

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	1	10	2021		28	9	2021

Datos del Alumno

Nombre : José Luis Rodríguez Ramírez	
Matrícula : 204353863	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Calzada Ermita Iztapalapa 762 Departamento 405. Col. Granjas San Antonio C.P. 09070, Alcaldía Iztapalapa, Ciudad de México, México	
Teléfono : 5568129794	Celular : 5568035797
Correo Electrónico : qfb.jlrodriguez@gmail.com	CURP : RORL811107HDFDMS00

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Identificación Molecular de hongos entomopatógenos mediante amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y regiones ITS							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Biotecnología, Edificio N							
Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacan				Localidad : Ciudad de México			
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	2	2	2016		2	9	2016

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 4.- Social (Urbano o Rural)	Tipo: 3.- Interno de Campo
Orientación: 10.- Otros	

FIRMAS

Asesor Interno
Dr. Juan Esteban Barranco Florido No. Eco. 24927

José Luis Rodríguez Ramírez
Alumno
Nombre, firma

M. en C. José Norberto Vásquez Bonilla
Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza

Ciudad de México a 12 de octubre del 2021

Mtra. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

Presente.

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumno:

José Luis Rodríguez Ramírez con matrícula **204353863**, concluyo el proyecto de Servicio Social: "Identificación Molecular de hongos entomopatógenos mediante amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y regiones ITS" que se realizó Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Edif. N, Laboratorio de Biotecnología, del 02 de Febrero de 2016 al 02 de Septiembre de 2016 bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



Dr. Juan Esteban Barranco Florido No. Eco. 24927



Ciudad de México a 12 de octubre del 2021

Mtra. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

Presente.

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumno:

José Luis Rodríguez Ramírez con matrícula **204353863**, concluyo el proyecto de Servicio Social: "Identificación Molecular de hongos entomopatógenos mediante amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y regiones ITS" que se realizó Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Edif. N, Laboratorio de Biotecnología, del 02 de Febrero de 2016 al 02 de Septiembre de 2016 bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

M. en C. José Norberto Vásquez Bonilla



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:

“Identificación molecular de hongos entomopatógenos mediante amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y regiones ITS”.

Correspondiente al proyecto genérico:

Obtención De Materias Primas, Principios Activos, Medicamentos Y Productos Biológicos.

P R E S E N T A:

José Luis Rodríguez Ramírez

MATRICULA: 204353863

Tutores:

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

M. en C. José Norberto Vásquez Bonilla

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorio De Biotecnología, Edificio N. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, con Dirección: Calzada Del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, Alcaldía de Coyoacán, C.P 04960, Ciudad de México, México.

Periodo: 02 Febrero 2016 al 02 Septiembre 2016

Ciudad de México, Septiembre 2021

INDICE.

I.	INTRODUCCIÓN.....	4
II.	MARCO TEORICO.....	5
	2.1 . Hongos Entomopatógenos.....	5
	2.2 . Identificación morfológica de hongos entomopatógenos.....	5
	2.3 . Genes Ribosomales.....	6
	2.4 . Diseño de los Oligonucleótidos y características.....	7
	2.5 . Extracción de DNA Métodos de extracción de ADN	7
	2.6 . Métodos de identificación molecular PCR-RFLP, 18S.....	8
	2.7 . Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	8
	2.8 . Electroforesis en Gel de Agarosa,,.....	9
	2.9 .Secuenciación.....	9
	2.10 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	11
III.	OBJETIVOS.....	13
	3.1 . Objetivos Generales.....	13
	3.2 . Objetivos Específicos	13
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
	4.1 . Obtención de Cultivos monospóricos.....	14
	4.2 . Estandarización de la Técnica de extracción de ADN.....	14
	4.3 . Cuantificación de ADN.....	15
	4.4 . Electroforesis en gel de agarosa.....	15
	4.5 . Preparación de los Oligonucleótidos.....	15
	4.6 . Condiciones de PCR.....	16
	4.7 . Purificación del Producto de PCR.....	17
	4.8 . Almacenamiento del ADN.....	17
	4.9 . Secuenciación de las bandas.....	17
V.	RESULTADOS.....	18
	5.1 . Obtención de ADN.....	18
	5.2 . Amplificación de los genes ribosomales y regiones ITS	20
	5.3 . Secuencia de ADN cepa 11.....	20
	5.4 . Secuencia de ADN cepa UAM-I.....	20
	5.5 . Secuencia de ADN cepa 12.....	21

5.6 Homología de las secuencias.....	21
VI. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS.....	23
VII. CONCLUSIONES.....	24
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	25
IX. Resumen.....	27
X. Anexos.....	28

I. INTRODUCCIÓN

Los Hongos entomopatógenos (HE) en específico *Beauveria Bassiana* (*B. bassiana*) representan un control biológico indispensable para la erradicación de plagas al ser un parásito de diferentes insectos que afectan la industria alimentaria y de importancia para el control biológico de las plagas evitando la contaminación por químicos o tóxicos que contienen los tratamientos con insecticidas. Por lo que es el implementar una técnica de identificación rápida y confiable para la determinación de especie y género resulta muy importante al tener muchas variedades HE, siendo la forma más confiable de identificación es la molecular ya que resulta más específica que los otros tipos de identificación por basarse en diferencias en el genoma del hongo.

El presente trabajo tiene como objetivo establecer un protocolo de extracción de ADN de cultivos de HE y la estandarización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando tres oligonucleótidos universales. Se describe la importancia y las características de los genes ribosomales y de las regiones ITS (Internal transcribed spacer) y su importancia en la identificación molecular de los HE.

Se describe la parte teórica de diferentes procesos implicados en la identificación molecular como son las características químicas del ADN que son consideradas para su extracción, purificación y cuantificación, el método de secuenciación de ácido nucleicos y como éste se fue perfeccionando así como los factores que pudieran alterar todos estos procesos y el equipo utilizado para llevarlos a cabo.

Se describen otros métodos de identificación molecular para HE como es la amplificación de un gen y la obtención de patrones de digestión utilizando enzimas de restricción (PCR-RFLP) y se describen además todas las técnicas utilizadas para la identificación molecular como extracción, purificación y cuantificación de ADN, electroforesis en gel de agarosa y el proceso para preparar la muestra de ADN amplificado para ser secuenciada así como la preparación de todas las sustancias utilizadas.

Posteriormente la secuencia de ADN amplificada perteneciente a los genes ribosomales y a las regiones ITS amplificada se mandó a secuenciar a la unidad de biología molecular (UNAM) para poder identificar la especie de HE buscando la identidad de la secuencia en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), finalmente se discuten los resultados obtenidos como la calidad del ADN genómico extraído de diferentes cepas de HE, y la homología de la secuencia de ADN con especies de HE.

