



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**LIC. QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL**

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DEL GEN BbBEAS DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS.”**

**CORRESPONDIENTE AL PROYECTO GENÉRICO: OBTENCIÓN DE MATERIAS  
PRIMAS, PRINCIPIOS ACTIVOS, MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS.**

**ALUMNO: ISMAEL SEDANO VARGAS**

**MATRICULA: 2133026885**

**ASESORES:**

**DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**

**DRA. ANGÉLICA GUTIERREZ NAVA**

**Lugar de realización: Laboratorio de Biotecnología y laboratorio de Ecología  
Microbiana de la Unidad interdisciplinaria de Investigación, Docencia y Servicio  
(UIDIS) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.**

**Periodo de realización: Junio de 2017**

**Fecha de terminación: Diciembre de 2017**

**DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**

**DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIERREZ NAVA**

## RESUMEN

Los hongos entomopatógenos son definidos como aquellos organismos con la capacidad de atacar y parasitar insectos a través de su capacidad de producir distintas sustancias (Gallou, 2016). La Beauvericina, es un un producto del metabolismo del hongo *Beauveria bassiana* (Wang et. al, 2012) y su síntesis ocurre a través de una serie de reacciones en las que se incluye la participación de la enzima de la Beauvericina sintetasa, de la cual, se ha caracterizado al gen *BbBEAS* como el responsable de la codificación de esta enzima (Lobo, 2015).

En este proyecto se identificaron molecularmente distintas cepas de hongos entomopatógenos que corresponden al cepario del laboratorio de biotecnología de la UIDIS de la Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Xochimilco), así como también se determinó su capacidad de expresión del gen *BbBEAS*.

Mediante el análisis molecular de la región ITS, se confirmó el género y especie de cinco cepas de hongos homologados con los géneros pertenecientes *Beauveria*, *Isaria* y *Metarhizum*. Los resultados fueron comparados con la información proporcionada por la base de datos de secuencias genéticas GeneBank® y se determinó que 4 de las 5 cepas coincidieron con la especie con la cual se les había denominado previamente al proyecto, coincidiendo con una homología del 99 al 100% con su especie correspondiente. La quinta cepa, denominada como *I. fumosorosea*, fue identificada como *I. javanica*. Esta identificación coincide con discusiones que relacionan similitudes filogenéticas entre las dos especies y concluyen que se trata de una sola (*I. javanica*). Adicionalmente, se identificó la presencia del gen *BbBEAS* en el total de las cepas estudiadas mediante la comparación con un control positivo a la presencia de este gen.

# INDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO.....	6
Hongos entomopatógenos.....	6
Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.....	6
<i>Metarhizium robertsii</i> .....	7
<i>Isaria javanica</i> e <i>Isaria fumosorosea</i> .....	8
<i>Beauveria bassiana</i> .....	8
<i>Beauvericina</i> .....	8
Biosíntesis de la beauvericina y la Beauvericina Sintetasa.....	10
Los genes ribosomales.....	12
La región ITS.....	12
El gen BbBEAS.....	13
Extracción de ADN.....	13
Cuantificación de ácidos nucleicos.....	14
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
Electroforesis en gel de agarosa.....	16
Purificación de productos de PCR.....	16
Secuenciación.....	16
OBJETIVOS.....	19
OBJETIVO GENERAL:.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Crecimiento de cultivos multiespóricos.....	20
Obtención de cultivos monospóricos.....	21
Viabilidad de las cepas monospóricas.....	21
Extracción de ADN.....	22
Cuantificación de ADN.....	22
Electroforesis en gel de agarosa.....	22

Amplificación de las regiones ITS .....	23
Amplificación del gen BbBEAS de la Beauvericina sintetasa.....	24
Purificación de los productos de PCR.....	25
Secuenciación de los genes .....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Viabilidad.....	26
Obtención del ADN.....	27
Identificación molecular de los hongos entomopatógenos.....	30
<i>M. Robertsii</i> Xoch 8.1.....	30
<i>M. robertsii</i> CuJ. 5.1.....	31
<i>I. javanica</i> (CHE-CNR-CB303).....	32
I. Fumosorosea (ARSEF3302).....	32
<i>B. bassiana</i> Tac 1.1.....	33
Identificación del gen BbBEAS.....	35
OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS .....	37
CONCLUSIONES .....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXOS .....	47
Preparación de soluciones .....	47

## INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos son aquellos hongos que parasitan insectos y juegan un importante rol en el control de la propagación de estas comunidades, el uso de hongos entomopatógenos para controlar las plagas ha tenido un importante impacto económico **(Sabbahi, 2009)**, y han sido una clave pieza clave en la disminución del uso de pesticidas, de esta forma, el empleo de estos microorganismos es una alternativa ecológica para el ambiente **(Fernandes, 2006)**. La importancia del estudio de los hongos entomopatógenos se ha incrementado debido al descubrimiento en la producción de distintas sustancias de carácter peptídico que fungen como parte de los mecanismos para parasitar y matar insectos, estas mismas sustancias han sido caracterizadas como responsables de desempeñar distintas funciones biológicas de interés farmacéutico tales como antibióticas, antifúngicas, antiproliferativas de células cancerígenas e inhibitorias de la motilidad de dichas células.

Una de las sustancias de mayor interés es la Beauvericina, un ciclohexadepsipéptido ionóforo proveniente de distintas cepas de *B. bassiana*, que transporta cationes monovalentes a través de membranas como transportador libre acoplado a fosforilación oxidativa. La beauvericina ha presentado una actividad anti proliferativa de amplio espectro contra diversas líneas de células humanas cancerosas, induciendo apoptosis **(Yuquan xu, 2008)**. A través de las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha demostrado que el gen *BbBEAS* codifica para la producción de la enzima beauvericina sintetasa, responsable de la producción de beauvericina en las cepas de *B. bassiana*, así mismo, se ha demostrado la producción de la beauvericina por diversas cepas provenientes de diferentes géneros de hongos entomopatógenos, tales como *Metarhizium* **(Fernandes, 2005)** e *Isaria* **(Luangsa-Ard, 2009)**. Entre las cepas más importantes y más usadas en el mundo son las provenientes de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*.

El presente trabajo tiene como objetivo establecer la importancia del estudio biotecnológico de los hongos entomopatógenos como fuente de sustancias de interés farmacéutico mediante la determinación de géneros y especies de diferentes cepas de hongos entomopatógenos que se encuentran en el laboratorio de biotecnología de la

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco a través de la descripción y empleo de técnicas moleculares como la extracción de ADN y la amplificación y secuenciación de los genes ITS usando oligonucleótidos universales; la caracterización en la producción del gen BbBeas de la beauvericina sintetasa de diferentes cepas mediante la utilización de la técnica de PCR y la purificación de los productos correspondientes.

## MARCO TEÓRICO

### ***Hongos entomopatógenos***

Los hongos entomopatógenos son definidos como aquellos organismos con la capacidad de atacar insectos, la cual depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-hospedero (**Pucheta, 2006**). También se han definido como parásitos obligados o facultativos de insectos, con una alta capacidad de esporulación y sobrevivencia, sus mayores ventajas están en la manipulación y adaptación a diferentes ambientes; especificidad y capacidad de penetración directa a través del tegumento de los insectos (**García, 2008**).

Los hongos entomopatógenos constituyen uno de los grupos de mayor importancia del control biológico de insectos y se encuentran en la división Eumycota y en las subdivisiones: Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina. Se cococen aproximadamente 100 géneros que constituyen alrededor de 750 especies de hongos entomopatógenos (**Pucheta, 2006**). Entre los más importas importantes se encuentran *Metarhizum*, *Beauveria*, *Isaria*, *Aschersonia*, *Entomophtora*, *Zoophtora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Fusarium*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*. La producción de hongos para el control de plagas implica una amplia investigación donde se involucran disciplinas como la patología, ecología, genética y fisiología. Es bien conocido que estos microorganismos producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, químicamente diversos, algunos de los cuales son muy potentes desde el punto de vista biológico. La variedad de las mismas proporciona una fuente para la producción de extractos e útiles en un amplio campo de aplicaciones, pudiendo tener múltiples usos en las industrias médico-farmacéutica, alimentaria, etc (**Borges, 2010**).

### ***Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos***

En general, las fases que desarrollan los hongos sobre los insectos son: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. Los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes entomopatógenos, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo, pudiendo ocurrir la infección por contacto o por adhesión de las esporas a las partes bucales.

Algunos atacan a gran cantidad de especies distintas de insectos, y dependen generalmente de las condiciones ambientales de temperatura (25° C) y elevada humedad relativa para que su desarrollo y acción patogénica sea la adecuada (**Borges, 2010**).

El proceso inicia cuando la espora o conidio se adhiere a la cutícula del insecto, luego se produce un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo se da la penetración al interior del cuerpo del insecto en la que participa un mecanismo físico y uno químico. El mecanismo físico consiste en la presión ejercida por la hifa, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula.

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente y a partir de la cual se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto (**García, 2008**).

### ***Metarhizium robertsii***

*M. robertsii* (anteriormente clasificado como *Metarhizium anisopliae*) un habitante común de los suelos en todo el mundo y se ha estudiado y utilizado como un patógeno de insectos para el control biológico (**Sasan, 2012**). *M. robertsii* es un hongo patógeno de insectos que tiene un amplio rango de hospederos matando a más de 200 especies de insectos. El hongo se ha desarrollado y aplicado como un prometedor agente de control biológico de insectos contra diferentes plagas. Infecta a los insectos mediante la producción de apresorios para penetrar las cutículas de los insectos y luego colonizar los hemocelos de éstos. El hongo también es un prolífico productor de diversos metabolitos secundarios con actividades contra insectos, hongos, bacterias y células cancerosas (**Gao, 2011**).

