



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

“Visualización de peroxisomas en Metarhizium”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

Laura Gabriela Gaytán Esparza

TUTORES EXTERNOS :

Dra. Gloria Angélica González Hernández

Dr. Juan Carlos Torres Guzmán

TUTOR INTERNO :

Dr. Julio César Vega Arreguín

León, Guanajuato

2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Estoy muy agradecida a la ENES León UNAM, a mis compañeros de Ciencias Agrogenómicas y a todos los profesores que conocí en especial a los doctores Julio Vega, Harumi Shimada, Alejandra Rougon, Julio Amezcua y Antonio Hernández por contribuir en mi formación y en la redacción de este trabajo.

A los doctores Angélica González, Juan Carlos Torres e Israel Padilla y a mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato Adelissa, Karlita, Pablo, Adris, Yadi, Arely, Nancy, Chary y Chely, por su amistad, la confianza, la asesoría y los consejos.

A mi familia: mi mamá, mi papá, mis hermanas, mi hermano y su familia y Uciel, por tenerme la paciencia en mis momentos de estrés, el apoyo en todos los sentidos y por creer en mí y en mi sueño de estudiar la universidad a pesar de las dificultades.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la estancia de este proyecto.

A la UNAM por la beca de titulación.

Tabla de contenido

Índice de abreviaturas	7
Resumen	8
1. Introducción.....	9
1.1. Los hongos entomopatógenos	9
1.2. <i>Metarhizium</i>	10
Figura 1. <i>Metarhizium</i> y su interacción en el suelo.	10
Figura 2. Mecanismo de infección de <i>Metarhizium</i> en <i>Phyllophaga ravida</i>	12
Antecedentes.....	13
1.3. Nuevos factores de patogenicidad: familia de genes <i>2np</i>	13
Figura 3. Expresión diferencial del gen 2-nitropropano dioxigenasa de <i>M. anisopliae</i>	14
1.4. Localización celular de los genes <i>2np</i>	14
Figura 4. Secuencias de la señal PTS1 de los 6 genes de la familia <i>2np</i>	15
Figura 5. Localización intracelular de las proteínas 2NP en las cepas GFP-SKL o POT1-GFP en <i>S. cerevisiae</i>	16
1.5. Peroxisomas.....	16
Figura 6. Ubicación de las proteínas PEX12 y KAT en el peroxisoma.	19
Justificación	20
Objetivos.....	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Hipótesis.....	21
2. Metodología.....	22
2.1 Cepas empleadas.....	22
Tabla 1. Cepas utilizadas y generadas en este trabajo y sus características	22
2.2 Plásmidos empleados	23
Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.....	23
2.3 Oligonucleótidos empleados	23
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados y generados en este trabajo.....	23
2.4 Medios de cultivo.....	25
2.4.1 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	25
Medio Luria Bertani (LB)	25
2.4.2 Medio(s) de cultivo para <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
Medio Yeast Extract-Peptone-Soil (YPS).....	25
2.4.3 Medio(s) de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	25
Medio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD).....	25
Medio YNB-Ura BY4741	25

Medio YNB-Ura BY4742	25
Medio YNB-Ura Rafinosa 2%.....	26
Medio YNB-Ura Galactosa 2%.....	26
2.4.4 Medio(s) de cultivo para <i>Metarhizium</i>	26
2.5 Soluciones	27
2.5.1 Soluciones de uso general	27
Tritón X100 0.1 y 0.01%.....	27
2.5.2 Soluciones para <i>Agro</i> -transformación de <i>Metarhizium</i>	27
Solución Stock 2.5 MM Sales para Medio de Inducción	27
Solución de elementos-Traza elementales para la solución de sales M-100.....	27
Solución de Sales M-100	27
Solución Stock 1M MES.....	27
Solución 0.5 M Acetosiringona (AS)	28
2.5.3 Soluciones para transformación de <i>S. cerevisiae</i> por acetato de litio (LiAc).....	28
Tris-EDTA (TE) 10X (100 mM).....	28
Tris-EDTA 1X (10 mM).....	28
Acetato de litio (LiAc) 1 M	28
Acetato de litio 100 mM.....	28
Acetato de litio 100 mM/ TE 0.5 X.....	28
Polyethylenglicol (PEG) 3350 50%	28
Acetato de litio 100 mM/ PEG-3350 40% / TE 1X.....	29
2.6 Recolección de conidios de <i>Metarhizium</i>	29
2.7 Conteo en Cámara Neubauer	29
2.8 Métodos moleculares	29
2.8.1 Método de extracción de DNA plasmídico (Miniprep) de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> ...	29
2.8.2 Extracción de DNA genómico	30
2.8.3 Restricción enzimática.....	30
2.8.4 Purificación de fragmentos de DNA en gel de agarosa	30
2.8.5 Ligación de fragmentos con T4 ligasa.....	31
2.8.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
Figura 7. Condiciones de amplificación de la fusión Egfp-Pex12 de <i>Metarhizium brunneum</i> CARO19.	32
Figura 8. Condiciones de amplificación del cDNA del gen 3-cetoacil-CoA tiolasa (<i>Kat</i>) de <i>M.brunneum</i> CARO19.....	32
Figura 9.Condiciones de amplificación del gen Egfp (Enhanced Green Fluorescent Protein) para la fusión del cDNA del gen <i>Kat</i> con el gen <i>Egfp</i> de <i>M. brunneum</i> CARO19.	33
Figura 10. Condiciones de la segunda ronda de la reacción de PCR para la fusión de los amplicones <i>Kat</i> de <i>M. brunneum</i> CARO19 y <i>Egfp</i>	33