II. MARCO TEORICO

2.1 Hongos Entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) son aquellos que parasitan diferentes órdenes de artrópodos desde arañas hasta casi todos los grupos de insectos provocándoles micosis y la muerte. Representan uno de los grupos de mayor importancia para el control biológico de plagas, por su capacidad natural de producir diferentes compuestos que causan enfermedad y muerte a los insectos (Assaf, *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2008).

Los hongos entomopatógenos comienzan su infección a través de la cutícula externa del insecto (hospedero) y sigue las siguientes fases de desarrollo:

- Adhesión: germanización de la espora en la cutícula del hospedero.
- Penetración a través de un tubo germinativo.
- Colonización que es el desarrollo del hongo dentro del cuerpo del insecto.
- Posteriormente se da la muerte del insecto produciéndose un crecimiento hifal del hongo en el cuerpo del insecto.

Debido a su capacidad de infectar gran variedad de insectos, no contaminar el medio ambiente, no afectar al hombre u otros animales superiores y tener la capacidad de reproducirse y renovarse de manera continua (si se encuentran en condiciones adecuadas) los HE son ampliamente utilizados en el control biológico de plagas teniendo ventaja sobre los insecticidas químicos los cuales traen como consecuencia la selección de individuos resistentes, la invasión de nuevas plagas y la contaminación ambiental y del hombre (Cañedo, *et al.*, 2004).

2.2 Identificación morfológica de hongos entomopatógenos

Los HE, son organismos heterótrofos que poseen características visibles bajo microscopio o a simple vista como células quitinizadas normalmente no móviles, *B. bassiana* está conformado por hifas septadas de 2.5 a 25 μm de diámetro, de donde se forman conidióforos simples, los cuales sostienen los conidios que son hialinos redondeados a ovoides y unicelulares, originados de forma simpodial o acrópeta y presenta micelio blanco.

La identificación molecular tiene ventaja sobre la identificación morfológica ya que puede diferenciar taxones muy próximos los cuales no sería posible identificar morfológicamente

y serian clasificados como una misma especie. Además que el grado de especificidad y confianza en la identificación molecular es mayor que en la morfológica por basarse en diferencias a nivel del genoma del hongo (Vega,2009; Duperchy, 2003).

2.3 Genes Ribosomales

Los genes ribosomales (18S, 5.8S y 28S) son regiones muy conservados en el genoma de todos los eucariontes además de que tiene un gran número de copias en el genoma nuclear lo que facilita su amplificación. Estas regiones conservadas están separadas entre ellas por las regiones de los espacios transcritos internos (ITS) las cuales son secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud y secuencias, debido a deleciones e inserciones; son muy informativas y representan una huella genómica para cada por lo que es una herramienta confiable y muy utilizada por taxónomos y ecólogos para la identificación molecular de hongos mediante su amplificación y secuenciación (Rodríguez,*et al.*, 2004) (Figura 1). Este método tiene ventaja frente a otros métodos de identificación molecular debido a que los genes ribosomales y las secuencias ITS se encuentran en gran cantidad de copias en el genoma lo que facilita su amplificación, por lo que son ampliamente utilizadas para la identificación molecular de especies. (Huang *et al.*, 2009; Al-hemaid *et al.*, 2014).

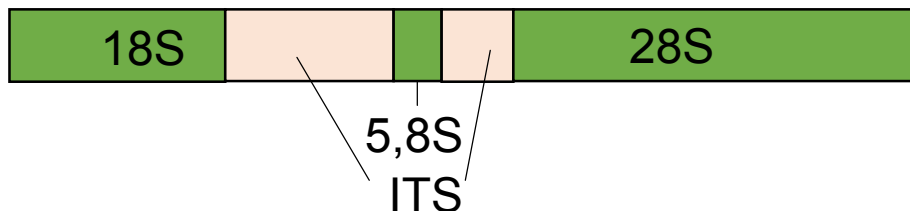


Figura 1. Representación de la localización de los GR. 18S, 5.8S, 28S y los espaciadores transcritos internos (de sus siglas en ingles ITS) (adaptado de White *et al.*, 1990).

2.4 Diseño de los oligonucleótidos y características

El diseño de oligonucleótidos se lleva a cabo utilizando diferentes herramientas de bioinformática que utilizan las secuencias de interés a amplificar, para encontrar secuencias conservadas que garanticen su presencia en cualquier microorganismo que contenga esa secuencia con la finalidad de que los oligonucleótidos diseñados a partir de estas secuencias sean útiles en su amplificación mediante PCR. Los oligonucleótidos deben cumplir con ciertas características como son que su tamaño se encuentre entre 18 a 30 nucleótidos de longitud generalmente de 20 a 25 nucleótidos para facilitar la unión al ADN molde, evitar la auto-complementariedad entre ellos y tener 100% de similitud con el DNA molde (Montoya *et al.*, 2007)

2.5 Extracción de DNA Métodos de extracción de ADN.

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. En este caso, los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis. Si se desea obtener ácidos nucleicos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados. Los contaminantes capaces de inhibir el análisis PCR, para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células (Zimmermann *et al.*, 1998). El procedimiento de lisis idóneo es diferente entre cada tipo celular posterior a la lisis celular todos los métodos de extracción se basan en las características químicas del ADN como su estructura química, carga y solubilidad para poder extraerlo y purificarlo. La extracción utilizando kit comercial, debido a su facilidad de uso y por el pequeño tamaño de muestra que se necesita para la extracción de ADN. La confirmación de la presencia de ADN y su integridad se lleva a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa (Somma, 2009).

2.6 Métodos de identificación molecular PCR-RFLP, 18S

La amplificación de regiones de los espaciadores transcritos internos permiten discriminar directamente varias especies por lo que se puede hacer uso de una amplia variedad de técnicas moleculares más precisas como la obtención de patrones de digestión (RFLP), que se basa en el reconocimiento de secuencias particulares y/o polimórficas para cada especie, para amplificarlas mediante PCR y posteriormente la digestión de estos productos mediante enzimas de restricción generando patrones de bandas (una serie de bandas de un tamaño medible) para cada una de las enzimas de restricción utilizadas. Con este método se pone de manifiesto las diferencias (polimorfismos) que afectan a las secuencias diana de las regiones de los espaciadores transcritos, los distintos patrones de bandas se pueden distinguir por electroforesis. Se ha demostrado que los análisis por RFLP de la región ITS del DNA ribosómico son suficientes para diferencias taxones muy próximos (Llorens, *et al.*, 1997) (Figura 2).

