in Fungi, *Meth. Mol. Cell. Biol.*, 5:41-48, 1994.

<sup>9</sup> Earnshaw, D. and Boland, G. J., Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*, *Plant Pathol.*, 46:229-238, 1997.

<sup>10</sup> Martínez, O. and Simpson, J., *Analysis of AFLP data to construct dendrograms, International Training Course on Analysis and Manipulation of the Fungal Genome*, CINVESTAV, Irapuato, Gto., México, pp. 94-99, 1998.

<sup>11</sup> Williams, G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V., DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl. Acids. Res.*, 18:6531-6535, 1990.

<sup>12</sup> Márquez-Lona, E. M., Caracterización molecular de aislados de *Sclerotium cepivorum* a partir de suelos infectados de la región de Celaya. Tesis para obtener el título de QFB, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, México, 1998.

<sup>13</sup> Pérez-Moreno, L., Estructura poblacional de *Sclerotium cepivorum* Berk en México. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias, CINVESTAV, Irapuato, Gto., México, 1999.

<sup>14</sup> Flores-Martínez A., Chet, I. y Herrera-Estrella, A., Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over expression of the proteinase encoding gene *prb1*, *Curr. Gen.*, 31: 30-37, 1997.

<sup>15</sup> Skroch, P., Tivang, J. and Nienhuis, J., Analysis of genetic relationships using RAPD marker data, en *Joint Plant Breeding Symposia*, Crop Science Society of America - American Society for Horticultural Science - American Genetic Association, Minneapolis, Mn., pp. 26-30, 1992.

<sup>16</sup> Raina, K., Jackson, N., and Chandless, J. M., Detection of genetic variation in *Sclerotinia homeocarpa* isolates using RAPD analysis, *Mycol. Res.*, 101:585-590, 1997.

<sup>17</sup> Piatti, P., Cravanzola, F., Bridge, P. D. and Ozino, O. I., Molecular characterization of *Beuveria brongniartii* isolates obtained from *Melolontha melolontha* in Valle d'Aosta (Italy) by RAPD-PCR, *Lett. in Appl. Microbiology*, 26:317-324, 1998.

F. Luna Martínez, A. Flores Martínez y P. Ponce Noyola, pertenecen al Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. poncep@quijote.ugto.mx