Figura 11. Condiciones de la tercera ronda (amplificación) de la fusión de <i>Kat</i> (cDNA)- <i>Egfp</i> de <i>M. brunneum</i> CARO19.....	34
Figura 12. Condiciones de amplificación del fragmento <i>Kat-Egfp</i> para la comprobación molecular de la transformación de <i>M. brunneum</i> Caro19 con el vector pPAGICA114.	34
Figura 13. Condiciones de amplificación del gen <i>Nat1</i> (codifica para la proteína Nurseotricina acetil transferasa que confiere resistencia al antibiótico nurseotricina) de selección para la comprobación molecular de la transformación de <i>M. brunneum</i> Caro19 con el vector pPAGICA114.....	35
2.8.7 Transformaciones.....	35
2.9 Microscopía de fluorescencia.....	37
2.9.1 Microscopía de <i>M. brunneum</i>	37
2.9.2 Microscopía de <i>S. cerevisiae</i>	38
3. Resultados.....	39
3.1. Construcción de la fusión <i>Egfp-Pex12</i>	39
Figura 14. Diagrama de amplificación de <i>Egfp-Pex12</i> por la técnica de PCR fusión.....	40
Figura 15. Diagrama de la construcción pGG690 y comprobación por restricción enzimática y PCR.....	41
3.2 Clonación de la fusión <i>Egfp-Pex12</i> en el vector pYES 2.0 de <i>S. cerevisiae</i>	41
Figura 16. Diagrama de la construcción pJRC133, comprobación por restricción enzimática y PCR.....	43
3.3. Construcción de la fusión <i>Kat-Egfp</i>	43
Figura 17. Contexto genómico del gen 3-cetoacil-CoA tiolasa (<i>KAT</i>).....	44
Figura 18. Diagrama de amplificación de <i>Kat</i> (cDNA)- <i>Egfp</i> por la técnica de PCR fusión.....	45
Figura 19. Electroforesis de PCR de la fusión <i>Kat-Egfp</i>	45
Figura 20. Diagrama de la construcción pJRC134, comprobación por restricción enzimática y PCR.....	46
3.4 Clonación de la fusión <i>Kat</i> (cDNA)- <i>Egfp</i> en el vector pYES 2.0 de <i>S. cerevisiae</i>	47
Figura 21. Diagrama de la construcción pJRC135, comprobación por restricción enzimática y PCR.....	48
3.5 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con los vectores pJRC133 y pJRC135.....	49
Figura 22. Microscopía de fluorescencia de cepas de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con distintas construcciones a las 6 horas de inducción de ^P GAL1.....	50
Figura 23. Microscopía de células transformadas de <i>S. cerevisiae</i>	53
Figura 24. Gráfica caja-bigotes de la longitud de las células de <i>S. cerevisiae</i> antes y después de la inducción de ^P GAL1.....	54
Figura 25. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor.....	55
3.6 Agrotransformación de <i>M. brunneum</i> con el vector pPAGICA114	55
Figura 26. Secuencia de la señal de localización peroxisomal 2 (PTS2) en la secuencia de la proteína 3-cetoacil CoA tiolasa.	55
Figura 27. Diagrama de la construcción pPAGICA114 y comprobación por PCR de las colonias transformantes de <i>A. tumefaciens</i>	56

Figura 28. Comprobación molecular por PCR del transformante de <i>M. brunneum</i>	57
Figura 29. Fluorescencia de hifas de <i>M. brunneum</i> etiquetadas con proteínas reporteras.....	59
4. Discusión	60
5. Conclusiones.....	63
6. Bibliografía.....	64

Índice de abreviaturas

cDNA: DNA de cadena complementaria.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DO: Densidad óptica.

EDTA: Etilendiaminotetracético

EGFP: Proteína Verde Fluorescente (en inglés Enhanced Green Fluorescent Protein).

KAT: Proteína 3-cetoacil-CoA tiolasa.

LiAc: Acetato de litio.

mM: Milimolar.

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

^PEF-1 α : promotor del gen del factor de elongación 1- α .

PEG: Polietilenglicol.

PEX: Proteína de biogénesis peroxisomal.

^PGAL1: promotor del gen Galactosa 1.

^PPGDA: promotor PGDA del gen *Nat1*.

pH: concentración de iones hidrógeno presentes en una disolución.

POT1: proteína peroxisomal de *S. cerevisiae*.

PTS: señal de localización peroxisomal (en inglés Peroxisomal Targeting Signal).

RFP: Proteína Rojo Fluorescente (en inglés Red Fluorescent Protein).

RNA: Ácido ribonucleíco

SKL: secuencia tripeptídica serina-lisina-leucina.

TAE: Tris, ácido acético, EDTA.

TE: Tris-EDTA.

Ura: Uracilo.

2np: gen con actividad 2-nitropropano dioxigenasa.

Resumen

Los hongos del género *Metarhizium* son entomopatógenos con un rango de hospedero de más de 70 órdenes de insectos; incluyendo a *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante) y *Phyllophaga ravidia* (gallina ciega) los cuales son considerados “plaga” de cultivos agrícolas. *Metarhizium* se ha utilizado ampliamente como bioinsecticida para el control biológico de insectos plaga. Recientemente, se ha descrito a estos hongos como colonizadores de raíces que promueven el crecimiento de las plantas.