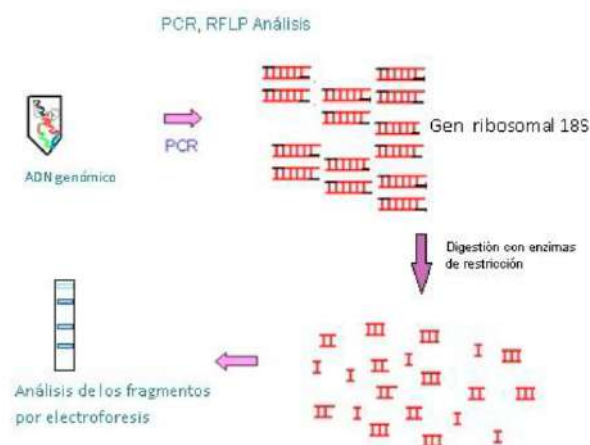


Figura 2. Representación de la identificación molecular por PCR-RFLP (modificada de Herraiez, 2012).

2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN. (Velázquez A. *et al.*, 2011). La PCR se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN. Mediante esta reacción se logra multiplicar del número de copias de un fragmento específico del ADN, a lo cual se le llama amplificación. La reacción se lleva a cabo mediante la repetición sucesiva de un ciclo de tres pasos,

cada uno a temperatura diferente. En cada paso o cambio de temperatura ocurre un proceso que en su conjunto complementan la PCR. Primeramente, la desnaturalización del ADN o separación de la doble cadena, luego la unión de los oligonucleótidos o cebadores a las cadenas simples de ADN y, por último, la extensión o polimerización donde la ADN polimerasa cataliza la formación de doble cadena de ADN (Díaz, *et al*, 2013) (Figura 3).

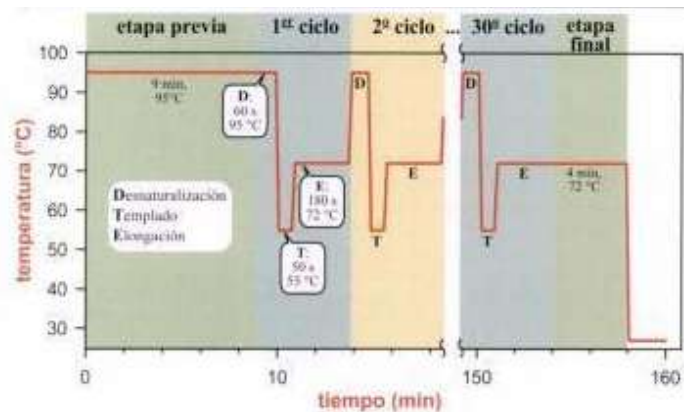


Figura 3 Esquema general de la PCR (Herraez A., 2012)

2.8 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico (Somma, 1990). La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa.

2.9 Secuenciación

La secuenciación de ácidos nucleicos es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuyo objetivo es la determinación del orden de los nucleótidos en una secuencia de ADN, actualmente usando aparatos automatizados que se basan en modificaciones del método de Sanger. Se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica debido a que en el medio de reacción existen dNTPs y dNTPs

didesoxi (ddNTPs) los cuales contienen un fluorocromo para etiquetar cada nucleótido por un color diferente y además no contienen el grupo hidroxilo (3' OH) terminal en el nucleótido el cual es necesario para que la ADN polimerasa continúe sintetizando la cadena de ADN por lo que siempre que se incorporan por la ADN polimerasa el ADN creciente termina (Jill, 2008) por lo que se generan cadenas de distintos tamaños las cuales posteriormente son corridas en una electroforesis y detectadas mediante un láser de acuerdo a su tamaño y color del ddNTP con el que termina, finalmente un programa traduce las señales y muestra el orden de la secuencia de ADN (Figura 4).

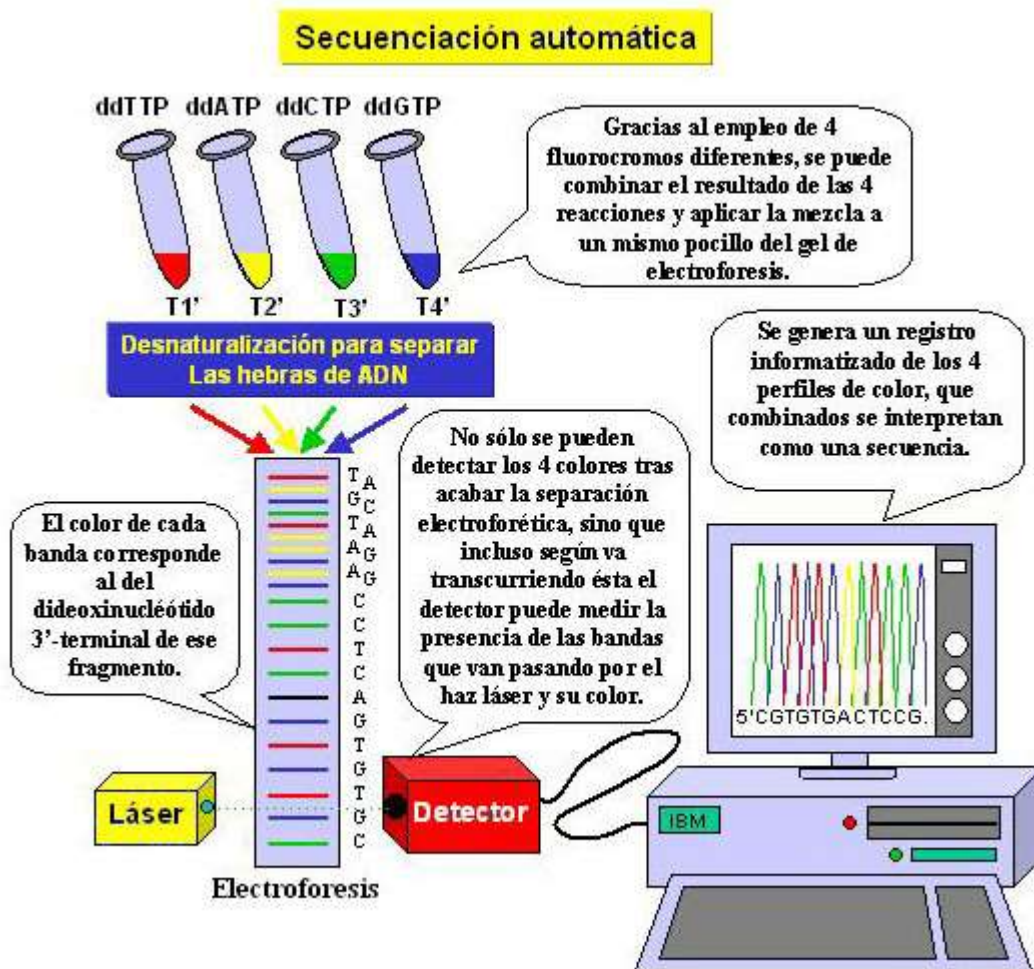


Figura 4. Representación general de la secuenciación automática (tomada de Herrera, 2012).

