

Análisis de la variabilidad genética del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con marcadores RAPD

Analysis of genetic variability of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* by RAPD markers

ANA MILENA VALDERRAMA F.¹, MARCO AURELIO CRISTANCHO A.²,
BERNARDO CHÁVES C.³

Revista Colombiana de Entomología 26(1-2): 25-29 (2000)

Resumen. En este estudio se utilizó la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) para analizar la variabilidad genética de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals. Vuillemin) procedentes de diversos insectos, localidades y con diferentes porcentajes de patogenicidad sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Para tal propósito se extrajo ADN de diez aislamientos de *B. bassiana*, uno de *Beauveria brongniartii* y uno de *Paecilomyces lilacinus*, amplificándolos con 36 iniciadores de secuencia al azar. Los productos de la amplificación se visualizaron en gel de agarosa, registrándose 455 bandas reproducibles con un tamaño entre 0.36-2.0 kb. Para el análisis se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard, la distancia genética de Nei-Li y se realizó un dendrograma con el método de agrupamiento UPGMA. En el dendrograma se observaron dos grupos principales de aislamientos, en uno de ellos se agrupa el 90% de los aislamientos de *B. bassiana* y pudo distinguirse una asociación de acuerdo con su origen geográfico. En contraste, no se encontró una clara agrupación de los aislamientos con respecto a su hospedero y patogenicidad sobre la broca. El aislamiento de *B. brongniartii* se agrupó con los de *B. bassiana*, posiblemente porque este aislamiento está más relacionado con la última especie. En el segundo grupo se localizó el aislamiento *B.b* 9023 que se caracterizó por tener patrones genéticos muy diferentes de los otros aislamientos de *B. bassiana*. El aislamiento de *P. lilacinus* se separó completamente del grupo de *Beauveria* spp. Se identificaron marcadores RAPD útiles en la diferenciación intraespecífica del entomopatógeno *B. bassiana*.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*. *Hypothenemus hampei*. Broca del café. PCR. Iniciadores. RAPD. Polimorfismo del ADN.

Summary. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers were used to examine the genetic variability among *Beauveria bassiana* isolates from several insect hosts, geographic origin, and different pathogenicity percentages on the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). For this purpose the DNA was isolated from ten *B. bassiana* isolates, one from *B. brongniartii* and one from *Paecilomyces lilacinus*, the DNA was amplified randomly with 36 decamers. Amplification products were resolved in agarose gels and 445 reproducible bands ranging in size between 0.36-2.0 kb were scored. For the analysis, the similarity coefficient from Jaccard and the genetic distance from Nei & Li were calculated and a dendrogram was constructed using the UPGMA method. The dendrogram was divided in two principal groups, in the first group were placed 90% of *B. bassiana* isolates that exhibited certain correlation with the geographic origin. In contrast, there were no correlations between the clusters, the insect host and the coffee berry borer pathogenicity. The *B. brongniartii* isolate clustered together with *B. bassiana*, perhaps because this isolate is more closely related to the last species. In the second group it was found *B. bassiana* Bb 9023. That isolate is different from the other group of *Beauveria* spp. due to different genetic patterns. The *P. lilacinus* isolate was completely separated from the group of *Beauveria* spp. It was possible to recognize RAPD markers useful for the intra-specific differentiation of the entomopathogenic fungi *B. bassiana*.

Key words: *Beauveria bassiana*. *Hypothenemus hampei*. Coffee berry borer. PCR. Primers. RAPD. Polymorphic ADN.

Introducción

La broca, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolityidae), es considerada el insecto plaga de mayor importancia del café en Colombia y otros países productores del grano (Bustillo 1993). Con el fin de disminuir daños económicos y defender el sistema agroecológico se ha utilizado el control biológico de la plaga el cual se fundamenta principalmente en el uso de parasitoides de

origen africano y hongos entomopatógenos. Cenicafe desarrolla en la actualidad un programa de investigación con hongos entomopatógenos dirigidos al control de la broca del café que comprende: el aislamiento, colección y caracterización de cepas; realización de pruebas de patogenicidad, selección y evaluación de métodos de producción, evaluación de los métodos de aplicación, compatibilidad con plaguicidas y seguridad para la fauna benéfica, con el fin

de producir un bioinsecticida eficaz (Posada 1993).