*M. robertsii* se caracteriza por ser mesófilo, con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30°C, una máxima de 32 a 35°C y una mínima de 10 a 12°C (21). Las colonias de en agar dextrosa-papa presentan un crecimiento de micelio con borde blanco y con grupos de conidióforos que se tornan coloreados al multiplicarse las



conidias, con diferentes variaciones de color: de olivo a amarillo verdoso, de olivo a verde, decolorada en el envés, de color miel o amarillo pálido y pigmento amarillo que se difunde en el medio (**Padilla, 2000**).

### ***Isaria javanica e Isaria fumosorosea***

**Simazu (2010)** reporta que las características morfológicas de *I. javanica* corresponden a conidios blancos o grisáceos en masa, fusiformes a ovalados, que coinciden con los datos reportados recientemente por **Gallou, 2016**, pues *I. javanica* muestra colonias blancas, que se vuelven gris pardusco cuando maduran.

*Isaria fumosorosea* se encuentra comúnmente en el suelo, pero se ha informado sobre plantas, en el agua y, con menor frecuencia, en el aire en todos los continentes y se ha aislado de más de 40 especies de artrópodos, que representan 10 órdenes (**Zimmerman, 1982**). Los investigadores han tenido dificultades para estudiar *I. fumosorosea* en el laboratorio debido a la variación en las características morfológicas y el comportamiento, pero se ha descrito como un hongo de crecimiento rápido, con colonias miceliales blancas que pueden cambiar a púrpura o rosa. Las fialidas tienen forma de matraz y los conidios son cilíndricos a fusiformes.

### ***Beauveria bassiana***

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies y las colonias de *B. bassiana* en agar dextrosa-papa son algodonosas a polvorientas, blancas y a medida que pasa el tiempo se vuelve amarillenta y cremosa. Se caracteriza por presentar conidióforos sencillos, aproximadamente de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro están irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene el conidio, la cual se presenta en forma de zig-zag, después de que varias conidios se producen; éstos son hialinos, redondeados a ovoides y unicelulares, midiendo aproximadamente de 2 a 3 X 2 a 2.5  $\mu\text{m}$  (**Gonzales-Castillo, 2011**).

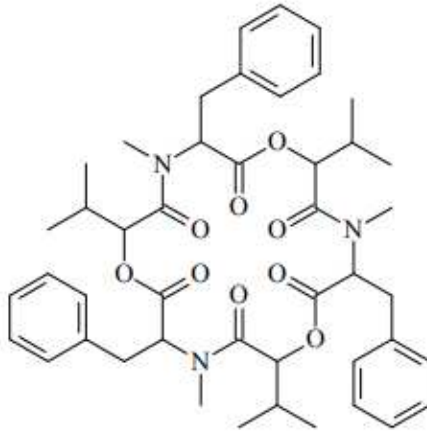
### ***Beauvericina***

Fue el primer compuesto de esta naturaleza en ser caracterizado, extraído del micelio de *B. bassiana* y posteriormente se ha aislado de diferentes especies de *Fusarium* y

*Paecilomyces* (Yuquan, 2008). Se conoce que es un agente ionóforo capaz de formar complejos de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que permiten el incremento de la permeabilidad natural y artificial de las membranas, induciendo la deshidratación de los tejidos por pérdida de líquido de las células. Se supone que esto sería la causa principal de la muerte del insecto (Yuquan, 2008). Además de ser un agente insecticida, la beauvericina ha presentado características antitumorales, antibióticas, antifúngicas y antivíricas.

Dentro de sus propiedades antitumorales en distintas líneas celulares, se describe un mecanismo en el que, en primer lugar, la beauvericina induce el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular hacia el citosol, lo que conduce a un aumento del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Un "sistema de señal desconocido" se activa con un alto nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  y los resultados son la liberación de *Cyt c* de la mitocondria. Finalmente, la caspasas (3 y 9) que *Cyt c* activa desencadenan la apoptosis. Hasta la fecha, no está claro como un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular regula el sistema de señal que resulta en muerte celular.

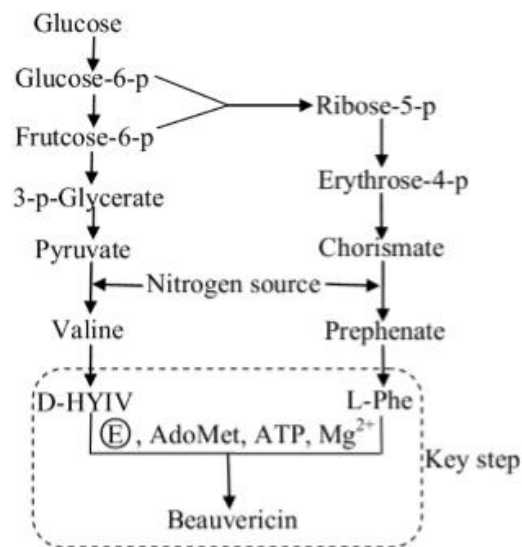
La beauvericina tiene una fuerte actividad antibacteriana contra bacterias patógenas para humanos, animales y vegetales ya sean Gram-positivas y Gram-negativas. Es posible que otros organelos celulares diferentes a la pared celular, como el ribosoma o el núcleo, o ciertos sistemas enzimáticos sean los objetivos de la beauvericina. A pesar de su amplio espectro antibacteriano, la actividad antifúngica de beauvericina es escasamente reportada.



**Figura 1.** Estructura de la beauvericina

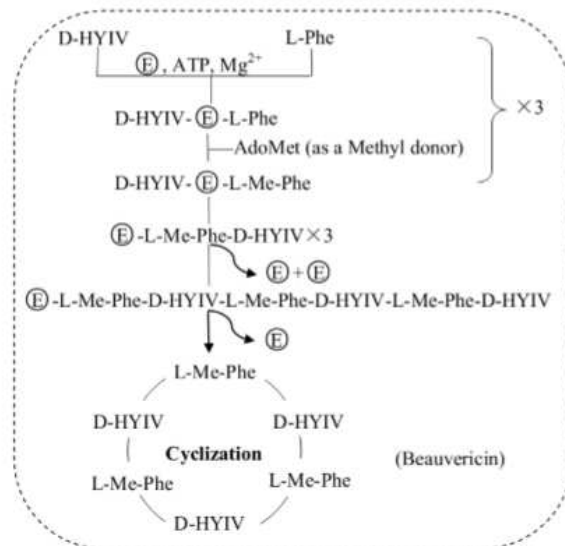
***Biosíntesis de la beauvericina y la Beauvericina Sintetasa***

La biosíntesis de la beauvericina comienza con una fuente de nitrógeno, la cual podría ser cualquier aminoácido que ofrezca nitrógeno, como L-fenilalanina o valina, además de una hexosa o una pentosa (**figura 2**).



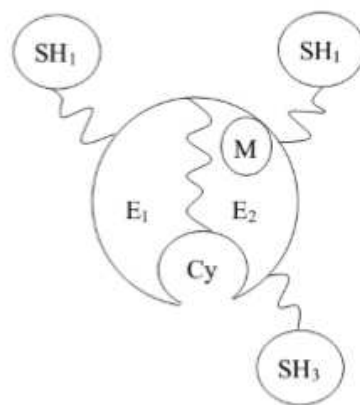
**Figura 2.** Ruta biosintética de la beauvericina, tomada de Wang, et. al., 2012.

La ruta biosintética, en su fase terminal (figura 3), depende estrictamente de la presencia de L-fenilalanina (L-Phe), el ácido hidroxiácido D-hidroxiisovalérico (D-HYIV), ATP/Mg<sup>2+</sup>, S-adenosil-metionina (AdoMet) y la beauvericina sintetasa. AdoMet es la fuente del grupo metilo para los residuos de L-fenilalanina.



**Figura 3.** Fase terminal de la biosíntesis de la beauvericina, tomada de Wang, et. al., 2012.

La beauvericina sintetasa es una enzima multifuncional que cataliza la formación de un depsipéptido y es una única cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 250 kDa. La beauvericina sintetasa cataliza la biosíntesis a través de un mecanismo no ribosómico de tipo tiol. En la figura 3 se resumen los cinco intermedios en el paso clave de la biosíntesis de beauvericina. En primer lugar, dos módulos de beauvericina sintetasa (figura 4) se activan mediante L-Phe y D-HYIV, que se unen covalentemente al brazo de 4'-fosfopanteinilo unido a la enzima como tioésteres. A continuación, los residuos de L-fenilalanilo son N-metilados por AdoMet. En tercer lugar, se forma un enlace peptídico. En cuarto lugar, se sintetiza un intermedio hexadepsipéptido lineal. En el paso final, el hexadepsipéptido lineal se cicla para formar beauvericina.



**Figura 4.** Estructura de la beauvericina sintetasa, tomada de Wang, et. al., 2012. E1 es el módulo D-HYIV; E2 es el módulo L-Phe; SH1,2,3 son los residuos 4'-fosfopanteteína correspondientes a D-HYIV, L-Phe, y el aceptor hexadepsipéptido lineal; M es el N- dominio de metiltransferasa; Cy es la cavidad de ciclación.