2.10 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácido nucleicos se basa en el análisis de la absorción UV, ya que los nucleótidos poseen máximos de absorción alrededor de 260 nm (Figura 5). Este método proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de una muestra, pero sólo si ésta se encuentra pura, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorben a longitudes de onda cercanas (280nm y 230nm) respectivamente (Figura 6). Para evaluar la pureza de la muestra respecto a las proteínas debe determinarse la relación entre absorbancia a 260nm y absorbancia a 280nm ($\text{abs. } 260\text{nm}/\text{abs. } 280$) y la relación entre absorbancia a 260nm y absorbancia a 230nm ($\text{abs. } 260\text{nm}/\text{abs. } 230\text{nm}$), si la relación es mayor a 1.8 y menor a 2 en el primer caso y mayor a 2 y menor a 2.2 en el segundo caso puede estimarse que la muestra es lo bastante pura para confiar en la cuantificación espectrofotométrica.

Actualmente se utiliza un artefacto llamado Nanodrop® que es espectrofotómetro capaz de realizar la cuantificación de ADN y la determinación de la pureza de la muestra basándose en las absorbancias de los nucleótidos, proteínas y solventes orgánicos, utilizando solamente un μL de muestra la cual puede encontrarse desde diluida hasta muy concentrada.

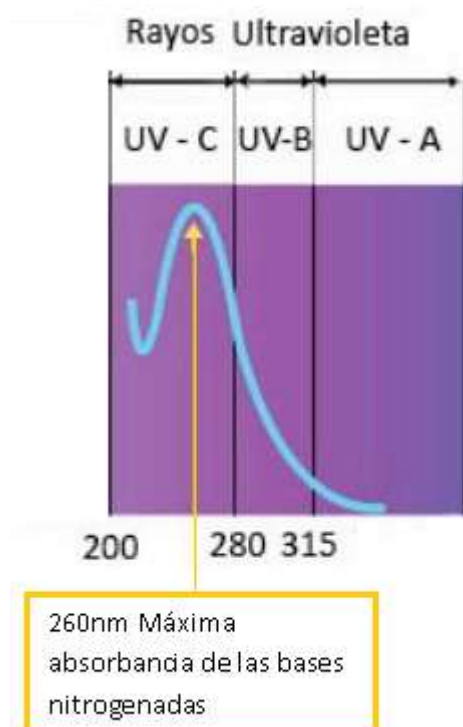


Figura 5. Representación gráfica de la longitud de onda de absorción de las bases nitrogenadas (tomada de Herraiez A. 2012)

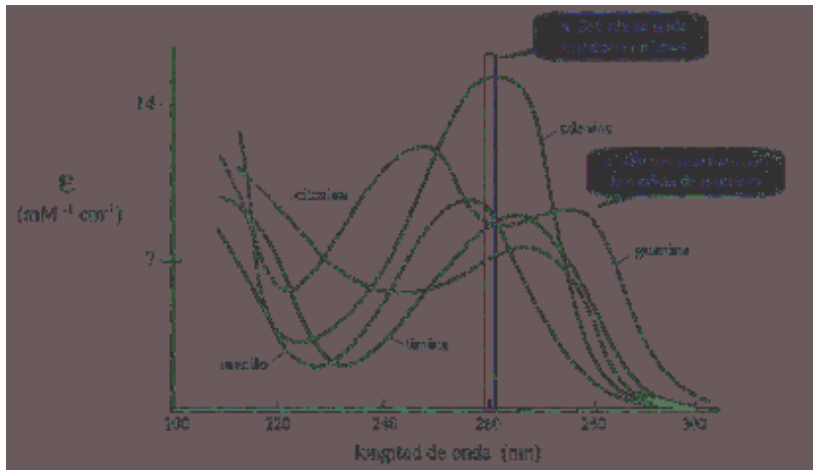


Figura 6. Imagen de la longitud de onda de absorción de contaminantes más comunes en ácidos nucleicos y longitud de onda de absorción de las bases nitrogenadas. (tomada de Herraiez A. 2012)

III OBJETIVOS

GENERALES:

- Determinar las técnicas de biología molecular para caracterización molecular del hongo entomopatógeno: *Beauveria bassiana*.

ESPECIFICOS:

- Establecer un protocolo de extracción de ADN de cultivos monoesporicos de cepas de *Beauveria bassiana*.
- Estandarizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos específicos de la región ITS para *Beauveria bassiana*.
- Obtener por medio de PCR la secuencia de los genes ribosomales y secuencias ITS de *Beauveria bassiana* para su secuenciación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de cultivos monospóricos

Los conidios fueron aislados cultivándose en un medio de dextrosa - papa en matraces Erlenmeyer de 250mL. Los matraces inoculados fueron incubados a 25°C durante 15 días, para obligarlos a esporular y se produzcan conidios. Los conidios obtenidos del micelio de estos cultivos pasaron una serie de diluciones con el fin de que las esporas queden suficientemente separadas entre sí en el medio de cultivo, posteriormente ya formados los conidios, posteriormente se toma una sola colonia, resebrándola en otro matraz con medio de cultivo y promover su crecimiento.

4.2 Estandarización de la técnica de extracción de ADN

Para la extracción de ADN el micelio formado durante 15 días se recogió del medio de cultivo, posteriormente se rompieron las células con nitrógeno líquido en un mortero, procurando no se derrame, contamine para no perder su esterilidad.

Las células inmediatamente después de romperse con el nitrógeno líquido se ponen dentro de un eppendorf y esté cerrado se sumerja en nitrógeno líquido durante aproximadamente 1 minuto posteriormente Posteriormente se conservó el ADN obtenido en un eppendorf nuevo y estéril en congelación de -20°C.

El ADN se extrajo empleando un kit comercial de extracción de ADN (DNeasy® Plant Mini Kit) (Figura 7) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se observó en una electroforesis de gel de agarosa al 1% cargando 5 µL del ADN extraído cuantificado en el NANODROP®. Cuidando de agregar los amortiguadores del kit deslizándose por las orillas del eppendorf con ayuda de las puntas de pipeteo.