En la micoteca de Entomología de Cenicafe existen 95 aislamientos de *B. bassiana*, de los cuales 67 han sido colectados en Colombia, 23 han sido obtenidos de diferentes colecciones internacionales y 5 son de procedencia desconocida. Con relación al rango de hospederos, el hongo se ha aislado de 32 especies de insectos, con un mayor

1 Microbióloga. Instituto Colombiano del Petróleo. A.A. 4185. Bucaramanga. Colombia.

2 Microbiólogo, Ph.D. Disciplina de Biotecnología, CENICAFÉ, Chinchiná. A. A. 2427. Manizales, Caldas, Colombia.

3 Estadístico, M.Sc. Disciplina de Biometría, CENICAFÉ, Chinchiná. A. A. 2427. Manizales, Caldas, Colombia.

número de aislamientos (39) procedentes de la broca del café (Posada y Vélez 1997).

La diferenciación de aislamientos por técnicas bioquímicas o morfológicas es afectada por condiciones medioambientales, que pueden llevar a producir resultados muy variables (St Leger *et al.* 1992b). El uso de técnicas moleculares como la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) permite detectar polimorfismos en el ADN, los cuales pueden ser usados como marcadores genéticos (Williams *et al.* 1990). Estos marcadores han sido especialmente empleados en la diferenciación de hongos que se reproducen asexualmente, se obtienen de manera rápida y no se requiere conocer una secuencia de ADN para su detección (McDonald 1997).

En estudios realizados por Rivera *et al.* (1997) se observó un alto grado de homogeneidad entre aislamientos de *B. bassiana* procedentes de Colombia y otros países y no se encontró una relación entre la agrupación genética, el tipo de hospedero y su localización geográfica. En otros estudios moleculares de *B. bassiana* utilizando RAPD, se han encontrado genotipos asociados a hospederos específicos (Maurer *et al.* 1997; Urtz y Rice 1997), sugiriéndose cierta selección natural dada por el tipo de hospedero.

Teniendo en cuenta que con la técnica RAPD se puede estimar el polimorfismo del ADN de varios microorganismos a nivel inter e intraespecífico y con la diversidad de aislamientos de *B. bassiana* existentes en la biblioteca de Entomología, este trabajo tuvo como objetivo principal analizar la variabilidad genética de *B. bassiana* como herramienta para la selección de cepas potenciales para el control de la broca del café.

Materiales y Métodos

Obtención de micelio. Se seleccionaron 10 aislamientos de *B. bassiana* de la colección de la disciplina de Entomología del

Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), teniendo en cuenta su diversidad con respecto al sitio geográfico, tipo de hospedero y porcentaje de patogenicidad sobre la broca del café. Como organismos de comparación se analizó un aislamiento de *B. brongniartii* y uno de *Paecilomyces lilacinus*, que de igual forma a *B. bassiana*, son utilizados como agentes biocontroladores de insectos plaga (Tabla 1). De cada uno de los aislamientos, sembrados en Agar Sabouraud, se obtuvo micelio en medio líquido GYM (medio glucosa-extracto de levadura) incubando en agitación orbital (150 r.p.m.) a 25 °C durante 6 días. El micelio se recuperó por filtración al vacío utilizando papel filtro (Whatman No 1), lavando dos veces el micelio filtrado con agua ultrafiltrada estéril. Este se liofilizó y almacenó a -20 °C hasta la extracción de ADN.