Metarhizium, por medio de sus factores de patogenicidad, genera la enfermedad conocida como “muerte verde”, denominada así por el crecimiento de conidios de color verde olivo en la cutícula del insecto. Los mecanismos de infección de estos hongos incluyen, entre otros factores, adhesinas, proteasas, quitinasas, destruxinas, etc. En el Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato se identificó en *Metarhizium* a una familia de seis genes denominada *2np* (con actividad enzimática nitropropano dioxigenasa) como genes codificantes de potenciales factores de virulencia con actividad oxidante contra los nitroalcanos, oxidándolos a compuestos carbonilo y nitro. El análisis de la estructura primaria de las proteínas codificadas por estos genes sugiere la localización intracelular en los peroxisomas, debido a la presencia del péptido señal de localización peroxisomal (PTS1).

En un trabajo previo realizado por el grupo de investigación en *S. cerevisiae*., las fusiones de algunos de los genes *2np* de *Metarhizium* con una proteína verde fluorescente (GFP) co-localizaron con la señal producida tanto por la fusión traduccional GFP-SKL (GFP fusionada al tripéptido serina-lisina-leucina) como por la proteína POT1 (proteína peroxisomal propia de *S. cerevisiae*). Sin embargo, no se ha demostrado la localización intracelular de las proteínas codificadas por los genes *2np* en el propio hongo, en el cual tampoco se ha descrito la presencia de peroxisomas.

En este trabajo se realizó el etiquetamiento y la identificación de peroxisomas en *Metarhizium* mediante la agrotransformación de *M. brunneum* con el gen *Kat* (3-cetoacil-CoA tiolasa), que codifica para una proteína de matriz peroxisomal, fusionado a la EGFP. Se logró generar un transformante estable, en el cual se comprobó a nivel molecular y mediante fluorescencia un patrón de reconocimiento peroxisomal en la hifa del hongo. Así mismo, se clonaron en el plásmido pYES2.0 las proteínas PEX12, proteína integral de membrana peroxisomal, y KAT de *Metarhizium* etiquetadas ambas con EGFP para el estudio de su localización intracelular en el organismo modelo *S. cerevisiae*. Las células transformantes no mostraron fluorescencia pero si una reducción en el tamaño de las células madres e hijas seguida por la muerte de las células después de la inducción, signo de que las fusiones génicas provocaron estrés en la célula.

1. Introducción

1.1. Los hongos entomopatógenos

La prevalencia y los daños que generan las poblaciones de organismos denominados plagas afectan a un amplio rango de sectores. Su efecto en el área agrícola va desde la disminución o pérdida del cultivo, daños en la inocuidad para el cultivo y el producto, menor producción, aumento en los precios e incluso inseguridad alimentaria (FAO, 2001).

Para el control de estas plagas se utilizan varias alternativas, y una de ellas es el control biológico. El control biológico consiste en utilizar al depredador natural, patógeno o parásito del organismo objetivo a combatir. El organismo benéfico ideal a introducir debe de completar su ciclo de vida en el sitio y después reproducirse de manera eficiente en el ecosistema (Gliessman, 2002).

Cerca de 50 organismos entre virus, bacterias, hongos y nemátodos son entomopatógenos y son producidos y usados comercialmente como bioinsecticidas (Lacey et al., 2015). Con el conocimiento de que se estiman 5.1 millones de especies de hongos (Blackwell, 2011) donde aproximadamente 750 a 1000 especies son patógenos de insectos (St. Leger & Wang, 2010). En adición, los hongos entomopatógenos son adecuados para su uso como biopesticidas de contacto, ya que a diferencia de las bacterias y virus, la infección generada por ellos es a través de la penetración directa de la cutícula (Thomas & Read, 2007).

Cañedo y Ames (2004) describen las principales ventajas de los hongos entomopatógenos:

1. Su grado de especificidad es variable de acuerdo a su grado taxonómico.
2. Si las condiciones son favorables para la persistencia se evitan aplicaciones innecesarias.
3. Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis subletales de insecticidas químicos, para lograr efectos superiores a las aplicaciones por separado.
4. No contaminan el medio ambiente.
5. Si el hongo no mata al insecto, este produce efectos secundarios en el ciclo vital del insecto.

Las principales desventajas son:

1. Susceptibles a las condiciones climáticas como temperatura, humedad y luz ultravioleta.
2. Requieren condiciones de almacenamiento estrictas para evitar la disminución de su viabilidad.
3. La muerte del insecto no es instantánea, su tiempo de acción varía entre 1 y 3 semanas después de la aplicación.

1.2. *Metarhizium*

Los hongos del género *Metarhizium* son entomopatógenos con una amplia distribución geográfica y climática. Son un modelo para el estudio de los mecanismos de infección de los hongos entomopatógenos hacia los insectos hospederos. Recientemente se ha descrito su comportamiento como endófito actuando como colonizador de rizósfera y promotor del crecimiento de la planta (Sasan & Bidochka, 2012).

El hábitat de los *Metarhizium* es el suelo, en donde forman parte de la comunidad de microorganismos que interactúan con las raíces de las plantas, a las cuales es capaz de transferirles nitrógeno del cadáver de un insecto previamente infectado y muerto por *Metarhizium* (Behie et al., 2012). A cambio, el hongo recibe algún azúcar elaborado por la planta a través de la fotosíntesis (Behie et al., 2017).