Figura 7. Kit de extracción DNeasy® Plant mini kit

4.3 Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ADN extraído se utilizó Nanodrop® Thermo scientific (Figura 8) siguiendo las instrucciones de operación utilizando como blanco 1µL de agua inyectable y para la cuantificación se adicióno un 1 µL del ADN extraído. (Dneasy Plant miniKit QIAGEN®)



Figura 8. Nanodrop ® marca Thermo scientific

4.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para observar la integridad del ADN se observó en un gel agarosa por electroforesis al 1% se cargaron 5µL DNA para ver la integridad, 3.0 µL para los productos de PCR, 2 µL de red gel y 2 µL del marcador de peso molecular. Todas las electroforesis se corrieron con amortiguador de corrida TAE1X (Ver Anexo) suficiente para cubrir el gel en la cámara de electroforesis (Carrillo, 2008).

4.5 Preparación de los oligonucleótidos

Para conseguir una concentración de 10 µM de los oligonucleótidos se empezó disolviendo los liofilizados de cada oligonucleótido siguiendo las siguientes diluciones:

Preparación del oligonucleótido ITS5

El liofilizado contenía 106 mmol de oligonucleótido ITS5 este se disolvió en 1060 µL de agua estéril libre de nucleasas obteniendo una solución con una concentración de 100 µmol/µL.

$$\frac{106\text{milimoles}}{1060\mu\text{L de agua}} = 100\mu\text{mol}/\mu\text{L}$$

de esta solución se tomaron 2 μL y se diluyeron con 18 μL de agua obteniendo 20 μL con una concentración de 10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$.

$$\frac{2\mu\text{ de }100\mu\text{mol}/\mu\text{L}}{18\mu\text{ de agua}} = 20\mu\text{L de }10\mu\text{mol}/\mu\text{L}$$

Preparación del oligonucleótido ITS4

El liofilizado contenía 79.2 mmoles de oligonucleótido ITS4 este se disolvió en 792 μL de agua estéril libre de nucleasas obteniendo una solución con una concentración de 100 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$.

$$\frac{79.2\text{milimoles}}{792\mu\text{ de agua}} = 100\mu\text{mol}/\mu\text{L}$$

de esta solución se tomaron 2 μL y se diluyeron con 18 μL de agua obteniendo 20 μL con una concentración de 10 $\mu\text{Mol}/\mu\text{L}$.

$$\frac{2\mu\text{ de }100\mu\text{mol}/\mu\text{L}}{18\mu\text{ de agua}} = 20\mu\text{L de }10\mu\text{mol}/\mu\text{L}$$

4.6 Condiciones de PCR

Las reacciones fueron realizadas en tubos Eppendorf de 0.2 mL en un volumen total de reacción de 50 μL . Cada reacción contenía 10 μM de cada iniciador, 1mM de una mezcla de dNTPs, 1 unidades de Taq polimerasa (Thermo scientific®) contenidos en 5 μL de buffer de PCR a una concentración de 10X (Ver Anexo) con 20 mM de MgCl_2 (Thermo scientific®), aproximadamente 20ng de DNA molde y agua inyetable (libre de nucleasas) para completar el volumen de 50 μL de reacción. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador TGRADIENT (BIOMETRA®). 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 (Dias, et. al.,2008).

4.7 Purificación del producto de PCR

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % se corrió a 80 volts durante 1.5 h. se cargaron 150 μ L de un mismo amplificado de PCR esto se llevó a cabo para cada cepa (11, 12, UAMI,) en un pozo suficientemente grande para 150 μ L (Figura 9) terminada la electroforesis la banda se visualizó bajo la cámara de luz UV (Figura 10) y se recortó con ayuda de una navaja posteriormente la banda del gel se purificó utilizando el kit siguiendo las instrucciones del fabricante: QIAquick PCR Purification Kit® finalmente se conservó en refrigeración para su posterior secuenciación. Nota: Se corto la banda del gel de agarosa que se obtuvo con la menor cantidad posible de agarosa sin muestra.



Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) con un pozo cargado con 150 μ L del amplificado de la cepa 11

4.8 Almacenado del ADN

Una vez que el ADN fue purificado, por electroforesis en gel de agarosa al 2% a 80 V Durante 90 min, pasando este tiempo y terminada la electroforesis la banda se visualizó bajo la cámara de luz UV una parte de la muestra se puede almacenar a 4 °C para los análisis inmediatos y el material restante a -20 °C o -80 °C, para una preservación por varios meses y conservar las características del ADN.

4.9 Secuenciación de las bandas

Las bandas amplificadas se visualizaron bajo luz UV con el equipo UV (SYNGENE) los productos de PCR purificados se enviaron a la unidad de Biología Molecular de la UNAM para su secuenciación y posteriormente se comprobó con la base de datos de GenBank de nucleótidos. ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

V. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 Obtención de ADN

Se obtuvo ADN genómico puro realizado con un Kit comercial (DNeasy® Plan Mini Kit) con el cual se utilizó muy poca cantidad de muestra, Como se aprecia en la fig. 10 en el carril 5 se puede observar cómo afecta la contaminación por trazas de solventes o el exceso de muestra por lo que tendríamos una mayor probabilidad de fallar en la prueba, en el carril 4 ocurre una lectura ideal ya que en el carril 6 y 7 se pueden determinar cómo aceptables sin mencionar que también cuentan con un exceso de muestra o contaminación pero en menor cantidad.

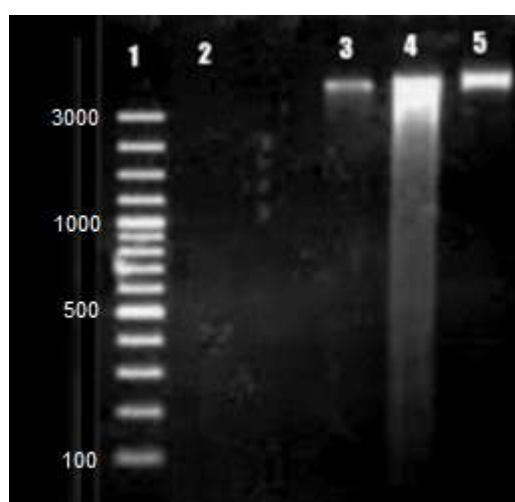


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1%), con 5 µL de ADN genómico de las cepas 12, 11 y UAM-1. (1) Marcador peso molecular; (2) Control Negativo; (3) ADN genómico de la cepa UAM-I; (4) ADN genómico de la cepa 12, (5) ADN genómico de la cepa 11.