Extracción de ADN. Se utilizó una modificación del método de extracción de ADN con bromuro de cetil-trimetil-bromuro de amonio (CTAB), dado por Zolan y Pukkila (1986). Se pesaron entre 50 y 100 mg del micelio liofilizado y se homogenizó adicionando nitrógeno líquido hasta obtener micelio pulverizado. A éste se le agregaron 5 ml del buffer de extracción (700 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA; 2% (p/v) CTAB; 1 % mercaptoetanol). Después de incubar 1 hora a 60 °C, se realizaron dos extracciones consecutivas con 5 ml de cloroformo isoamiloalcohol (24:1). Después de centrifugar a 3.500 r.p.m. (15 min) se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 0.54 V de isopropanol y se colectó el precipitado por centrifugación a 14.000 r.p.m. (15 min a 4 °C). Este fue disuelto en 500 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0), se adicionaron 5 µl de ARNasa A (10 mg.ml⁻¹) e incubó por 1 hora a 37 °C. Después de la digestión del ARN se adicionaron 500 µl de cloroformo: isoamiloalcohol (24:1) y se recuperó el sobrenadante después de centrifugar a 3.500 r.p.m. por 15 minutos. El ADN se precipitó con 2V de etanol absoluto, se colectó por centrifugación a 3.000

r.p.m. (2-3 min a 4 °C) y se disolvió en 100 µl de buffer TE. Las extracciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Se realizaron, como mínimo, dos extracciones de ADN por aislamiento, que fueron utilizadas independientemente en las reacciones de amplificación (RAPD). Para determinar la pureza del ADN extraído se hizo por espectrofotometría un barrido entre A₂₂₀₋₃₂₀ nm determinando la absorbancia a A₂₆₀ nm con la que se halló la concentración de ADN y se calculó la relación A₂₆₀/A₂₈₀ para detectar la contaminación con proteínas (Sambrook *et al.* 1989). La integridad del ADN se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se coloreó con bromuro de etidio (0.5 µg.ml⁻¹) y se observó con luz ultravioleta (Sambrook *et al.* 1989).

Iniciadores y condiciones de la amplificación. Se evaluaron 36 iniciadores aleatorios, de 10 bases de longitud (Gibco-BRL, Life Technologies) (Tabla 2). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en 25 ml que contenían: 1.25 U Taq ADN polimerasa (Gibco-BRL); 200 mM de cada uno de los desoxiribonucleótidos (dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 20 mM Tris-HCl pH 8.4; 50 mM KCl; 1.75 mM MgCl₂; 0.6 mM iniciador; aproximadamente 50 ng de ADN y agua ultrafiltrada. La amplificación se realizó en un termociclador MJ-Research PTC-200 con el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos; seguido por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 36 °C, 2 minutos a 72 °C; y un último ciclo de extensión a 72 °C por 5 minutos. Se hizo un control negativo para las reacciones de amplificación, que contenía todos los componentes, excepto el ADN que fue sustituido por agua. Todas las reacciones de amplificación se realizaron mínimo dos veces utilizando como plantilla el ADN obtenido en dos extracciones independientes, con el objetivo de ver la reproducibilidad en los patrones de bandeado electroforético.

Electroforesis. Los productos de la amplificación se analizaron por medio de

Tabla 1. Hospederos, origen geográfico y patogenicidad sobre la broca del café de aislamientos de *B. bassiana*, *B. brongniartii* y *P. lilacinus*

Aislamiento	Hospedero		Origen geográfico	% Patogenicidad ¹
	Orden: Familia	Especie		
<i>B. bassiana</i> 9018	Lepidoptera : Cossidae	<i>Cossus cossus</i>	Italia	81,62
<i>B. bassiana</i> 9021	Coleoptera : Scolytidae	<i>H. hampei</i>	Ecuador	91,62
<i>B. bassiana</i> 9023	Hemiptera : Coreidae	<i>Leptocorisa</i> sp.	Filipinas	61,65
<i>B. bassiana</i> 9027	Homoptera : Delphacidae	<i>Nilaparvata lugens</i>	China	89,95
<i>B. bassiana</i> 9101	Coleoptera : Scolytidae	<i>H. hampei</i>	Nariño - Colombia	31,65
<i>B. bassiana</i> 9112	Lepidoptera : Geometridae	<i>Cargolia arana</i>	Caldas-Colombia	100
<i>B. bassiana</i> 9205	Lepidoptera : Pylalidae	<i>Diatraea saccharalis</i>	Valle - Colombia	93,30
<i>B. bassiana</i> 9218	Coleoptera : Curculionidae	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Florida - USA	81,62
<i>B. bassiana</i> 9315	Orthoptera : Blattidae	<i>Periplaneta</i> sp.	Risaralda - Colombia	44,95
<i>B. bassiana</i> 9506	Coleoptera : Scolytidae	<i>H. hampei</i>	Guatemala	91,25
<i>B. brongniartii</i> 9301	Lepidoptera : Tortricidae	<i>Antaeotricha</i> sp.	Colombia	N.D. ²
<i>P. lilacinus</i> 9601	Coleoptera : Scolytidae	<i>H. hampei</i>	Colombia	N.D.