### ***Los genes ribosomales***

La comparación de las secuencias de los genes ribosomales permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía de los hongos, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de los mismos. Los genes para el ARN ribosomal están entre los genes conocidos más estables e inmutables. En particular, los genes de la unidad pequeña del ARN (16S en procariontes o 18S en eucariontes) se usan extensivamente para comparar organismos vivos, tan diversos como bacterias, hongos y humanos. El reino de los hongos se estima en 1 a 5 millones de especies existentes y comprende un conjunto ecológicamente heterogéneo, y los datos moleculares (ADN) han surgido como una fuente de información integral en la búsqueda del conocimiento micológico (**Bengsston-Palme, 2013**). Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de los hongos, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

### ***La región ITS***

El locus más popular para estudios micológicos basados en el ADN a nivel subgenérico y, por lo tanto, para la identificación de especies, es la región espaciadora transcrita interna (ITS) de la unidad de repetición ribosómica nuclear (**Nilsson, 2008**). La ITS, que cuenta con 550 pares de bases (pb) es muy variable y se aplica para descifrar la

inferencia filogenética a nivel de género, así como la delimitación de especies e identificación de las mismas (**Bengtsston-Palme, 2013**). Actualmente, alrededor de 222,000 secuencias de ITS fúngicas de longitud completa se encuentran en el GenBank, y el 56% están asociadas con un binominal en latín, que representa alrededor de 15,500 especies y 2,500 géneros, derivados de aproximadamente 11,500 estudios científicos en más de 500 revistas científicas (**Schoch, 2012**).

El uso de la región ITS para la identificación molecular de hongos se remonta a principios de la década de 1990 (**Seifert, 2009**). La región está compuesta por los dos espaciadores altamente variables ITS1 e ITS2 que, conjuntamente o por separado, son a menudo especies específicas, y el gen 5.8S muy conservado e intercalado. La conservación de la secuencia en los genes próximos, junto con numerosas copias del operón ribosómico, hace que el diseño de los primers y la amplificación por PCR de la región ITS sean directos incluso a partir de sustratos de baja cantidad de ADN.

### ***El gen BbBEAS***

Como se ha mencionado, la biosíntesis de la beauvericina es completamente conocida molecularmente, y se ha caracterizado al gen *BbBEAS* como el responsable de la codificación de la beauvericina sintetasa (**Lobo, 2015**), que como se ha mencionado, se aisló de *B. bassiana* y se confirmó que era responsable de la biosíntesis de beauvericina mediante disrupción dirigida (**Yuquan, 2008**). En el mismo estudio realizado por Xu en 2008, se demuestra la participación directa del gen *BbBEAS* para la codificación de la beauvericina sintetasa, en dicho estudio, la producción de beauvericina se detuvo específica y completamente en todos los aislamientos de la cepa de *B. bassiana* mediante un knockout del gen *BbBEAS*.

### ***Extracción de ADN***

El aislamiento de ADN intacto es esencial para muchas técnicas utilizadas en el análisis de expresión génica como lo es la PCR. A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así

como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el manejo del producto de la extracción (**Velázquez et. al, 2008**).

A partir de los años 90 se introdujeron al mercado combos o kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un ADN libre de inhibidores y contaminación. Los kits de extracción de ADN son reactivos listos para usarse directamente desde diversos tejidos. La utilización de diversos kits para la extracción de ADN ha permitido estandarizar técnicas y facilitar la obtención de ADN maximizando la eficiencia del proceso y el rendimiento posterior. En general, los protocolos tradicionales consisten en cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y reconstitución del ADN (**Dundass, 2008**).

### ***Cuantificación de ácidos nucleicos***

Una característica del ADN es que sigue las leyes de Lambert-Beer y absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm, permitiendo estimar su concentración mediante espectrofotometría. Hoy en día, existen diversos equipos que permiten determinar la concentración de los ácidos nucleicos en solución, para esto, se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/μl). En el caso de algunos equipos como el espectrofotómetro Nanodrop, no es necesario diluir la muestra ya que el equipo proporciona directamente la concentración en ng/μl. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 1.5 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como disolventes (**Velázquez, 2008**).

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias de ADN específicas, utilizando dos cebadores de oligonucleótidos que se hibridan con cadenas opuestas y flanquean la región de interés en el ADN diana (Erlich, 1989). La técnica fue ideada por Kary B. Mullis (1985) permite multiplicar *in vitro* una región específica del ADN más de un millón de veces. La especificidad de la reacción se consigue usando un par de pequeños fragmentos de ADN (de 15 a 30 bases) que son complementarios a las secuencias que flanquean al segmento de ADN que se desea amplificar y que actuarán como iniciadores o cebadores. Es un método para obtener múltiples copias de fragmentos de ADN, utiliza la enzima polimerasa estable al calor y ciclos de calentamiento y enfriamiento para seccionar y separar sucesivamente las hebras de ADN y utilizar los fragmentos obtenidos como plantillas para la formación de ADN nuevo completo (Carranza, 2006), como se muestra en la figura 6. Debido a su gran sensibilidad, la PCR provee de una herramienta que revolucionó la biología molecular permitiendo fidelidad y discriminación en las determinaciones y procedimientos que requieren de la utilización de ADN genético.

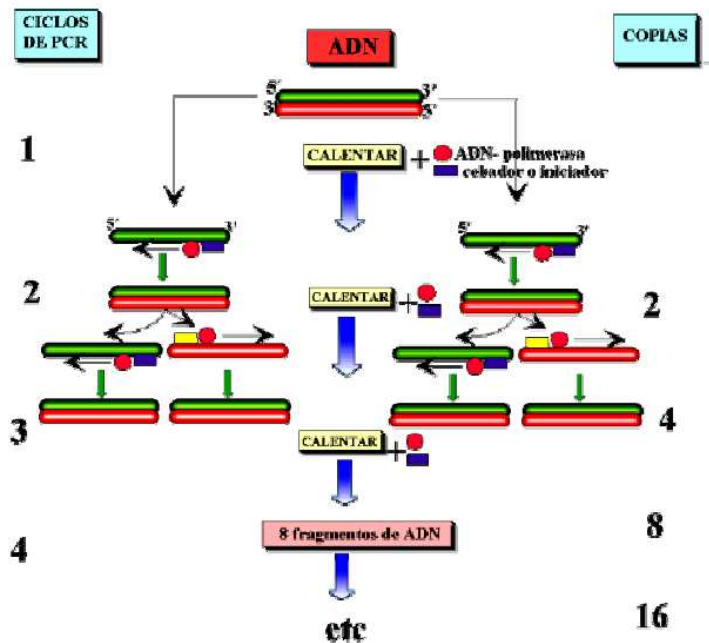


Figura 5. Esquema de las etapas de la PCR, tomado de Carranza, 2006



### ***Electroforesis en gel de agarosa***

Mediante la electroforesis es posible separar moléculas biológicas dependiendo de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico (**García, 2000**). La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa donde los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño, carga, forma y otras propiedades fisicoquímicas (**Kheterpal, 1999**). La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa donde las bandas cercanas al pozo de inyección indican la integridad del ADN analizado. Mientras que las bandas de ADN fragmentado en el gel, indica que el ADN se ha degradado en el proceso de extracción.

### ***Purificación de productos de PCR.***

La mezcla de PCR debe ser purificada con objeto de eliminar subproductos, cebadores y dNTPs contaminantes que impidan la secuenciación. La secuenciación de fragmentos de pequeño tamaño es algo problemática por lo que se recomienda que los productos sean al menos de 150 pb. Los fragmentos más pequeños se pueden comportar como primers y son más difíciles de purificar con un buen rendimiento.

Es necesario el aislamiento de la banda de interés mediante electroforesis en gel de agarosa. Además, permite la eliminación de primers y dNTPs. Se trata de correr el producto de PCR en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, cortar la banda correspondiente (procurar no contaminar la banda con oligos y cortar la menor cantidad de agarosa posible) y fundir la agarosa. Finalmente, extraer y purificar el ADN con sucesivos pasos de disolventes orgánicos. Alternativamente se pueden usar kits comerciales para la purificación (**Werle, 1994**).

### ***Secuenciación***

La secuenciación de ADN es el proceso que determina la cadena de bases de los nucleótidos (As, Ts, Cs y Gs) de un fragmento de ADN. Aunque la mayoría de las técnicas

se basan en el método de Sanger (1975), en el que el ADN blanco es copiado muchas veces y se forman fragmentos de diferentes longitudes. Nucleótidos fluorescentes que actúan como "terminadores de cadena" marcan los extremos de los fragmentos y permiten la determinación de la secuencia. Hoy en día, con el equipo y los materiales adecuados, secuenciar un fragmento pequeño de ADN es relativamente sencillo y las técnicas de secuenciación de nueva generación son estrategias nuevas a gran escala que aumentan la velocidad y reducen el costo de la secuenciación del ADN.

La muestra de ADN que se secuenciará se combina en un tubo con el cebador, la ADN polimerasa y los nucleótidos del ADN (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). También se añaden los cuatro nucleótidos didesoxi terminadores de la cadena, marcados con su pigmento, pero en concentraciones más pequeñas que los nucleótidos normales.

Primero se calienta la mezcla para desnaturalizar la molécula de ADN (separar las cadenas) y luego se enfría para que el cebador pueda unirse al molde de cadena sencilla. Una vez que se ha unido el cebador, se eleva la temperatura para que la ADN polimerasa pueda sintetizar ADN nuevo a partir del cebador. La ADN polimerasa añadirá nucleótidos a la cadena hasta que aleatoriamente agregue un nucleótido didesoxi en lugar de uno normal. A partir de ese momento, no es posible agregar más nucleótidos y la cadena termina con el nucleótido didesoxi.