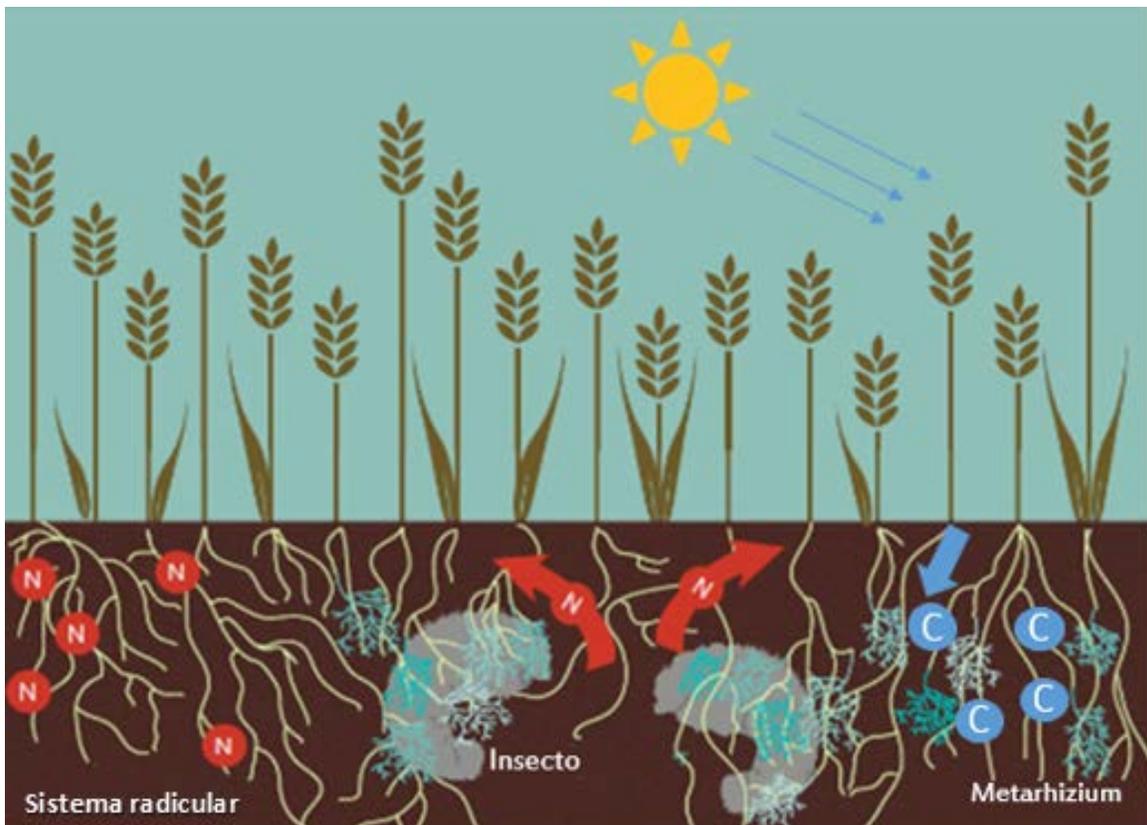


Figura 1. *Metarhizium* y su interacción en el suelo. *Metarhizium* vive en comunidad con la planta, a la cual le transfiere nitrógeno asimilable, tomado de su interacción con el insecto, y a cambio recibe azúcar a través de la fotosíntesis realizada por la planta. Tomada y modificada de (Behie et al., 2012).

Los hongos del género *Metarhizium* son conocidos por infectar a un amplio espectro de insectos; 70 órdenes de insectos por parte de las, al menos, 7 especies que componen al género. La enfermedad causada por este hongo se denomina “muerte verde”, debido a la formación de nuevos conidios de

color verde olivo sobre el cadáver del hospedero y a que en cultivo axénico toma el mismo color (Bischoff et al., 2009).

Dentro del género *Metarhizium* se encuentran al menos 7 especies:

- *M. anisopliae* hongo generalista de insectos Orthoptera, Coleoptera, Isóptera, Díptera y Hemiptera (Wang et al., 2011).
- *M. robertsii* hongo generalista de insectos Orthoptera, Coleoptera y Hemiptera (Wang et al., 2011).
- *M. brunneum* hongo generalista de insectos de Coleoptera, Lepidóptera y Hemiptera (Wang et al., 2011).
- *M. album* específico de insectos hemípteros (Wang et al., 2011).
- *M. majus* asociado a insectos coleópteros y lepidópteros (Wang et al., 2012).
- *M. gizhouense* infecta a Isóptera (Medina-Garnica, 2016).
- *M. acridum* infecta insectos de la orden Orthoptera (Wang et al. 2011).

Metarhizium se ha utilizado en el manejo de diferentes tipos de insectos plaga, entre los cuales se encuentran las larvas y ninfas de la garrapata de bovinos *I. ricinus* (Wassermann et al., 2016), las larvas del mosquito vector del Dengue y Chikungunya, *Aedes albopictus* (Lee et al., 2015), las ninfas de trips *Frankliniella occidentalis*, los insectos plaga de cultivos hortícolas, cítricos y especies ornamentales (Wraight et al., 2016), el vector de la malaria *Anopheles culicifacies* con metabolitos secundarios de *M. anisopliae* (Prakash, 2014) entre otros.

Una característica importante de los hongos entomopatógenos es su proceso de infección el cuál es común a todos e incluye las siguientes etapas: adhesión y germinación; invasión del hospedero; diseminación dentro del hospedero; acción de las toxinas; anulación de la respuesta inmune del insecto y crecimiento fuera del hospedero (Fig. 2).

El proceso de infección comienza cuando los conidios se adhieren a la cutícula del insecto. La superficie del conidio está cubierta por una estructura compuesta de proteínas hidrofóbicas. Como la cutícula del insecto es hidrofóbica, la adherencia del conidio a la cutícula del insecto se lleva a cabo a través de mecanismos hidrofóbicos no específicos. Una vez unido a la cutícula, el conidio germina, utilizando los lípidos y nutrientes solubles presentes en la cutícula del insecto. En presencia de nutrientes y agua estos conidios germinan y forman el tubo germinativo, o hifa sin diferenciar, con elongación apical. El alargamiento se detiene y el ápice se hincha para formar la estructura llamada apresorio, que es el principal sitio de adhesión y producción de enzimas. El apresorio ayuda a la ruptura de la cutícula del insecto y establece una relación nutricional con el hospedero (Aw & Hue, 2017).