1 % Patogenicidad = Porcentaje de patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei* (González, M.T. 1995. Informe Anual de Labores de Cenicafé. Chinchiná)

2 N.D. = No determinado

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores (5' → 3') utilizados en este estudio

Iniciador	Secuencia	Iniciador	Secuencia
6	CCC AAG GTC C	37	AGT CAG CCA C
7	GTG ACA TGC C	38	GGA GGG TGG T
8	AAG ACC CCT C	39	AGG GAA CGA G
9	TCA CCA CGG T	40	TGA GTG GGT G
10	GGT GAC TGT G	41	AGA TGC AGC C
11	CGC CTA GGT A	42	ACG GAT CCT G
14	CGG CTT GGG T	44	GTG ATC GCA G
18	GGG ATA TCG G	45	TTC CGA ACC C
21	GGA AGC TTG G	47	ACT TCG CCA C
23	TCG GAC GTG A	48	GAG AGC CAA C
24	GCT TCG ATA C	49	CCC CGG TAA C
25	TCA CGA TGC A	50	GGT GAC GCA G
30	CTT CAC CCG A	51	GGC ACT GAG G
31	GAG TCT CAG G	53	GAA CCT GCG G
32	GGT GCG GGA A	55	CTC TCC GCC A
33	CCA GAT GCA C	57	GAG CGA GGC T
34	TGC GGC TGA G	58	CCC GCC TTC C
36	TGC CGA GCT G	59	TTC CCC GTC G

electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % usando 1X del buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) y fue corrida durante 2 horas a 60V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

Análisis de datos. Con las fotografías de los geles de electroforesis se verificó la reproducibilidad de las bandas y sólo se tomaron en cuenta bandas reproducibles y de intensidad fuerte. El polimorfismo del ADN fue identificado cuando estuviera una banda presente en un aislamiento pero ausente en otro. Se elaboró una matriz de datos asignando el valor de 1 cuando estuviera la banda presente y 0 cuando estuviera ausente. Con esta matriz se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard (S) expresado como: $S_{ij} = a / a + b + c$. Donde S_{ij} es la similitud entre 2 aislamientos, i y j ; a es el número de bandas presentes en los dos aislamientos i y j ; b es el número de bandas presentes en i y ausentes en j ; y c es el número de bandas presentes en j y ausentes en i . Este coeficiente de similitud excluye bandas ausentes en dos aislamientos, ya que la mutua ausencia no puede ser atribuida a una causa común y por consiguiente a similitud. Con este coeficiente se calculó la distancia genética D con la siguiente ecuación: $D_{ij} = 1 - S_{ij}$ (Nei y Li 1979). Con base en la matriz de distancia genética se elaboró un dendrograma, usando el método de agrupamiento no ponderado para grupos pares UPGMA (Sneath y Sokal 1973). Los cálculos de coeficientes de similitud, distancia genética y dendrogramas fueron realizados con el programa Similit (SAS versión 6.12.)

Resultados y Discusión

Extracción de ADN. Se obtuvieron en promedio 866 µg de ADN.gr⁻¹ de micelio liofilizado de *B. bassiana*; el grado de pure-

za fue óptimo ya que la relación A_{260}/A_{280} fue en promedio para todas las extracciones realizadas 2.05 (DE = √ 0.56), valor característico de ácidos nucleicos puros (Sambroock et al. 1989). En la electroforesis del ADN total se verificó la integridad del ADN como una banda de alto peso molecular (23 kilobases) con baja degradación. El análisis del ADN extraído permitió determinar la pureza de las extracciones realizadas e identificar muestras que requerían otra extracción.