Este proceso se repite cierto número de ciclos. Cuando los ciclos terminan, está prácticamente garantizado que se ha incorporado un nucleótido didesoxi en cada una de las posiciones del ADN blanco en al menos una reacción. Es decir, el tubo contendrá fragmentos de diferentes longitudes que terminan respectivamente en cada una de las posiciones de los nucleótidos del ADN original. Los extremos de los fragmentos tendrán el pigmento que indica su nucleótido final (**Obenrader, 2003**).

Cuando la reacción termina, los fragmentos se hacen pasar a través de un tubo largo y delgado que contiene una matriz de gel en un proceso llamado electroforesis capilar en gel. Los fragmentos cortos se mueven rápidamente a través de los poros del gel, mientras que los fragmentos largos se mueven más lentamente. Cuando cada fragmento cruza la

"línea de meta" al final del tubo, un láser lo ilumina y permite la detección del pigmento asociado.

El fragmento más pequeño (que termina justo un nucleótido después del cebador) es el primero que cruza la línea de meta, seguido por el próximo fragmento más pequeño (que termina justo dos nucleótidos después del cebador) y así sucesivamente. De esta manera, se puede reconstruir nucleótido por nucleótido la secuencia del fragmento de ADN original a partir de los colores de los pigmentos registrados uno tras otro por el detector. Los datos registrados por el detector consisten en una serie de picos en la intensidad de la fluorescencia, como se muestra en el cromatograma anterior. La secuencia del ADN se lee a partir de los picos en el cromatograma (**Obenrader, 2003**).

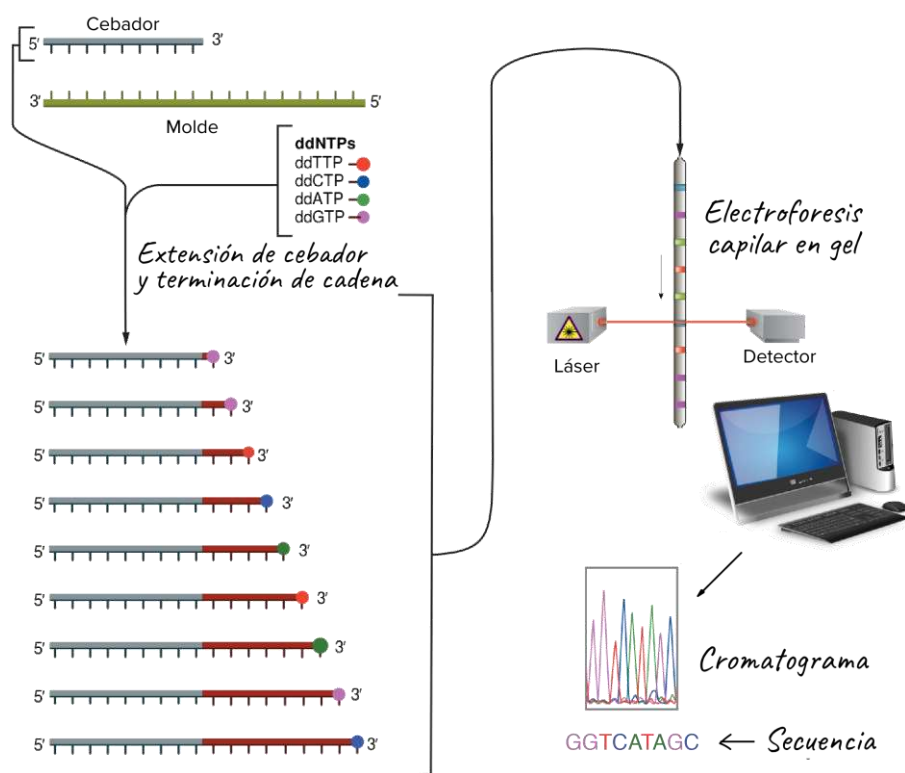


Figura 6. Diagrama de secuenciación del ADN, tomado de khanacademy.org.

## OBJETIVOS

### **OBJETIVO GENERAL:**

Identificar molecularmente cepas del hongo *Beauveria bassiana* así como el gen perteneciente a la beauvericina sintetasa (BbBEAS).

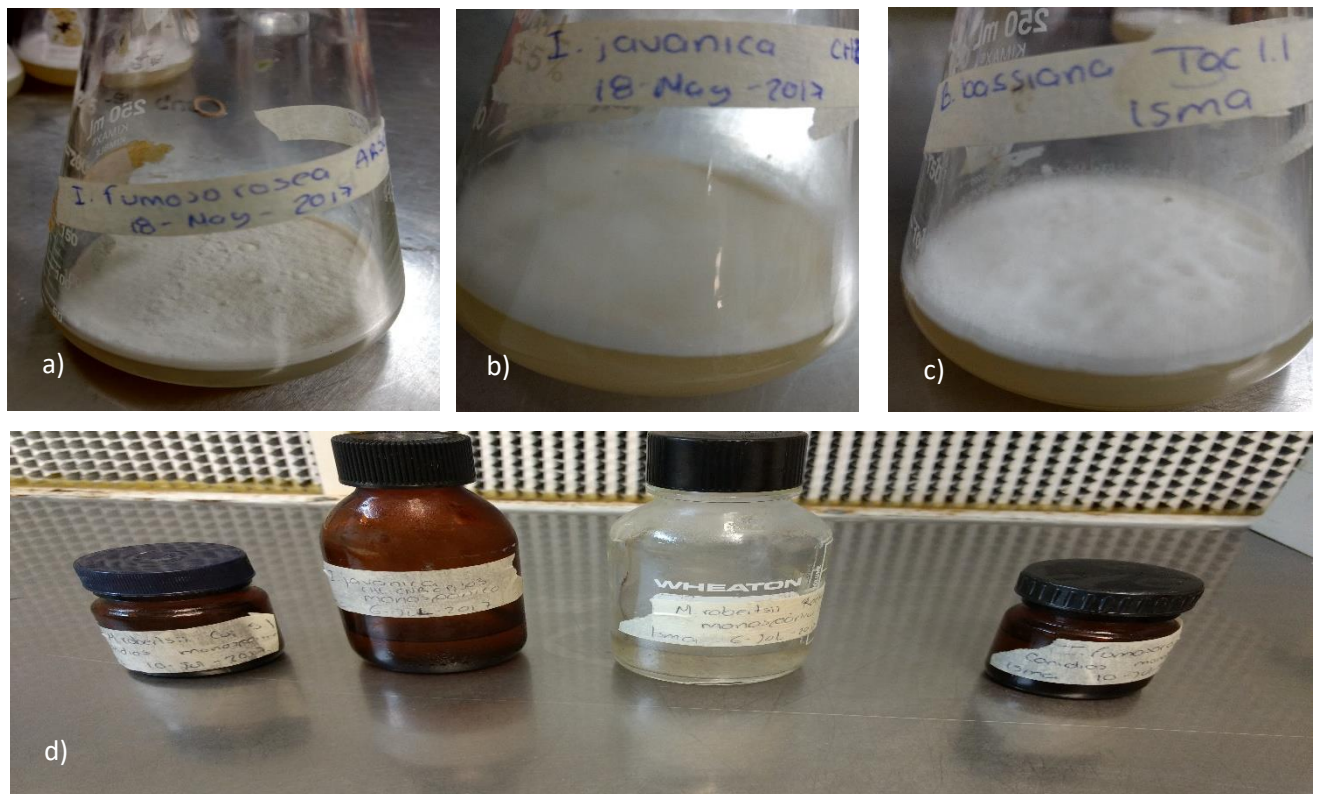
### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Identificar molecularmente a los hongos entomopatógenos mediante la amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y de las secuencias ITS.
- Identificar y amplificar el gen de la beauvericina sintetasa en cepas de hongos entomopatógenos mediante técnicas de extracción de ADN, PCR y electroforesis en gel de agarosa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Crecimiento de cultivos multiespóricos.**

Las cepas de *Metarhizium robertsii* (Xoch. 8.1), *Metarhizium robertsii* (Cuj. 5.1), *Isaria javanica* (CHE-CNR-CB303), *Isaria fumosorosea* (ARSEF3302) y *Beauveria bassiana* Tac. 1. 1 fueron cultivadas en 50 mL de agar dextrosa-papa en matraces Erlenmeyer de 250 mL durante 15 días en una estufa a 25°C para obtener un micelio abundante. Los micelios fueron recolectados en frascos de vidrio estériles formando una suspensión con 50 mL de Tween 80 al 0.05%, posteriormente, se realizó el conteo de conidios por mililitro en cámara de Neubauer.



**Figura 7.** Ejemplo de cultivo de hongos entomopatógenos en agar dextrosa-papa en matraces Erlenmeyer; a) *I. fumosorosea*, b) *I. javanica*, c) *B. bassiana*, d) suspensión de hongos entomopatógenos en Tween 0.05%.

### **Obtención de cultivos monospóricos.**

Las suspensiones de cepas multispóricas fueron sembradas en cajas Petri a distintas diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000), para disminuir el número de conidios por caja y lograr obtener colonias aisladas para cada cepa, las cajas fueron incubadas en una estufa a 25°C durante 5 días. Para cada cepa se seleccionó una colonia aislada y se resembraron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo agar dextrosa-papa. El micelio de cada cepa se dejó crecer durante 15 días y se recogió con una solución de Tween 80 al 0.05% en frascos de vidrio estériles. Posteriormente, se realizó el conteo de conidios por mililitro de suspensión en cámara de Neubauer.