Del apresorio emerge una hifa infectiva que inicia el proceso de penetración, en éste participan mecanismos físicos y químicos. En el proceso físico la hifa infectiva ejerce presión y rompe las áreas membranosas de la cutícula (Driver et al., 2000). En el proceso químico intervienen enzimas hidrolíticas principalmente proteasas, quitinasas, lipasas, entre otras, implicadas en la degradación de la cutícula (Leger et al., 1992).

Posteriormente, la hifa entra al hemocele, cavidad del sistema circulatorio del insecto, donde se diferencia en blastoesporas que proliferan en la hemolinfa, líquido circulatorio del insecto. *Metarhizium* produce una toxina llamada destruxina que inhibe la respuesta inmune provocando la muerte del insecto. *Metarhizium* utiliza como nutrientes aquellos solubles dentro del insecto. Después, el micelio emerge y crece sobre el cadáver, produciendo conidios capaces de comenzar de nuevo el proceso infeccioso (Samuels et al., 1988).

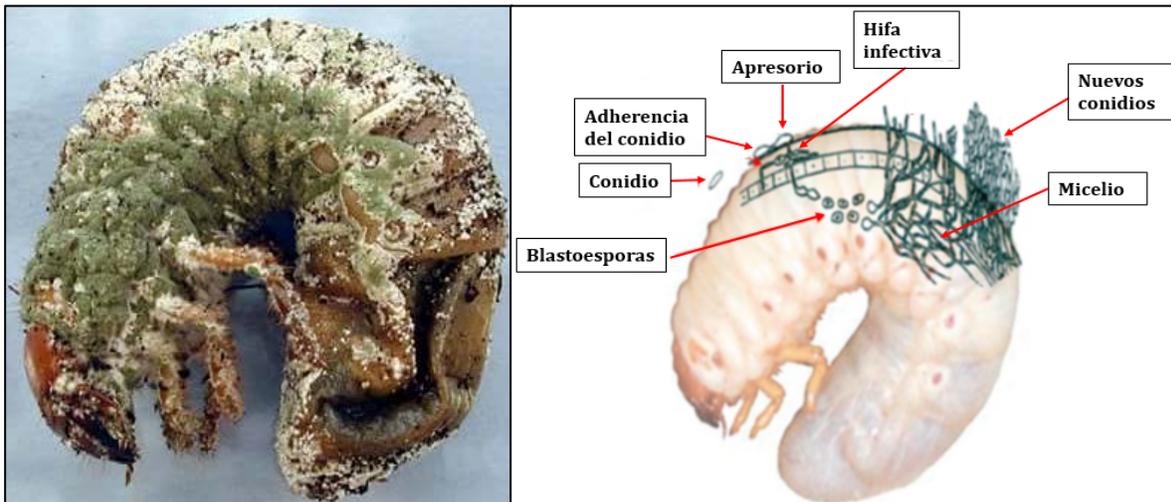


Figura 2. Mecanismo de infección de *Metarhizium* en *Phyllophaga ravid*.
Imagen tomada y modificada de (Sasan & Bidochka, 2012).

En el estudio de los mecanismos implicados en el proceso de infección de *Metarhizium* a los insectos hospederos se han descrito distintos genes. En el proceso de adhesión de los conidios se ha mostrado que la adhesina MAD1 permite la adhesión a la cutícula del insecto, mientras que la adhesina MAD2 permite la adhesión a la epidermis de la planta (Wang and Leger, 2007). En *M. acridum* el gen *MaHog1*, que codifica para una quinasa implicada en la respuesta a estrés generada por el proceso de virulencia, es requerido para la penetración y post-penetración. La disrupción de este gen tuvo como consecuencias la disminución de la germinación de los conidios, la reducción en la formación del apresorio y el declive en la tasa de crecimiento en la hemolinfa del insecto (Jin et al., 2012).

Otros factores de virulencia involucrados en el proceso de infección por *Metarhizium* son las proteasas tales como la subtilisina, metaloproteasas y varias familias de peptidasas, las cuales son importantes durante la infección y degradación de la cutícula del insecto vinculado a la infectividad del hospedero (Jin et al., 2012). En el mismo paso de infección de la cutícula se han descrito a las quitinasas y a las lipasas. Se han caracterizado seis quitinasas en *M. anisopliae*, son enzimas que reblandecen la cutícula del hospedero, proporcionando nutrientes y permitiendo la penetración del hongo para colonizar al hospedero. Las lipasas, enzimas identificadas en la superficie del conidio, están implicadas en el reconocimiento del hospedero así como en la degradación de lípidos, nutrientes destinados a la germinación del conidio y a su posterior penetración de la hifa (Schrank & Vainstein 2010).

Un factor de virulencia que participa en el proceso de infección a nivel de inhibición del sistema inmune del insecto son las destruxinas, de las cuales se han descrito catorce especies con propiedades insecticidas variables (Borges et al., 2010) como son la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y de proteínas, parálisis, bloqueo de la actividad ATPasa y supresión de las respuestas de defensa (Golo et al., 2014).

Antecedentes

1.3. Nuevos factores de patogenicidad: familia de genes *2np*

Un organismo patógeno es un agente biológico que causa un daño directo durante su interacción con el hospedero, a través de moléculas producidas por el mismo organismo (factores de virulencia), o indirecto alterando la respuesta inmune del hospedero (Cañedo & Ames, 2004).