Amplificación. En las reacciones de amplificación para *Beauveria* spp. con los 36 iniciadores evaluados se amplificaron 445 bandas con un peso molecular entre 369 y

2091 pares de bases, de las cuales 289 fueron polimórficas. Los polimorfismos observados con el análisis de RAPD pueden ser causados por varios eventos tales como la sustitución de pares de bases, inversión o delección en los sitios de apareamiento del iniciador. El porcentaje de sitios polimórficos (65%) refleja de manera general la diversidad genotípica de los aislamientos analizados de *Beauveria* spp., destacándose el aislamiento *B.b* 9023 con patrones de bandeo electroforético muy diferentes al resto del grupo de *Beauveria* spp. (Figs 1-2. Carril 3). Este aislamiento fue una donación del Instituto Micológico Internacional (IMI) clasificado como *B. bassiana* y se comprobó microscópicamente que no estuviera contaminado con otro microorganismo. Adicionalmente se hicieron tres extracciones de ADN por separado, que sirvieron como ADN plantilla para las reacciones de amplificación. Independientemente de la reacción se observaron patrones reproducibles que se caracterizaron por ser notoriamente diferentes en comparación con los otros aislamientos de *Beauveria* spp.

Con algunos iniciadores se puede observar en general un patrón de bandeo electroforético muy similar entre los aislamientos de *Beauveria* spp. distinguiéndose algunas bandas polimórficas (Fig.1 Carril 2 y 9), con los iniciadores 55, 58 48, 42 y 40 se observó un patrón de bandeo muy similar. En contraste con los iniciadores 14, 23, 36, 50 y 57 se evidencian de mejor manera bandas polimórficas (Fig. 2). Se obtuvo reproducibilidad en las bandas más intensas, la mayoría de las bandas débiles no fueron reproducibles y otras se observaron sólo una vez al comparar el duplicado de la reacción de amplificación.

En la figura 3 se presenta el dendrograma generado de la matriz de distancias con los 36 iniciadores evaluados, donde se agrupan los aislamientos de acuerdo con

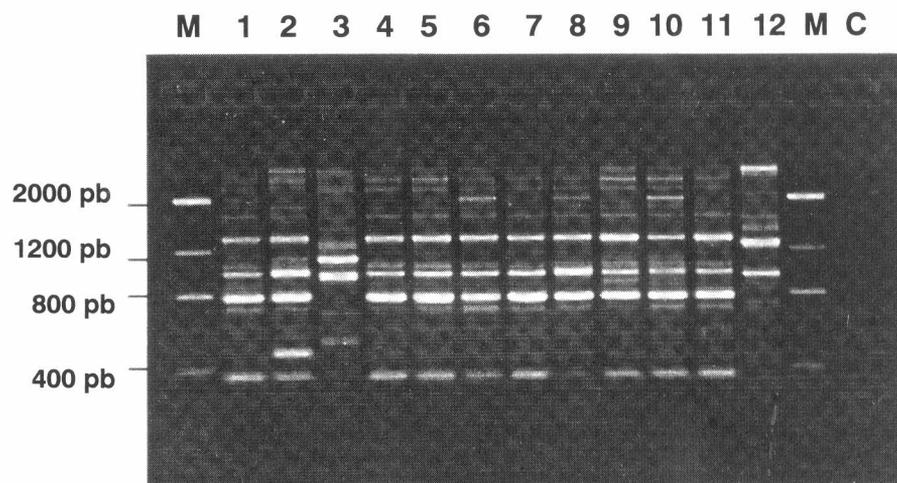


Figura 1. Electroforesis de la amplificación obtenida con el iniciador 55. Carril M. Marcador de peso molecular "low DNA mass ladder"; 1. *B.b* 9018; 2. *B.b* 9021; 3. *B.b* 9023; 4. *B.b* 9027; 5. *B.b* 9101; 6. *B.b* 9112; 7. *B.b* 9205; 8. *B.b* 9218; 9. *B.b* 9315; 10. *B.b* 9506; 11. *B.br* 9301; 12. *Pl* 9601; M. Marcador de peso molecular; C. Control negativo. (*B.b* = *B. bassiana*; *B.br* = *B. brongniartii*; *Pl* = *P. lilacinus*; pb = pares de bases).