**Figura 8.** Siembra de suspensiones de hongos entomopatógenos en distintas diluciones para el cultivo de cepas monospóricas; a) *M. robertsii* Xoch. 8.1, b) *I. javanica*, c) *B. bassiana*, c), *M. robertsii* Cuj. 5.1.

### **Viabilidad de las cepas monospóricas.**

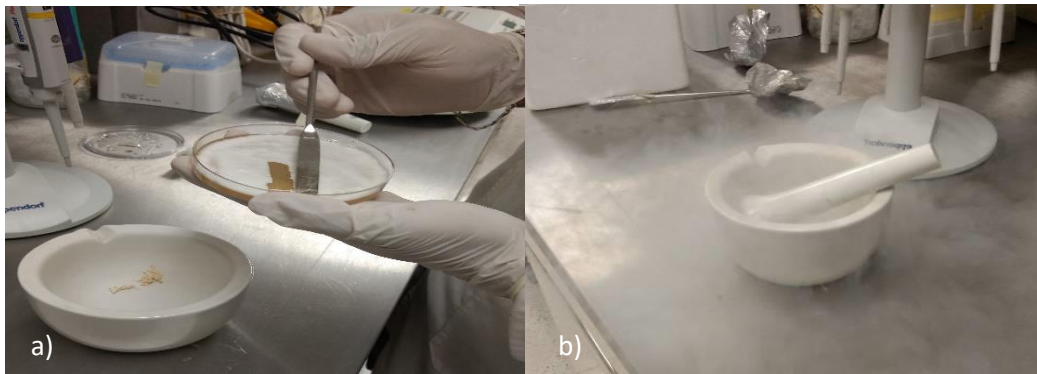
Se realizaron distintas diluciones de las suspensiones de cultivos monospóricos como se muestra en la tabla. De dichas diluciones, se tomaron 200  $\mu$ L y se sembraron en cajas Petri con agar dextrosa-papa. las cajas se introdujeron a una estufa a 25°C y los cultivos se incubaron durante 5 días.

**Tabla 1. Viabilidad de cultivos monospóricos.**

CEPA	Concentración de la suspensión (conidios/ mL <sup>-1</sup> )	Dilución
<i>M. robertsii</i> Xoch. 8.1	$6 \times 10^7$	1:20,000
<i>M. robertsii</i> Cuj. 5.1	$1.68 \times 10^8$	1:20,000
<i>I. javanica</i>	$1.34 \times 10^7$	1:1000
<i>I. fumosorosea</i>	$5.14 \times 10^8$	1:100000
<i>B. bassiana</i>	$7.31 \times 10^7$	1:20,000

### ***Extracción de ADN***

Cada cepa se sembró por quintuplicado adicionando 200  $\mu$ L de la suspensión de conidios de los cultivos monospóricos en agar dextrosa papa contenido en cajas Petri y se incubaron a 25°C durante 15 días. El micelio se recolectó con espátula y las células se lisaron con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. El ADN se extrajo mediante el protocolo del kit de extracción de ADN DNeasy Plant mini Kit QIAGEN®. Se evaluó la integridad y calidad del ADN obtenido con una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.



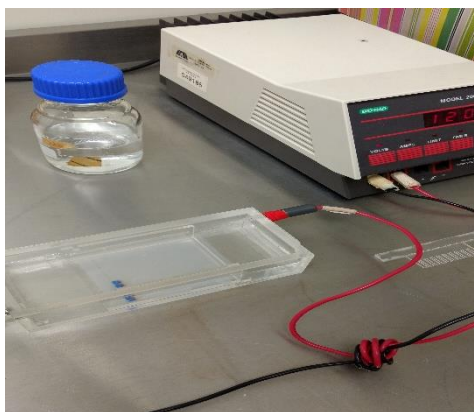
**Figuras 9.** Procedimiento para la extracción de ADN de hongos entomopatógenos; a) recolección del micelio, b) congelación con nitrógeno.

### ***Cuantificación de ADN***

El ADN íntegro obtenido de cada cepa se ajustó a una concentración de 30 ng/mL y se resguardó en congelación, la concentración del ADN obtenido fue determinado mediante un equipo Nanodrop® de la marca Thermo scientific. Se cuantificó 1  $\mu$ L de la solución de ADN, empleando como blanco agua inyectable.

### ***Electroforesis en gel de agarosa***

La integridad del ADN extraído y de los productos de PCR se determinó realizando electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Se depositan 5  $\mu$ L de solución de DNA y 1.5  $\mu$ L de productos de PCR para correrlos en el gel de agarosa. La electroforesis se corre a 80V durante 1 minuto y posteriormente a 100V.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa.

### ***Amplificación de las regiones ITS***

La región ITS del cultivo monospóricos se amplificó utilizando los oligonucleótidos universales ITS1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3') y ITS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') y las reacciones se realizaron en tubos Eppendorf de 0.2 mL en un volumen total de reacción de 50  $\mu$ L. Cada reacción tiene 10  $\mu$ M de cada iniciador, 1mM de una mezcla de dNTPs, 1 unidades de *Taq* polimerasa (Thermo scientific ®) contenidos en 5  $\mu$ L de buffer de PCR a una concentración de 10X con 20 mM de MgCl<sub>2</sub> (Thermo scientific ®), aproximadamente 40ng de ADN genómico (variable de acuerdo a la concentración de ADN obtenido en la extracción) y agua inyectable (libre de nucleasas) para completar el volumen a 50  $\mu$ L de reacción. Las reacciones se realizaron en un termociclador TGRADIENT (BIOMETRA®). Las condiciones de reacción fueron: un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos consistentes en: de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento a 57 °C, 45 segundos de extensión a 72 °C y un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72 °C. Las condiciones específicas para cada cepa se encuentran en la siguiente tabla.



**Tabla 2.**  $\mu\text{L}$  por componente agregados a la reacción de PCR (Volumen final de 50  $\mu\text{L}$ ).

Componente de la reacción ( $\mu\text{L}$ )	<i>M. robertsii</i> Xoch. 8.1	<i>M. robertsii</i> Cuj. 5.1	<i>I. javanica</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>B. bassiana</i>
Agua libre de nucleasas	36.3	36.3	36.8	36.8	36.8
DNTPs	2	2	2	2	2
ITS 1 Primer	2	2	2	2	2
ITS 4 Primer	2	2	2	2	2
Buffer	5	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1
Taq polimerasa	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
ADN *	1.5	1.5	1	1	1

\* Es un volumen variable debido a que la concentración del ADN extraído

### **Amplificación del gen *BbBEAS* de la *Beauvericina* sintetasa.**

El gen *BbBEAS* se amplificó, empleando microtubos de 0.2 mL y un volumen de 50  $\mu\text{L}$  para cada reacción, como se indicó en la metodología para la amplificación de la región ITS. La reacción se realizó en un termociclador TGRADIENT (BIOMETRA®) y las condiciones termales de reacción fueron: un ciclo de desnaturalización de 7 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento a 57 °C, 45 segundos de extensión a 72 °C y un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72 °C. Las condiciones específicas para la amplificación del ADN de cada cepa se encuentran en la siguiente tabla:

**Tabla 3.**  $\mu\text{L}$  por componente agregados a la reacción de PCR para la amplificación del gen *BbBEAS* (Volumen final de 50  $\mu\text{L}$ ).

Componente de la reacción ( $\mu\text{L}$ )	<i>M. robertsii</i> Xoch. 8.1	<i>M. robertsii</i> Cuj. 5.1	<i>I. javanica</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>B. bassiana</i>
Agua libre de nucleasas	36.2	36.2	36.7	36.7	36.7
DNTPs	2	2	2	2	2
<i>BbBEAS</i> primer	2	2	2	2	2
<i>BbBEAS</i> primer	2	2	2	2	2
Buffer	5	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1
Taq polimerasa	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
ADN	1.5	1.5	1	1	1

### **Purificación de los productos de PCR**

Para la purificación de los productos de PCR, se realizó por octuplicado una reacción de PCR para cada cepa de hongos entomopatógenos. Las condiciones en el termociclador fueron las mismas que para la secuenciación de las regiones ribosomales ITS. Las proporciones de los componentes de la reacción para un volumen final de 50  $\mu$ L se muestran a continuación.

**Tabla 4.**  $\mu$ L por componente agregados a la reacción de PCR para la purificación de los productos.

Componente de la reacción ( $\mu$ L)	<i>M. robertsii</i> <i>Xoch. 8.1</i>	<i>M. robertsii</i> Cuj. 5.1	<i>I. javanica</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>B. bassiana</i>
Agua libre de nucleasas	35.95	35.95	35.95	35.95	35.95
DNTPs	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
ITS mix	4	4	4	4	4
Buffer	5	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1
Taq polimerasa	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
ADN	2	2	2	2	2

Los productos de la reacción se cargaron en un gel de agarosa al 2% y se realizó una electroforesis con las muestras, de la cual se recortó la banda de gel. La banda fue purificada empleando el protocolo de QIAquick PCR Purification Kit®. Los productos de PCR purificados se resguardaron en refrigeración.