Cuando el ADN que se obtuvo un valor de relación entre ABS. 260/280 entre 1.8 a 2 y de 2 a 2.2 para la relación entre ABS. 260/230 (Figura 11) lo que indica que los ADN extraídos muestran buena pureza en cuanto a la presencia de proteínas y solventes orgánicos como se indica en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1

Concentraciones de ADN extraídos			
Cepa	Concentración(ng/µL)	ABS 260/280	ABS 260/230
UAMI	49.2	1.68	1.87
11	44.5	1.82	2.06
12	86.2	1.59	2.02

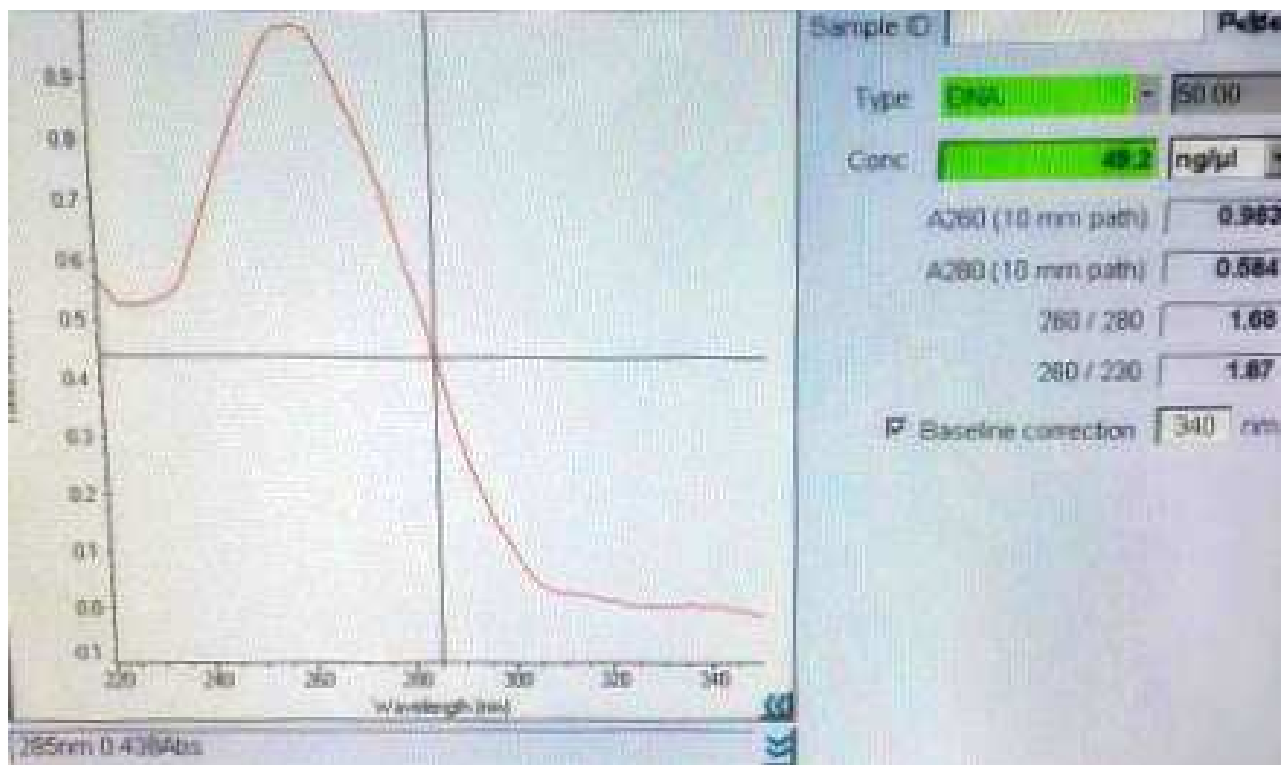


Figura 11. Barrido UV a 285 nm para la muestra de ADN correspondiente a la cepa UAMI

Conforme se observa en la tabla los resultados al barrido para verificar la pureza y conforme lo indica la teoría cuenta con algunas trazas de impurezas al no tener las absorbancias 260/280 entre 1.8 a 2.0 y 260/230 2.0 a 2.2 indicando que 2 de las muestras estudiadas están fuera de especificación, sin descartarlas para someterlas a secuenciación.

5.2 Amplificación de los genes ribosomales y regiones ITS

Se amplifican las regiones ribosomales y oligonucleótidos ITS identificando la especie.

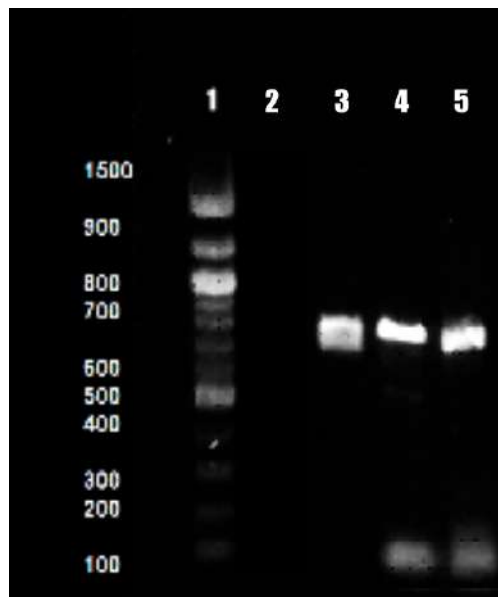


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (1%) amplificados de PCR de las cepas: (1) Marcador de peso molecular; (2) control negativo; (3) cepa UAMI; (4) cepa 11; (5) cepa 12.

La figura 12 muestra que, para los Oligonucleótidos ITS4 e ITS5 amplificados de PCR tuvieron pesos similares entre ellos de aproximadamente 596 pares de bases los oligonucleótidos utilizados para localizar específicamente los Oligonucleótidos ITS4 e ITS5 al ser zonas universales en todas las células Eucarióticas no requiere diferentes tiempos de elongación. Las lecturas de la electroforesis se aprecian las líneas 3, 4 y 5 de la fig. 12 indican un exceso de oligonucleótidos.