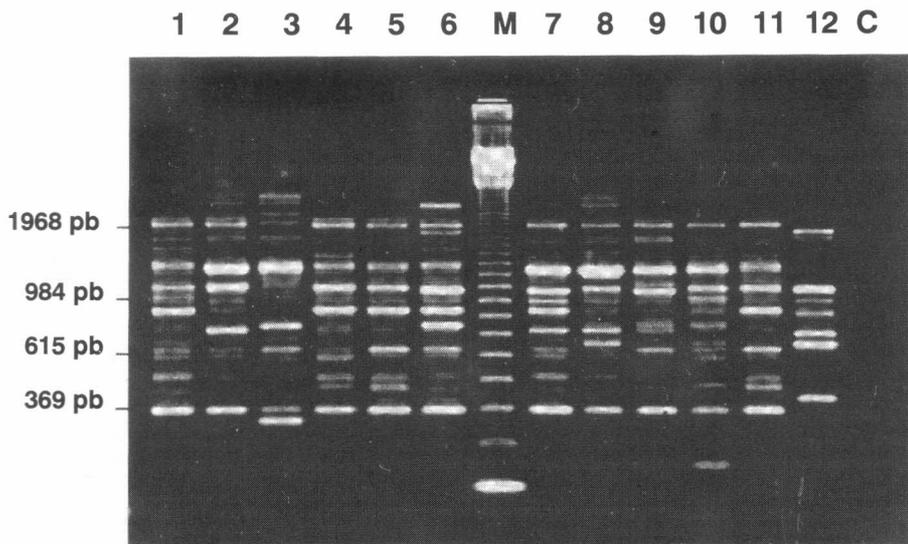


Figura 2. Electroforesis de la amplificación obtenida con el iniciador 50. Carril 1. *B.b* 9018; 2. *B.b* 9021; 3. *B.b* 9023; 4. *B.b* 9027; 5. *B.b* 9101; 6. *B.b* 9112; M. Marcador de peso molecular "123 bp ladder"; 7. *B.b* 9205; 8. *B.b* 9218; 9. *B.b* 9315; 10. *B.b* 9506; 11. *B.br* 9301; 12. *Pl* 9601; C. Control negativo.