### **Secuenciación de los genes**

Los productos de PCR purificados fueron enviados a la compañía MACROGEN para su secuenciación y posteriormente se comprobó la compatibilidad con el ADN en cuestión a través de la base de datos de GenBank.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Viabilidad**

La viabilidad permite determinar la eficiencia de un conidio de germinar y así formar una colonia. Para todos los casos, se obtuvieron porcentajes bajos de viabilidad de los conidios de las cepas estudiadas, excepto para *B. bassiana*, la cual demostró mantener una mejor capacidad de germinar en las condiciones del medio de cultivo, después de un periodo de mantenimiento a bajas temperaturas.

Además de esto, los porcentajes obtenidos para la viabilidad de los conidios proporciona información para dar garantía de la concentración de conidios que sea adecuada para realizar la inoculación o si es necesario utilizar las suspensiones de conidios concentrados, como fue en el caso de *M. robertsii* Xoch. 8.1, *M. robertsii* Cuj. 5.1, *I. javanica*, *I. fumosorosea*. Los resultados obtenidos para el ensayo de viabilidad y las diluciones de las suspensiones con las cuales se obtuvieron los resultados se encuentran en la tabla siguiente:

**Tabla 5.** Viabilidad

Cepa	Concentración de la suspensión (conidios/ mL <sup>-1</sup> )	Dilución	UFC en 200 µL	Viabilidad (%)
<i>M. robertsii</i> Xoch. 8.1	6x10 <sup>7</sup>	1:20,000	12	2
<i>M. robertsii</i> Cuj. 5.1	1.68x10 <sup>8</sup>	1:20,000	84	5
<i>I. javanica</i>	1.34x10 <sup>7</sup>	1:1000	68	2.537
<i>I. fumosorosea</i>	5.14x10 <sup>8</sup>	1:100000	10	0.926
<i>B. bassiana</i>	7.31x10 <sup>7</sup>	1:20,000	351	48

## Obtención del ADN

Se buscó obtener el ADN que cumpla con 3 características (integridad, pureza y concentración), para las reacciones de PCR utilizando el kit de extracción antes mencionado. Las concentraciones obtenidas para cada uno de los ADN extraídos fueron las siguientes:

**Tabla 6.** Extracción de ADN

Cepa	Concentración del ADN extraído (ng/μL)	Relación A260/280	Relación A260/230
<i>M. robertsii</i> Xoch. 8.1	14.8	2.19	3.77
<i>M. robertsii</i> Cuj. 5.1	15.5	2.10	3.90
<i>I. javanica</i>	20.1	1.86	1.86
<i>I. fumosorosea</i>	18.2	1.85	1.66
<i>B. bassiana</i>	14.6	1.85	1.56

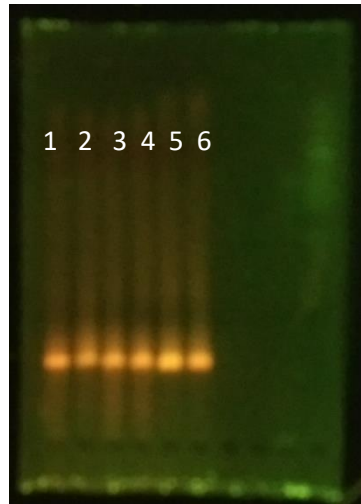
Las concentraciones del ADN obtenido fueron determinadas basándose en la capacidad de absorbancia de ADN a una longitud de onda de 260 nm. De acuerdo a diferentes opiniones, la cantidad adecuada para una reacción de PCR por cada 50 μL (volumen final de la reacción) es de 50-100 ng (**Cenis, 1992 y Cubrero et. al, 1999**). En este sentido, la cantidad de ADN recobrado para cada cepa en la extracción es adecuada, aunque según los protocolos de extracción del kit de empleado, la cantidad de ADN recobrado pudiera ser más.

La relación de absorbancias A260/280 y A260/230 se utilizó para evaluar la pureza de las muestras; Estos índices de pureza son sensibles a la presencia de contaminantes en la muestra como los disolventes y residuos de reactivos que se emplean en la extracción, debido a que compuestos aromáticos como fenoles y proteínas tienen una capacidad de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, mientras que sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, absorben a una longitud de onda de 230 nm.

Los índices entre absorbancias 260/280 para *I. javanica*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana* se encuentran dentro del rango de 1.8 y 2, lo que indica una pureza óptima en cuanto a la presencia de proteínas, los resultados para la misma relación en las cepas de *M. robertsii* Xoch. 8.1 y *M. robertsii* Cuj. 5.1 indican presencia de contaminantes, esto podría ser inferencia de algún desacierto en el procedimiento de extracción, debido a que no se retuvieron con eficiencia las proteínas en las columnas de extracción del kit empleado. Además de esto, **García (2014)** indica que un valor mayor a 2.1 podría indicar una contaminación con ARN, siendo el caso para estas dos últimas cepas mencionadas. La presencia de ARN puede ser relacionado con una deficiencia en la incubación con la RNAsa en el procedimiento de extracción.

De igual manera, la relación de absorbancias 260/230 para las cepas de *M. robertsii* Xoch. 8.1 y *M. robertsii* Cuj. 5.1 no es adecuada. Esta relación resulta mucho más variable que la relación A260/280 dependiendo de factores como la composición del buffer de resuspensión de la muestra (**García, 2014**), y debido a que la solución de elución final en el procedimiento de extracción es agua, las impurezas no se pueden atribuir a este punto en la extracción. Es necesario evaluar el procedimiento de extracción para estas dos cepas en específico y hacer ligeras modificaciones en el protocolo de extracción en cuanto a tiempos de incubación y centrifugación, debido a que en las demás no se evidenció la presencia de contaminantes.

De acuerdo con García (2014), se considera que una muestra de ADN es íntegra cuando su perfil en una electroforesis en gel de agarosa se corresponde a una banda discreta. El nivel de degradación de una muestra está determinado por la pérdida de definición de la banda predominante y el acompañamiento de una estela o “smear” a lo largo del gel. Siendo así, de acuerdo a los resultados obtenidos en la electroforesis, se recobró un ADN con un ligero barrido, pero íntegro para todos los casos, como se puede observar en la figura 11, donde se observa una banda mayoritaria definida y acompañada de un leve “smear” para todas las cepas.



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído. **(1)** *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 **(2)** *Metarhizium robertsii* Cuj. 5.1. **(3)** *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 **(4)** *Isaria javanica* CHE-CNRCB303. **(5)** *Beauveria bassiana* CNRCBI. **(6)** Muestra independiente al proyecto.

## **Identificación molecular de los hongos entomopatógenos**

Como se mencionó en el arco teórico, la comparación de las secuencias de los genes ribosomales permite la identificación rápida y precisa de los organismos (**Bengston-Palme, 2013**). La región ITS es muy variable y se aplica para descifrar la inferencia filogenética a nivel de género, así como la delimitación de especies de hongos e identificación y diferenciación de las mismas. La amplificación de esta región a partir del ADN de las cepas en cuestión, permitió determinar el número aproximado de pares de bases para cada cepa (aproximadamente 600 pb) y realizar la secuenciación en esta zona específica de cada una de ellas, siendo así identificadas.

Los resultados obtenidos para la secuenciación de los nucleótidos en cada cepa de acuerdo al banco genético online (GeneBank) y la homología de los hongos analizados con las secuencias de hongos pertenecientes al banco de datos permitieron establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los hongos registrados en la base de datos como se muestran a continuación:

### ***M. Robertsii* Xoch 8.1**

#### - Secuenciación

```
“NNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGATTCGAGGTCACTATAAAAAGTCGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCG  
CGCCGGGCTCCTGTTGCGAGTGTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATT  
TAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTGAGG  
GGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCG  
ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAA  
GAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCAGAAGATACTTATTAATAAAATTCAGAAG  
GTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCAAGTCCCGCCGAAGCAACAATTAAGGTATAATTCACAGGGGTTGG  
GAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGTTTTTTACTTCC  
CAACCCCTNTGAATTATNCCTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGC”
```

Los resultados obtenidos para la homología de la cepa Xoch 8.1 muestran en todos los casos, similitud con la especie *M. robertsii* (*M. anisopliae*), con la cual había sido denominada, adicionalmente se determinó un tamaño total de 602 pares de bases para esta cepa.

**Tabla 7.** Homología de *M. robertsii* Xoch. 8.1

Aislado	Identidad	Error	Homología (%)
E377	<i>Metarhizium robertsii</i>	0.0	99
KTU-49	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.0	99
KTU-26	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.0	99
FAFU-1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.0	99
E127	<i>Metarhizium robertsii</i>	0.0	99

***M. robertsii* Cuj. 5.1**

- Secuenciación

“NNNNNNTNNTNCCTGATTCGAGGTCACTATAAAAAGTTGGGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCCT  
GTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAAGGGACGGCTGTGCTG  
GAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACCAAGTCCACAGGGGACTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCAT  
GCCCCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTT  
ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTAACC  
ACTCAGAAGATACTTATTAATAAATTAGAAAGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGGAAGTCCCGCCGAAGCAACAAT  
TAAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCT  
TGTTACGCTTTTTTACTTCNAAAACCCCTGTGAATTATNCCTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGC”

La cepa Cuj. 5.1 tiene un tamaño de 599 pares de bases y se demostró de una similitud del 99% con cepas de género y especie *M. robertsii*, confirmando la identidad de la cepa de hongo entomopatógeno con la cual se ha trabajado.