La naturaleza de la especificidad o el amplio rango de infección por parte de *Metarhizium* se han relacionado con actividades tanto enzimáticas como mecánicas, sin embargo, no se cuenta con una descripción precisa de los mecanismos moleculares involucrados en su patogenicidad (Padilla-Guerrero, 2006).

En la búsqueda de nuevos factores de patogenicidad de los *Metarhizium*, de su especificidad de hospederos y de los genes implicados en esto, en el grupo de trabajo del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato se realizó la obtención de ESTs (Expressed Sequence Tag) y su utilización en microarreglos, así como la técnica de RDA (Representational Difference Analysis) para la identificación de genes de expresión diferencial como posibles factores de patogenicidad.

Padilla-Guerrero (2010) identificó varias secuencias como posibles participantes en el proceso de invasión de *M. brunneum* hacia *Phytophaga ravidia* y *Plutella xylostella*. Los genes de expresión

diferencial se analizaron de acuerdo con sus perfiles de expresión en cuatro fuentes de carbono: glucosa, quitina, cutícula de *P. ravidia* (como condiciones de inducción de genes de patogenicidad) y durante el proceso de infección *in vivo* a *P. xylostella*. Dentro de las secuencias con expresión diferencial se encontraron secuencias que mostraron identidad con las proteínas 2NP. Los análisis de expresión mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativo y Northern blot, mostraron un elevado nivel de expresión de dichos genes en cutícula de *P. xylostella* (Fig. 3).

El análisis del genoma de hongos como *Gibberella zeae*, *Aspergillus fumigatus*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa* y *Metarhizium brunneum*, mostró que en estos genomas se encuentran de 5 a 6 genes *2np* (Padilla-Guerrero, 2010; López-Macías, 2013). Los genes *2np* catalizan la desnitrificación oxidante de los nitroalcanos a sus correspondientes compuestos carbonilo y nitro (Ramírez-Cuellar, 2012). Los nitroalcanos están presentes en la cutícula de los insectos y en las plantas son producidos como toxinas de defensa (Daubner et al., 2002).

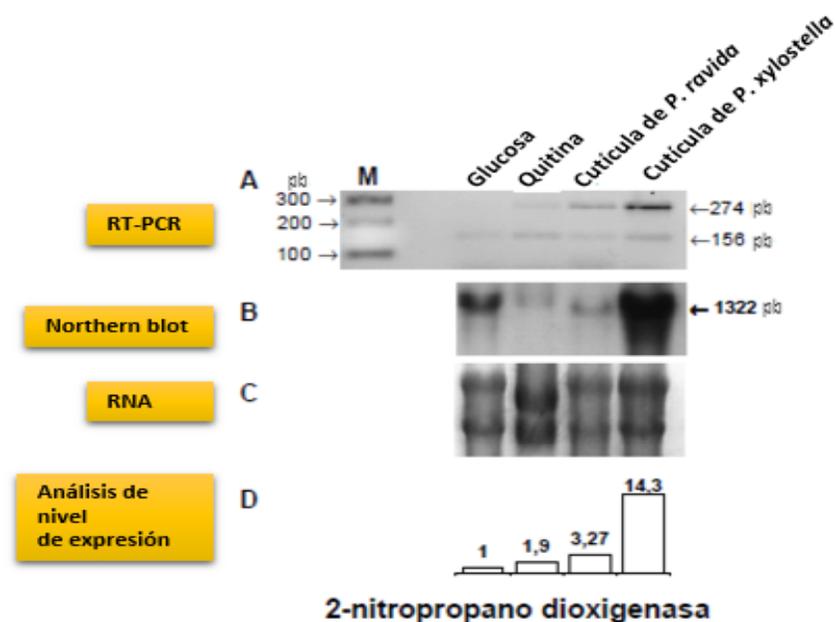


Figura 3. Expresión diferencial del gen 2-nitropropano dioxigenasa de *M. anisopliae*. En la figura se muestra los análisis de perfiles de expresión en distintas condiciones. **A.** Productos de RT-PCR; **B.** Northern blot; **C.** Carga de RNA para el ensayo Northern blot; **D.** análisis del nivel de expresión. **M.** Marcador de peso molecular en pb. Imagen tomada y modificada de (Padilla-Guerrero, 2006).

1.4. Localización celular de los genes *2np*

El siguiente paso en el estudio de los genes *2np* fue conocer su localización intracelular. En el grupo de trabajo se analizaron las secuencias proteicas de la familia de genes. Se observó que contienen en el extremo carboxilo terminal al péptido señal PTS1 correspondiente a la secuencia de

aminoácidos SKL (Serina-Lisina-Leucina) o a las variantes AKL (Alanina-Lisina-Leucina) o AHL (Alanina-Histidina-Leucina). En otros organismos se ha descrito al péptido señal PTS1 como responsable de dirigir a las proteínas hacia los peroxisomas (Mast et al., 2010).

Genes <i>2np</i>	Secuencias de aminoácidos
<i>2np1</i>	MASP.....KKG NQMI AKL
<i>2np2</i>	MAPK.....GT YLDGG SKL
<i>2np3</i>	MAPS.....NV YLNSK SKL
<i>2np4</i>	MATS.....QAG SNMI AKL
<i>2np5</i>	MPRV.....SAL IVPE SKL
<i>2np6</i>	MTAI.....A ILTSVV AHL

Figura 4. Secuencias de la señal PTS1 de los 6 genes de la familia *2np*.