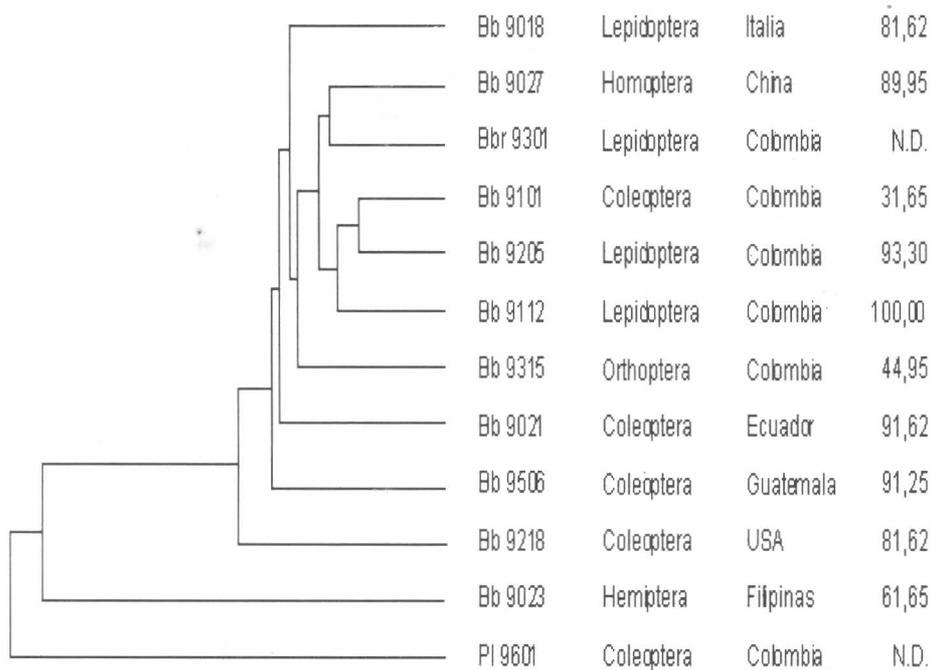


Figura 3. Dendrograma de los aislamientos evaluados y su relación con el tipo de hospedero, origen geográfico y porcentaje de patogenicidad sobre la broca del café.

su relación genética y se describe el origen geográfico, tipo de hospedero y porcentaje de patogenicidad sobre la broca del café de cada uno de los aislamientos. Se puede observar un grupo principal donde están el 90% de los aislamientos de *B. bassiana* junto con el de *B. brongniartii*. Este aislamiento no se logró diferenciar de los de *B. bassiana*, resultado que se ha obtenido en otros trabajos (Glare e Inwood 1998), donde con la técnica RAPD se agruparon genéticamente estas dos especies. La diferenciación morfológica de estas dos especies ha sido

materia de controversia, ya que comparando la forma de los conidios, *B. brongniartii* produce sólo elipsoidales o cilíndricos y *B. bassiana* produce globosos y elipsoidales (Mugnai *et al.* 1989). Aunque el objetivo de este trabajo no era identificar genéticamente especies, el aislamiento de *B. brongniartii* parece estar más relacionado con la especie *B. bassiana*. Sin embargo, con otras técnicas moleculares como el análisis de restricción de las regiones ITS se han encontrado claras diferencias entre estas dos especies, y posiblemente, el uso de

otras técnicas moleculares diferentes de RAPD permita distinguirlos (Neuvéglise *et al.* 1994).

Al comparar la distribución de los grupos dentro del dendrograma se observa cierta asociación de los aislamientos con respecto a su origen geográfico, puesto que los aislamientos colombianos se condensaron en una misma rama (Fig. 3). Aunque allí mismo se encuentra un aislamiento de diferente localidad *Bb* 9027, se evidencia la persistencia de ciertos genotipos en regiones específicas; esta correlación se ha establecido en otros estudios de *B. bassiana* usando la técnica RAPD y perfiles isoenzimáticos (Glare e Inwood 1998; Poprawski *et al.* 1988). Los aislamientos colombianos tienen un porcentaje de divergencia genética del 23,6%; esta baja variación intraregional puede ser debida a la ausencia de la fase sexual, ya que la recombinación sexual es la principal fuente de variación intraespecífica en hongos. El origen de la variación genética en hongos Deuteromycetes no es clara y aunque existen registros de eventos de parasexualidad en condiciones de laboratorio en *B. bassiana* (Paccola-Meirelles y Azevedo 1991), ésta no ha sido demostrada en condiciones naturales y por tanto sus implicaciones en la variabilidad genética son por ahora desconocidas (St. Leger *et al.* 1992a).

Al comparar la agrupación genética de los aislamientos con el tipo de hospedero, no se encuentra una relación puesto que en un mismo grupo se reúnen aislamientos provenientes de diversos órdenes de insectos (Fig. 3); la falta de asociación ha sido explicada por el bajo grado de especialización de este hongo hacia un hospedero particular (Bidochka *et al.* 1994), aunque en otros estudios se han encontrado genotipos específicos a ciertos hospederos (Maurer *et al.* 1997; Urtz y Rice 1997). Igualmente, al comparar la agrupación genética de los aislamientos con el porcentaje de patogenicidad a la broca del café, se encuentran en un mismo grupo aislamientos con alta y baja patogenicidad. Esta asociación no se logró establecer posiblemente porque la virulencia y patogenicidad son características gobernadas por muchos genes, lo que hace difícil encontrar marcadores ligados a ellos.