5.3 Secuencia de ADN Cepa 11

```
NNNNNNNTANTGATTCGAGGTCACGTTTACGAGGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCGGGGTTCCGGTGCGAGCTGTATTAC
TACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCGCCACTCCATTTACGGGCCGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACCTCCCCCA
GGGGAGGTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGAT
GATTCACTGGATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAA
GTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGTATTACAGAAGATGCTGGAATACAAGAGTTTGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCCA
GTCCGCGTCCGGGCTGGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTAGGTTACAGAAGGGTTAGGGAGTTGAAAACGCGTAATG
ATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAN
```

5.4 Secuencia de ADN Cepa UAM-I

```
NNNGNANNtANtGATTCGAGGTCACGTTTACGAGGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCGGGGTTCCGGTGCGAGCTGTATTAC
TACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCGCCACTCCATTTACGGGCCGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACCTCCCCCA
GGGGAGGTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGAT
GATTCACTGGATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAA
GTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGTATTACAGAAGATGCTGGAATACAAGAGTTTGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCCA
GTCCGCGTCCGGGCTGGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTAGGTTACAGAAGGGTTAGGGAGTTGAAAACGCGTAATG
ATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACNNCCAN
```

5.5 Secuencia de ADN Cepa 12

NNNNNNNTANTGATTCGAGGTCACGTTTCAGAAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCGGGGTTCCGGTGCGAGCTGTATTAC
TACGCAGAGGTCGCCCGGACGGGCCGCCACTCCATTTAGGGCCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCAACGCCGACCTCCCCA
GGGGAGGTCGAGGGTTGCAGGGCCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCAACGCCGACCTCCCCAGGGGAGGTCGAGGGTTGTGCGA
TGATTCAGTGGATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAA
AGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGGCGTATTCAGAGATGCTGGAATACAAGAGTTTGAGGTCCCGGGCGGGCCGCTGGTCCA
GTCCGCGTCCGGGCTGGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTAGGTTACACAGAAGGGTTAGGGAGTTGAAAACCTCGGTAATG
ATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAN

5.6 Homología de las secuencias

Los resultados de las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos universales ITS 4 e ITS 5 de la cepa 11 Pose una longitud de: 560 pares de bases, 12 pose una longitud de: 560 pares de bases y UAM I pose una longitud de: 563 pares de bases. Conforme la base de datos DNA GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) tiene homología se indica en las tablas 5.2, 5.3 y 5.4. Reiterando que todas las cepas UAM I, 11 y 12 pertenecen a *B. bassiana*.

Tabla 5.2 Homología de la Cepa UAM I con base DNA GenBank.

Descripción	Cobertura	Identidad	Comentarios	Número de Acceso
<i>Beauveria bassiana</i> aislado 5ª 18S Gen RNA Ribosomal	100%	100%	La cepa UAM I es 100% homologa al aislado 5ª	KX255641 KX255641.1
<i>Beauveria bassiana</i> cepa STB 28S-18S rRNA	99%	99%	La cepa UAM I comparte una similitud del 99% con cepa STB	JF429894 JF429894.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado DAOM216540 18S ribosomal Purificada RNA gene	99%	99%	La Cepa UAM I es 99% homologa a DAOM216540	EU334679 EU334679.1
<i>Beauveria bassiana</i> cepa DAOM195005 18S Gen RNA Ribosomal	99%	99%	La cepa UAM I comparte 99% de Similitud con DAOM195005	EU334677 EU334677.1
<i>Beauveria bassiana</i> genes de 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA. IMI 382765.	99%	99%	La cepa UAM I tiene 99% de similitud al IMI 382765	AB027382 AB027382.1
ITS <i>Beauveria bassiana</i> aislado M188T3M1DCC49, 28S rRNA	99%	99%	El aislado M188T3M1DCC49 comparte 99% de homología Genética con UAM I	JQ411374 JQ411374.1

Tabla 5.3 Homología de la Cepa 11 con base DNA GenBank

Descripción	Cobertura	Identidad	Comentarios	Número de Acceso
<i>Beauveria bassiana</i> aislado J18 18S Gen RNA Ribosomal	100%	100%	La cepa 11 comparte 100% de similitud con aislado J18	MH165267 MH165267.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado NBAll-Bb-69	100%	100%	El aislado NBAll-Bb-69 es 100% homologo a cepa 11	JQ434752 JQ434752.1
<i>Beauveria bassiana</i> Secuencia VKBb03	99%	99%	La secuencia VKBb03 comparten 99% de similitud con cepa 11	MG548313 MG548313.1
<i>Beauveria bassiana</i> secuencia parcial INRS-CFL-A	99%	99%	La secuencia parcial INRS-CFL-A es 99 % Homologa	KJ941113 KJ941113.1
<i>Beauveria bassiana</i> ITS1, 5.8S gen rRNA e ITS2, aislamiento IMI 382765.	99%	99%	El aislado IMI 382765 es 99% Igual que cepa 11	AJ560684 AJ560684.1
<i>Beauveria bassiana</i> cepa PAL-B01	99%	99%	La cepa PAL-B01 y cepa 11 son similares en un 99%	JN713137 JN713137.1

Tabla 5.4 Homología de la Cepa 12 con base DNA GenBank

Descripción	Cobertura	Identidad	Comentarios	Número de Acceso
Aislado de <i>Beauveria bassiana</i> F. Carrap.	100%	100%	El aislado de F Carrap y cepa 12 comparten 100% de homología	JN195741 JN195741.1
<i>Beauveria bassiana</i> cepa ARSEF 8175	99%	99%	La cepa 12 y ARSEF-8119 son 99% iguales	KJ941122 KJ941122.1
<i>Beauveria bassiana</i> cepa ARSEF 8119	99%	99%	La cepa 12 y ARSEF-8119 comparten 99% de similitud	KJ941121 KJ941121.1
<i>Beauveria bassiana</i> secuencia INS-236	99%	99%	La cepa 12 contiene 99% de semejanza que la secuencia INS-236	KJ941118 KJ941118.1
▪ <i>Beauveria bassiana</i> cepa INRS 207	99%	99%	La ceoa INRS 207 y cepa 12 son 99% iguales.	KJ941111 KJ941117.1
<i>Beauveria bassiana</i> cepa TSJBB	99%	99%	La cepa TSJBB y cepa 12 son 99% homologas	KF937310 KF937310.1

VI. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS.

- Se implementa un protocolo para la extracción de ADN que por medio de un primer se establecen las bases para que sea específico para la especie a identificar.
- Se logra la estandarización de la técnica ya que se realiza con diferentes cepas de *Beauveria bassiana* con la que se logran identificar en un porcentaje superior al 99%, logrando así establecer una técnica confiable que permite identificar especies de interés experimental o de investigación.
- La obtención de la secuenciación de los genes ribosomales por medio de PCR, secuenciados por el primer para obtener los oligonucleótidos ITS4 e ITS5, son favorables para identificar cualquier tipo de célula eucarionte, dando posibilidad a muchos investigadores a realizar pruebas de identificación, ya sea enfermedades, medicamentos, entre otros usos que se le puede determinar.