En *Neurospora crassa* se han identificado al menos 3 proteínas 2NP dentro de los glioxisomas, organelos cuyas proteínas también contienen la señal PTS1 (Bartoszewska et al., 2011).

Ramírez-Cuellar (2014) y López Macías (2013) estudiaron la localización de tres de los genes *2np*, a los cuales se les fusionó el ORF del gen reportero *Mcherry* que codifica para la proteína rojo fluorescente (RFP). Dichas fusiones fueron introducidas a *S. cerevisiae*, organismo en la cual la biogénesis peroxisomal está bien estudiada. Para ello las construcciones *2np-Mcherry* se introdujeron a las cepas etiquetadas previamente con GFP-SKL o POT1-GFP donde por empalme se demostró la localización peroxisomal de las proteínas 2NP (Fig. 5). Este resultado es muy importante ya que a pesar de que las especies del género *Metarhizium* son uno de los hongos entomopatógenos más estudiados, no se han descrito los peroxisomas en ellos.

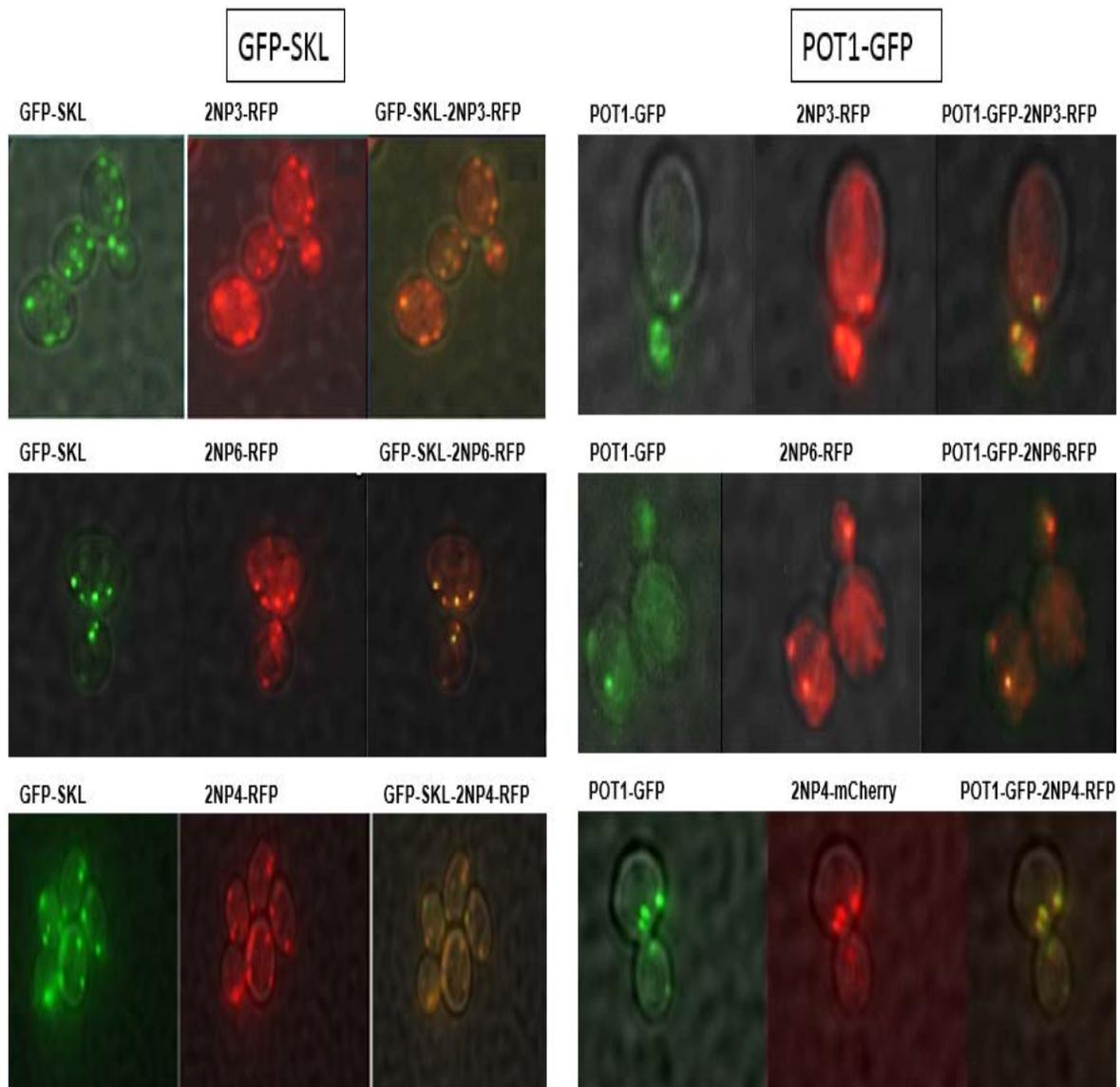


Figura 5. Localización intracelular de las proteínas 2NP en las cepas GFP-SKL o POT1-GFP en *S. cerevisiae*. Imagen tomada y modificada de (López Macías, 2013) (Ramírez-Cuellar, 2012).

1.5. Peroxisomas

Los peroxisomas son un compartimento intracelular con funciones metabólicas importantes y presentes en organismos del reino eucariota. En ellos se produce la desintoxicación de compuestos dañinos. Los peroxisomas son organelos en forma de vesículas circulares u ovoides de una sola membrana con un diámetro de 0.1 a 1.0 μm . Fueron descritos por Rhodin en 1954, quién identificó un conjunto de microcuerpos, los cuales posteriormente fueron caracterizados como gluosomas, glioxisomas y peroxisomas (Salceda-Sacanelles, 2008).