**Tabla 8.** Homología de *M. robertsii* Cuj 9.1

Aislado	Identidad	Error	Homología (%)
M11	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.0	99
FAFU-1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.0	99
RZU-1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.0	99
KTU-49	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.0	100
E650	<i>Metarhizium sp</i>	0.0	99



### *I. javanica* (CHE-CNR-CB303)

#### - Secuenciación

NNTTTNNNCANNTGCANCGAGGTCACGTTTACAGAGTATGGGTGTTTTACGGACGTGGCCGCGTCGGGTTCCCGGT  
GCGCGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCGCCACTGTATTCGGGGCCGCGGTATGCTGCCG  
GTCCCAACGCCGACTCCCCGAAGGGGTGTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGC  
TGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTG  
CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTC  
AGAAAGACTGATAGAAACAGAATTTGTGGGTCTCCGGCGGCCGCTGGGTCCGGGTCCGGGCGGCGCAGGGCC  
GTCCGGACGCCGGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTACAAAGGGTTAGGGAGTTGAAAAAACTC  
GTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCANCGGAGACCTGTTACGATTTTTACTTCCAN

De acuerdo a los resultados obtenidos en la secuenciación, la cepa tiene un tamaño de 585 pares de bases y es identificada como *I. javanica*, debido a que corresponde a un 99% de homología con esta especie.

**Tabla 9.** Homología de *I. javanica*

Aislado	Identidad	Error	Homología (%)
RCEF4687	<i>Isaria javanica</i>	0.0	99
AB277860.1	<i>Isaria javanica</i>	0.0	99
AB263744.1	<i>Paecilomyces javanicus</i>	0.0	99
CHE-CNRCB 305/1	<i>Isaria javanica</i>	0.0	99
ARSEF 4501	<i>P. fumosoroseus</i>	0.0	99

### *I. Fumosorosea* (ARSEF3302)

#### - Secuenciación

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNANGTCANGTNTCANNANTNNGGGTGTTTTACNNGNCGTGGCCGCGTCGGGTT  
CCCGGTGCGCGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCGCCACTGNATTTCCGGGGCCGCGGTATG  
CTGCCGGTCCCAACGCCGACTCCCCNAAGGGNTGTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCA  
GAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT  
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGC  
GGATTCAGAANAAGTATANAACAGAATTTGTGGGTCTCCGGCGGCCGCTGGGTCCNGGTCCGNGNGGGCGC  
AGGGNCNTCCNGANNCCNGGNCNAGTCNNNCNAANCAACNNNNNGTATNTTCNCAAANGGTTANGNANTTNA  
AAAANCTNTAATGATNNNNNNCTGGTNCNNCNNNNNNNNNNNNNTTACNNNNNTACTTCCN

La cepa cultivada como *I. fumosorosea* tiene tamaño de 585 pares de bases y un porcentaje de homología que corresponde mayormente con la especie *I. javanica*. Tal cual como se observa en la tabla 10, en la mayoría de los casos la secuencia de nucleótidos es relacionada con la especie antes mencionada. La relación de estas dos

especies es común, incluso, existen estudios que investigan las relaciones filogenéticas de los géneros *Paecilomyces* e *Isaria*, estos estudios establecen la existencia de un grupo monofilético llamado " *Isaria clade*" (Gallou, 2015), que incluye las especies *I. javanica* e *I. fumosorosea*. Esto sustenta que, en contraste con la identificación anterior (*I. fumosorosea*), el presente análisis identificó correctamente los aislamientos como *Isaria javanica*.

**Tabla 10.** Homología de *I. fumosorosea*

Aislado	Identidad	Error	Homología (%)
CICR-RSS-0089	<i>Paecilomyces sp.</i>	0.0	92
ACP MG837718.1	<i>Isaria javanica isolate</i>	0.0	92
FAFU-2	<i>Isaria fumosorosea isolate</i>	0.0	92
FAFU-1	<i>Isaria fumosorosea isolate</i>	0.0	92
BE01	<i>Isaria javanica</i>	0.0	92
NB IFR-19	<i>Isaria javanica strain</i>	0.0	92

### *B. bassiana* Tac 1.1

#### - Secuenciación

```

NNNNNNNNNNNNNNNNNNtGatTCGAGGTCACGTTCAGAAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCGGGGTTCC
GGTGCAGCTGTATTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCACTCCATTTAGGGCCGGCGGTGTGCTGC
CGGTCCCAACGCCGACCTCCCCAGGGGAGGTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAAT
GCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGGATTCTGCAATCACATTACTTATCGCATTTCGC
TGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGTATT
CAGAAGATGCTGGAATACAAGAGTTTGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCCAGTCCGCGTCCGGGCTGGGGCGA
GTCCGCCGAAGCAACGATAGGTAGGTTACAGAAGGGTTAGGGAGTTGAAAACCTCGGTAATGATCCCTCCGCTGG
TTCACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTCCAN

```

A través de la secuenciación del ADN de la se determinó que la cepa denominada como *B. Bassiana*, posee un tamaño de 567 pares de bases y tiene una homología del 100% con esta especie.

**Tabla 11.** Homología *B. bassiana*

Aislado	Identidad	Error	Homología (%)
NBAII-Bb-69	<i>Beauveria bassiana</i>	0.0	100
PB Percevejo Bronz SC	<i>Beauveria bassiana</i>	0.0	100
F. Carrap	<i>Beauveria bassiana</i>	0.0	100
Perc. Bronz. SC	<i>Beauveria bassiana</i>	0.0	100
VKBb03	<i>Beauveria bassiana</i>	0.0	99

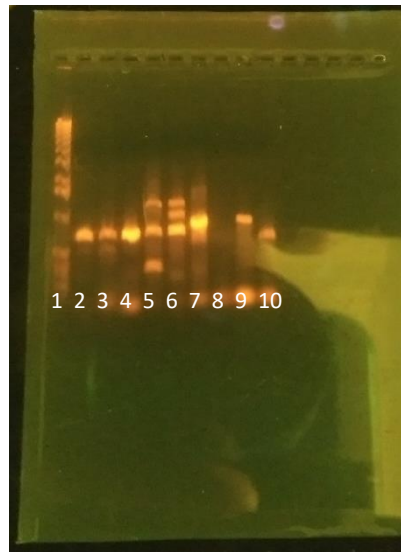
### **Identificación del gen *BbBEAS*.**

Como se observa en la figura 12, los resultados obtenidos para las diferentes cepas muestran que, para todos los casos, se amplificó el gen *BbBEAS* el cual de acuerdo a la información recabada en el marco teórico, ha sido caracterizado como el responsable de la codificación de la enzima Beauvericina sintetasa que consiste en un complejo enzimático modular y multifuncional que participa en la vía metabólica de los hongos entomopatógenos para la síntesis de beauvericina.

De acuerdo a lo obtenido en la electroforesis de los productos de la PCR para el gen *BbBEAS* (figura 12), las cinco cepas estudiadas muestran resultados positivos en la presencia del mismo, puesto a que muestran la misma banda evidenciada en la electroforesis del control positivo analizado.

Además, a partir de estos resultados es posible deducir, que las cepas estudiadas se tratan de los hongos denominados como *Isaria* y *Beauveria*, puesto que de acuerdo a las conclusiones de Zhang y col. (2013), los géneros como *Beauveria*, *Isaria* e incluso *Fusarium* forman parte del grupo de hongos que poseen el gen y por lo tanto pueden producir la beauvericina.

La presencia de este gen y de la capacidad de los hongos de producir dicha sustancia destaca la importancia del estudio de estas cepas. Ya ha sido mencionado que la beauvericina es uno de los compuestos que le da a estos hongos la capacidad de parasitar insectos y fungir como insecticida (**Yuquan, 2008**), aunado a esto, son microorganismos que pueden ser aprovechados para la producción de la beauvericina y para el estudio de la misma como una sustancia que ha demostrado poseer características antibióticas, antivírica y antitumorales de interés humano (**Lobo, 2015**). Una vez demostrado que estas cepas son capaces de producir la beauvericina, es posible dar paso a más estudios que busquen aprovechar las cepas como productoras de sustancias de interés.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR para el gen BbBEAS en las diferentes cepas de hongos entomopatógenos..(1) Marcador de peso molecular (2) *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 (3) *Metarhizium robertsii* Cuj. 5.1. (4) *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 (5) *Isaria javanica* CHE-CNRCB303. (6) *Beauveria bassiana* CNRCBI. (7) Control positivo (producto de PCR positivo al gen BbBEAS) (8) Control negativo (agua). (9) Muestra independiente al proyecto. (10) muestra independiente al proyecto.

## OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Durante el proceso de desarrollo del proyecto se cumplieron los distintos objetivos planteados; entre ellos, los de la aplicación de las técnicas de microbiología, como el cultivo de microorganismos y su aislamiento, así como las técnicas más empleadas hoy en día en biología molecular para la identificación de especies.

Las metas más importantes alcanzadas, fueron identificar cada una de las cepas de hongos entomopatógenos propuestas para esta investigación de acuerdo a su género y especie, así como lograr determinar que cada una de estas cepas tiene en su genoma el gen necesario para la producción de la beuvericina sintética, ahora, estos resultados ahora pueden ser empleados para continuar con la investigación para cuantificar los distintos niveles de expresión de este gen en distintas condiciones.

Adicionalmente, la participación en el proyecto permitió adquirir conocimientos técnicos sobre procedimientos y metodologías empleadas en las determinaciones asociadas a las ramas de biología molecular, biotecnología y microbiología, aportando fundamentos, conocimientos y experiencia a la formación profesional como químico farmacéutico biólogo.