VII Conclusiones

El método de extracción con kit empleado para la extracción de ADN resultó ser eficaz al obtener un buen rendimiento de ADN y alto grado de pureza partiendo de muestras pequeñas de hongos por lo que resulta conveniente usarlo cuando se tiene cantidades pequeñas de muestra además que el ADN obtenido puede ser utilizado para la amplificación de fragmentos de ADN.

Tanto con los oligonucleótidos universales ITS4 y ITS1 y con ITS4 y ITS5 se produjeron productos de PCR de aproximadamente 650 pb para las cepas de 11, UAM-1 y 12.

Los oligonucleótidos universales ITS1, ITS4 y ITS5 resultaron eficaces para la identificación de hongos entomopatógenos ya que al tratarse de oligonucleótidos universales tienen la capacidad de identificar gran variedad de especies mediante la amplificación de los genes ribosomales y las regiones ITS, aunque dos de las muestras de ADN extraído estuvieran fuera de las recomendaciones de absorbancia y pureza fueron amplificadas con éxito posiblemente al gran número de copias de los genes ribosomales y regiones ITS en el genoma.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Assaf L., Hassan F., Younis G. 2007. Ecological study and evaluation of activity of *Beauveria bassiana* J. Agricultural. 6: pp 459-464.

Cañedo B., Ames T. 2004 al Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Manual de laboratorio pp. 5-20.

Carrillo B. 2008 Variación genética de aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Laboratorio de Patología de Insectos Postgrado en Fitosanidad, Colegio de Postgraduados.

Días, B. A., Neves, P. M. O. J., Furlaneto-Maia, L., & Furlaneto, M. C. (2008). Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle / Proteases degradadoras de cutícula produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em presença de cutícula de broca do café. Brazilian Journal of Microbiology, 39(2), 301–306.

Díaz-Alonso C., Garrote-Santana H., Amor-Vigil AM., Suárez-González Y., González-Mugica R.. (2013) Cuantificación del ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. Rev. Cubana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfuncional. 29:pp 298-303.

Duperchy, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. pp 111.

Huang, B.-F., & Feng, M.-G. (2009). Comparative Tolerances of Various *Beauveria bassiana* Isolates to UV-B Irradiation with a Description of a Modeling Method to Assess Lethal Dose. Mycopathologia, 168(3), 145.

Herraez A. 2012 Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud, 2ª ed. Editorial Elsevier. pp. 17;33-37;190.

Jill U. Adams. 2008 DNA Sequencing Technologies. Nature Education. 1, pp193

Llorens V., Martín M.P., Hidalgo E., 1997 PCR: Una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrícicos. Catalana Micology. 1.20, pp 187-198

Montoya Solano, J. D., Suárez Moreno, Z. R., Riaño Pachón, D. M., Montoya Castaño, D., & Aristizábal Gutiérrez, F. A. (2007). Oligonucleotide probe design for the study of cellulolytic and solventogenic genes in colombian *Clostridium*sp. strains (*Clostridiaceae*). Acta Biológica Colombiana, 12(suppl 1), 55–74.

Somma M., 2009 Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos, Manual de Extracción y Purificación de ADN. Manual pp.2-4

Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Roy, H. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology, 2(4), 149-159.

Velázquez A., L. Patricia, Aragón Martínez M., C. Romero A., 2011. Extracción y purificación de ADN <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/710/extraccion.pdf> (Consulta 11-03-2016)

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor 1990c. In: Innis, M.A. D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego. 38, pp. 315-317

Zimmermann, A., Lüthy, J. y Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. A 207, 81–90.

IX ANEXOS

-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 xilonocianol.

Se miden 30 mL de Glicerol y se vierte en un matraz volumétrico de 100 mL se incorpora, se adicionan 0.25 g de azul de bromofenol (Utilizar guantes y equipo de seguridad al ser un producto muy toxico), se adiciona al matraz y se agita; se pesan 0.25 g de xilonocianol se adiciona al matraz y se agita hasta su total disolución, aforar con agua y se agita vigorosamente con la tapa puesta.

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO



M. en C. JOSÉ NORBERTO VÁSQUEZ BONILA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:

“Identificación molecular de hongos entomopatógenos mediante amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y regiones ITS”.

Correspondiente al proyecto genérico:

Obtención De Materias Primas, Principios Activos, Medicamentos Y Productos Biológicos.

P R E S E N T A:

José Luis Rodríguez Ramírez

MATRICULA: 204353863

Tutores:

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
M. en C. José Norberto Vásquez Bonilla

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorio De Biotecnología, Edificio N. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, con Dirección: Calzada Del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, Alcaldía de Coyoacán, C.P 04960, Ciudad de México, México.

Periodo: 02 Febrero 2016 al 02 Septiembre 2016

Ciudad

de

México,

Septiembre

2021

X. RESUMEN

Los hongos entomopatógenos (HE) son aquellos que parasitan diferentes órdenes de insectos por lo que han tomado una gran importancia en el control biológico de plagas al ser un parásito de diferentes insectos que afectan la industria alimentaria y de importancia para el control biológico de las plagas evitando la contaminación por químicos o tóxicos que contienen los tratamientos con insecticidas (Rodríguez, et al, 2004) por lo que es de gran importancia su identificación y diferenciación entre las especies de HE.

La identificación molecular de HE es importante ya que nos permite identificar especies con alto grado de certeza ya que se trata de diferencias en el material genético de cada hongo. Los genes ribosomales y las regiones ITS son las regiones del genoma más ampliamente utilizadas para la identificación molecular ya que se trata de genes que presentan una alta tasa de polimorfismo lo que los hace muy variables entre especies además que estos genes se encuentran repetidos varias veces y en distintos lugares del genoma (cromosomas 13, 14,15,21 y 22) (Gómez, et al., 2012) lo que facilita su amplificación mediante PCR.

En éste trabajo realizo la identificación molecular de HE mediante la amplificación por PCR de los genes ribosomales y las regiones ITS posteriormente la secuencia de ADN amplificada se mandó a secuenciar a la unidad de biología molecular (UNAM) para poder identificar la especie de HE buscando la identidad de la secuencia en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), los resultados indicaron que las tres cepas analizadas pertenecen a la especie *B. bassiana* y tienen una homología superior al 96% con secuencias del GenBank, finalmente se discuten los resultados obtenidos como la calidad del ADN genómico extraído de diferentes cepas de HE, y la homología de la secuencia de ADN con otras especies de HE.

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO



M. en C. JOSÉ NORBERTO VÁSQUEZ BONILA