Como reflejo de la variabilidad genotípica el aislamiento *B.b* 9023 se ubicó en una rama diferente al grupo principal (Fig. 3); dicha variabilidad podría atribuirse a su origen geográfico (Filipinas), pero es necesario evaluar un mayor número de aislamientos de esta procedencia para sustentar esta hipótesis. Igualmente el aislamiento de *P. lilacinus* se situó en una rama diferente del grupo de *Beauveria* spp.; demostrando la utilidad de la técnica RAPD para la diferenciación de estos dos géneros de hongos entomopatógenos.

Este estudio permitió identificar marcadores RAPD que mostraron polimorfismo genético entre los aislamientos de *B. bassiana* y con éstos se está analizando una población mayor de aislamientos con el ob-

jetivo de establecer relaciones entre el polimorfismo y otras características biológicas (porcentaje de germinación, producción enzimática, resistencia a la luz UV), importantes en la selección de cepas con potencial biológico para el control de la broca del café.

Conclusiones

- La técnica de amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD) permitió evaluar la variabilidad genética de aislamientos de *B. bassiana*, estableciendo diferencias a partir de características estables (ADN) que no están influenciados por factores medio-ambientales.

- El análisis de agrupamiento permitió establecer cierta relación genética con el origen geográfico del aislamiento pero no con el tipo de hospedero o el porcentaje de patogenicidad a la broca del café.

- Se identificaron ciertos marcadores RAPD útiles en la diferenciación de *B. bassiana* que permitieron reconocer patrones de bandas polimórficas.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por un convenio Colciencias-Federacafé. Agradecimientos al Centro Nacional de Investigaciones del Café especialmente a la Bacterióloga Patricia E. Vélez A., al Microbiólogo Armando Rivera Malo por su apoyo técnico y logístico y al Sr. Hernando García por su ayuda en el proceso de datos.

Bibliografía

- BIDOCHKA, M.; McDONALD, M.; St LEGER, R.; ROBERTS, D. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 25:107-113.
- BUSTILLO, A.E. 1993. El control biológico como un componente en un programa de manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei*. Págs 171-174 En: Memorias del Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología 20. SOCOLEN. Cali.
- GLARE, T. R.; INWOOD, A. J. 1998. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycological Research* 102 (2): 250-256
- MAURER, P.; COUTEUDIER, Y.; GIRARD, P. A.; BRIDGE, P. D.; RIBA, G. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research* 101 (2): 159-164.
- McDONALD, B. A. 1997. The population genetics of fungi: Tools and techniques. *Phytopathology* 87 (4): 448 - 453.
- MUGNAI, L.; BRIDGE, P.D.; EVANS, H.C. 1989. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycological Research* 92: 199-209.
- NEI, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 76:5269-5275.
- NEUVEGLISE, C.; BRYOO, Y.; VÉRCAMBRE, B.; RIBA, R. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research* 98:322-328.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J. L. 1991. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 57:172-176.
- POPRAWSKI, T.J.; RIBA, G.; JONES, W.A.; AIOUN, A. 1988. Variation in isoesterase profiles of geographic populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates from *Sitona weevils* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 17: 275-279.
- POSADA, F.J. 1993. Control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) con hongos. Págs. 137-151. En: Memorias del Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 20. SOCOLEN. Cali.
- POSADA, F.J.; VELEZ, P.E. 1997. Registro de hospedantes y aislamientos del hongo *Beauveria bassiana* en la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé. Págs 80-81. En: Resúmenes del Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 24. SOCOLEN. Pereira.
- RIVERA, M. A.; BRIDGE, P. D.; BUSTILLO, A. E. 1997. Caracterización bioquímica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* procedentes de la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Revista Colombiana de Entomología* 23 (1-2): 51-57.
- SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman. San Francisco. U.S.A. 450 p.
- St LEGER, R.J.; ALEE, L.L.; MAY, R.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. 1992a. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycological Research* 96:1007-1015.
- St LEGER, R. J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. 1992b. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 60:89-101.
- URTZ, B.E.; RICE, W.C. 1997. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. *Letters in Applied Microbiology* 25: 405-409.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531 - 6535.
- ZOLAN, M.E.; PUKKILA, P.J. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6: 195-200.