## CONCLUSIONES

Al inicio de esta investigación, se contaba con 5 cepas diferentes de hongos entomopatógenos, de las cuales era necesario cultivar y confirmar su identidad en cuánto al género y especie de las cuales se trataba, así como determinar si el gen BbBEAS se encontraba presente en su genoma. En todos los casos, se logró reproducir y obtener cultivos monoespóricos con la viabilidad apta para que los hongos pudieran ser utilizados en los ensayos de obtención de ADN.

Fue posible obtener el ADN suficiente e íntegro para ser utilizado en las metodologías de PCR, purificación de ADN y secuenciación del genoma de los hongos entomopatógenos. La identificación molecular de especies microbianas basada en la secuenciación de la región ITS constituye una metodología eficaz y confiable, pues los procedimientos y antes mencionadas permitieron identificar y confirmar el género y especie de cada una de las cepas y en todos los casos, coincidieron con la denominación de acuerdo a su género y especie la cual se les había designado con anterioridad, así mismo, para todos los casos las especies identificadas corresponden a hongos entomopatógenos.

Además, todas las cepas de hongos entomopatógenos con las que se trabajó durante el desarrollo de este proyecto resultaron poseer el gen BbBEAS, el cual fue detectado mediante PCR y electroforesis, por lo tanto, todas son capaces de producir la enzima Beauvericina sinteasa.

## BIBLIOGRAFÍA

Carranza, Z. (2006). Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido (tesis de ingeniería). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.

Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic acids research*, 20: 2380-2388.

Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A., Rocha, M. M. G. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, INECC, UAM-I, 256: 41-52

Cubero, O., Crespo, A., Fatehi, J., Bridge, P. (1999). DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Systematics and Evolution*, 216, 243-249.

Borges, D., Díaz A., San Juan A., Gómez E.. (2010). "Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos." *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 44.3: 49-55.

del Rosario Rodicio, M., del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22: 238-245.

Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell, B. B. Rogers. (2008) Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics*. 10: 311-316.

Kort, E. , Fernandes K., Lara G., Lage A., Zahner V.. (2006). "Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick". *Parasitology research*, 98: 324-332.

Gallou, A., Serna-Domínguez, M. G., Berlanga-Padilla, A. M., Ayala-Zermeño, M. A., Mellín-Rosas, M. A., Montesinos-Matías, R., Arredondo-Bernal, H. C. (2016). Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal biology*, 120: 414-423.

Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y. Peng, G. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS genetics*, 7: 261-269.

García, M. A. (2014). Taller 3: Controles de calidad. Cuantificación del ADN. "Diferencia entre espectrofotometría UV y fluorimetría". Banco Nacional de ADN Carlos III. Universidad de Salamanca. España. Consulta en línea.

González-Castillo, M., Aguilar, N., Rodríguez-Herrera, R. (2012). Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4: 42-55.

Johan Bengtsson-Palme, Martin Ryberg, Martin Hartmann, Sara Branco, Zheng Wang, Anna Godhe, Pierre De Wit, Marisol Sánchez-García, Ingo Ebersberger, Filipe de Sousa, Anthony Amend, Ari Jumpponen, Martin Unterseher, Erik Kristiansson, Kessy Abarenkov, Yann J. K. Bertrand, Kemal Sanli, K. Martin Eriksson, Unni Vik, Vilmar Veldre, R. Henrik Nilsson. (2013). "Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data." *Methods in Ecology and Evolution*, 4,: 914-919.



Khan Academy. Secuenciación de ADN. Actualizado en 2017, consultado en Mayo de 2018. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>.

Kheterpal, I., Mathies, R. A. (1999). Peer Reviewed: Capillary Array Electrophoresis DNA Sequencing. *Analytical chemistry*, 71: 31-37.

Lobo, L. S., Luz, C., Fernandes, É. K., Juárez, M. P., Pedrini, N. (2015). Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. *Journal of invertebrate pathology*, 128: 14-21.

Luangsa-Ard, J. J., Berkaew, P., Ridkaew, R., Hywel-Jones, N. L., Isaka, M. (2009). A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. *Mycological research*, 113: 1389-1395.

Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., Larsson, K. H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics*, 4: 647-653.

Pucheta M., Flores. A., Rodríguez S., De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31: 856-860.

Sabbahi, R., Lavallée, R., Merzouki, A., Guertin, C. (2009). Differentiation of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Hypocreales) isolates by PCR-RFLP. *Phytoprotection*, 90: 49-56.

Sasan, R. K., Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*, 99: 101-107.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 6241-6246.

Seifert, K.A. (2009) Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9: 83–89.

Shimazu, M., Takatsuka, J. (2010). *Isaria javanica* (anamorphic Cordycipitaceae) isolated from gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 45: 497-504.

Altschul S., Madden T., Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res*, 25: 3389-3402.

Wang, Q., Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*, 17, 2367-2377.

Werle, E., Schneider, C., Renner, M., Völker, M., Fiehn, W. (1994). Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*, 22: 4354-4359.

Xu, Y., Orozco, R., Wijeratne, E. K., Gunatilaka, A. L., Stock, S. P., Molnár, I. (2008). Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chemistry & biology*, 15: 898-907.

Zhang, T., Zhuo, Y., Jia, X., Liu, J., Gao, H., Song, F, Zhang, L. (2013). Cloning and characterization of the gene cluster required for beauvericin biosynthesis in *Fusarium proliferatum*. *Science China Life Sciences*, 56: 628-637.

Zimmermann, G. (1986). The 'Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of applied Entomology*, 102: 213-215.

Zimmermann, G. (2008). The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol science and technology*, 18: 865-901.

**Vo. Bo. DE LOS ASESORES**

---

**Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**

---

**Dra. MARÍA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**LIC. QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL**

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DEL GEN BbBEAS DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS.”**

**CORRESPONDIENTE AL PROYECTO GENÉRICO: OBTENCIÓN DE MATERIAS  
PRIMAS, PRINCIPIOS ACTIVOS, MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS.**

**Lugar de realización: Laboratorio de biotecnología y laboratorio de Ecología  
Microbiana de la Unidad interdisciplinaria de Investigación, Docencia y Servicio  
de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.**

**Periodo de realización: Junio de 2017 – Diciembre de 2017**

**ALUMNO: ISMAEL SEDANO VARGAS**

**MATRICULA: 2133026885**

**DIRECCIÓN: NIÑO ARTILLERO NO. 44 BARRIO SAN JOSÉ, TEPOZTLÁN, MORELOS. C.P 62520**

**ASESORES:**

**DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**

**DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIERREZ NAVA**

## RESUMEN

Los hongos entomopatógenos son definidos como aquellos organismos con la capacidad de atacar y parasitar insectos a través de su capacidad de producir distintas sustancias (Gallou, 2016). La Beauvericina, es un un producto del metabolismo del hongo *Beauveria bassiana* (Wang et. al, 2012) y su síntesis ocurre a través de una serie de reacciones en las que se incluye la participación de la enzima de la Beauvericina sintetasa, de la cual, se ha caracterizado al gen BbBEAS como el responsable de la codificación de esta enzima (Lobo, 2015).

En este proyecto se identificaron molecularmente distintas cepas de hongos entomopatógenos que corresponden al cepario del laboratorio de biotecnología de la UIDIS de la Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Xochimilco), así como también se determinó su capacidad de expresión del gen BbBEAS.

Mediante el análisis molecular de la región ITS, se confirmó el género y especie de cinco cepas de hongos homologados con los géneros pertenecientes *Beauveria*, *Isaria* y *Metarhizum*. Los resultados fueron comparados con la información proporcionada por la base de datos de secuencias genéticas GeneBank® y se determinó que 4 de las 5 cepas coincidieron con la especie con la cual se les había denominado previamente al proyecto, coincidiendo con una homología del 99 al 100% con su especie correspondiente. La quinta cepa, denominada como *I. fumosorosea*, fue identificada como *I. javanica*. Esta identificación coincide con discusiones que relacionan similitudes filogenéticas entre las dos especies y concluyen que se trata de una sola (*I. javanica*). Adicionalmente, se identificó la presencia del gen *BbBEAS* en el total de las cepas estudiadas mediante la comparación con un control positivo a la presencia de este gen.

## BIBLIOGRAFÍA

Gallou, A., Serna-Domínguez, M. G., Berlanga-Padilla, A. M., Ayala-Zermeño, M. A., Mellín-Rosas, M. A., Montesinos-Matías, R., Arredondo-Bernal, H. C. (2016). Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal biology*, 120(3), 414-423.

Lobo, L. S., Luz, C., Fernandes, É. K., Juárez, M. P., & Pedrini, N. (2015). Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. *Journal of*

Wang, Q., & Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*, 17(3), 2367-2377.

**Vo. Bo. DE LOS ASESORES**

---

**Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**

---

**Dra. MARIA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA**

## ANEXOS

### ***Preparación de soluciones***

- Buffer TAE 50X

Pesar 242 gramos de TRIS base agregar 500mL de agua destilada disolver con agitación posteriormente agregar 57.1 mL de Ácido acético glacial y 100mL de EDTA 0.5M a pH 8 finalmente aforar con agua a 1L.

- Buffer TAE 1X

Tomar 20mL de buffer TAE 50X y llevar a aforo a 1L.

- Buffer de carga

Glicerol en agua al 30% con un 0.25% de azul de bromofenol y un 0.25% de xylene cyanol.