Los peroxisomas no poseen un genoma ni la maquinaria de transcripción y traducción. Además todas las proteínas son importadas del citosol a través de la membrana peroxisomal. La importación de proteínas citosólicas depende de dos señales diferentes conocidas como peroxisomal targeting signal (PTS) de tipo 1 y 2.

La mayoría de las proteínas peroxisomales contienen la señal PTS1, la cual se localiza en el extremo carboxilo terminal de las proteínas. La señal PTS1 tiene una secuencia consenso (S/A/C)-(K/R/H)-(L-M). Existe otra señal peroxisomal menos frecuente llamada PTS2 que al igual que PTS1 dirige a las proteínas con señal peroxisomal en su secuencia peptídica hacia el interior de los peroxisomas. La secuencia consenso de PTS2 es (R/K)-(L/V/I)-X5-(H/Q) se encuentra localizada en el extremo amino-terminal de las proteínas.

Las proteínas con las señales PTS1 o PTS2 son reconocidas y unidas a su respectiva proteína receptora (PEX5 para PTS1 y PEX7 para PTS2) en el citosol. Después, este complejo se asocia con los receptores de importación localizados en la membrana peroxisomal, los cuales trasladan la carga hacia el interior de los peroxisomas (Gonzalez et al., 2011).

El mecanismo de importación de proteínas con señal peroxisomal 1 (Fig. 6A) consta de 5 fases:

- 1) La proteína receptora PEX5 en el citoplasma reconoce a las proteínas con señal PTS1. PEX5 se asocia a la proteína peroxisomal.
- 2) A continuación, la asociación de PEX5-proteína se une al complejo de anclaje de peroxinas PEX13, PEX14 y PEX17 localizado en la membrana peroxisomal.
- 3) Después ocurre la translocación de la proteína a través de un poro membranal formado por PEX5 en conjunto con PEX14. A través del poro entra la proteína hacia a la matriz peroxisomal; donde PEX8 realiza la separación del complejo PEX5-proteína.
- 4) Posterior a la translocación, PEX5 es ubiquitinada por el conjunto de proteínas membranales peroxisomales PEX2, PEX10, PEX12, PEX4 y PEX22. Después, PEX5 es liberada de la membrana peroxisomal de una manera dependiente de ATP por las peroxinas ATPasas PEX1 y PEX6 que están ancladas a la membrana peroxisomal a través de PEX15.
- 5) Por último, PEX5 tiene dos posibles vías: degradación proteosomal o volver al citoplasma a realizar otra ronda de importación de proteínas con señal PTS1.

El gen *Pex12* forma parte de la familia de las peroxinas y codifica para una proteína de ubicación membranal en el peroxisoma que forma parte de la maquinaria de importación de proteínas del citosol al peroxisoma. Las proteínas con secuencia PTS exponen el extremo NH₂ terminal hacia el lumen del peroxisoma y el extremo COOH hacia el citoplasma (Smith & Aitchison, 2013). La proteína PEX12 junto con las peroxinas PEX2 y PEX10 son ubiquitin ligasas E3 y forman el complejo llamado RING finger, que permite mediar las interacciones proteína-proteína mediante el dominio de unión a

zinc que le permite interactuar con las proteínas PEX5 y PEX10 vía su carboxilo terminal (COOH) (Albertini et al., 2001). Además este complejo con las enzimas ubiquitin E2 PEX4/PEX22 tienen como función ubiquitinar la proteína receptora PEX5 lo cual permite su reciclaje hacia el citosol para una nueva ronda de importación de proteínas al peroxisoma (Platta et al., 2016), o para su degradación proteosomal (Meinecke et al., 2016b). Junto con las peroxinas que pertenecen al complejo RING finger y las peroxinas PEX13, PEX2, PEX10, PEX3 y PEX19; PEX12 está involucrada en la formación de la membrana del peroxisoma (Peraza-Reyes et al., 2008).

Los peroxisomas se caracterizaron originalmente por la presencia de peróxido de hidrógeno producido por oxidoreductasas y de catalasas para descomponer el peróxido de hidrógeno (Salceda-Sacanelles 2008). Sin embargo, los peroxisomas están involucrados en una variedad de rutas anabólicas y catabólicas, cuyas funciones varían entre organismos. En hongos filamentosos participan en el metabolismo de las fuentes de carbono usadas para el crecimiento y el metabolismo secundario (van der Klei & Veenhuis, 2013). Otra reacción metabólica en la que participan es la descomposición de ácidos grasos por β -oxidación (Lee et al., 2009) (Fig. 6B).

El gen *Kat*, ortólogo del gen *Pot1* de *Saccharomyces*, que codifica para la proteína 3-cetoacil-CoA tiolasa, se ubica en la matriz del peroxisoma en la levadura *S. cerevisiae* (Erdmann, 1994). Esta proteína participa en la última etapa del proceso de β -oxidación de ácidos grasos a partir del cual se obtiene NADH y FADH₂ para producir ATP. La proteína 3-cetoacil-CoA tiolasa se une al grupo CoA de la unidad 3-cetoacil-CoA, donde corta el grupo tiol lo que da como resultado dos moléculas de dos carbonos, un acetil-CoA y un acil-CoA. El proceso continúa al entrar el acetil-CoA al ciclo del ácido tricarboxílico, realizado en la mitocondria (Fillmore et al., 2011).

La característica que le da localización peroxisomal a la proteína 3-cetoacil CoA tiolasa es que en el extremo terminal N tiene la secuencia consenso PTS2 que está conservado desde levadura hasta humanos (Lazarow, 2006).

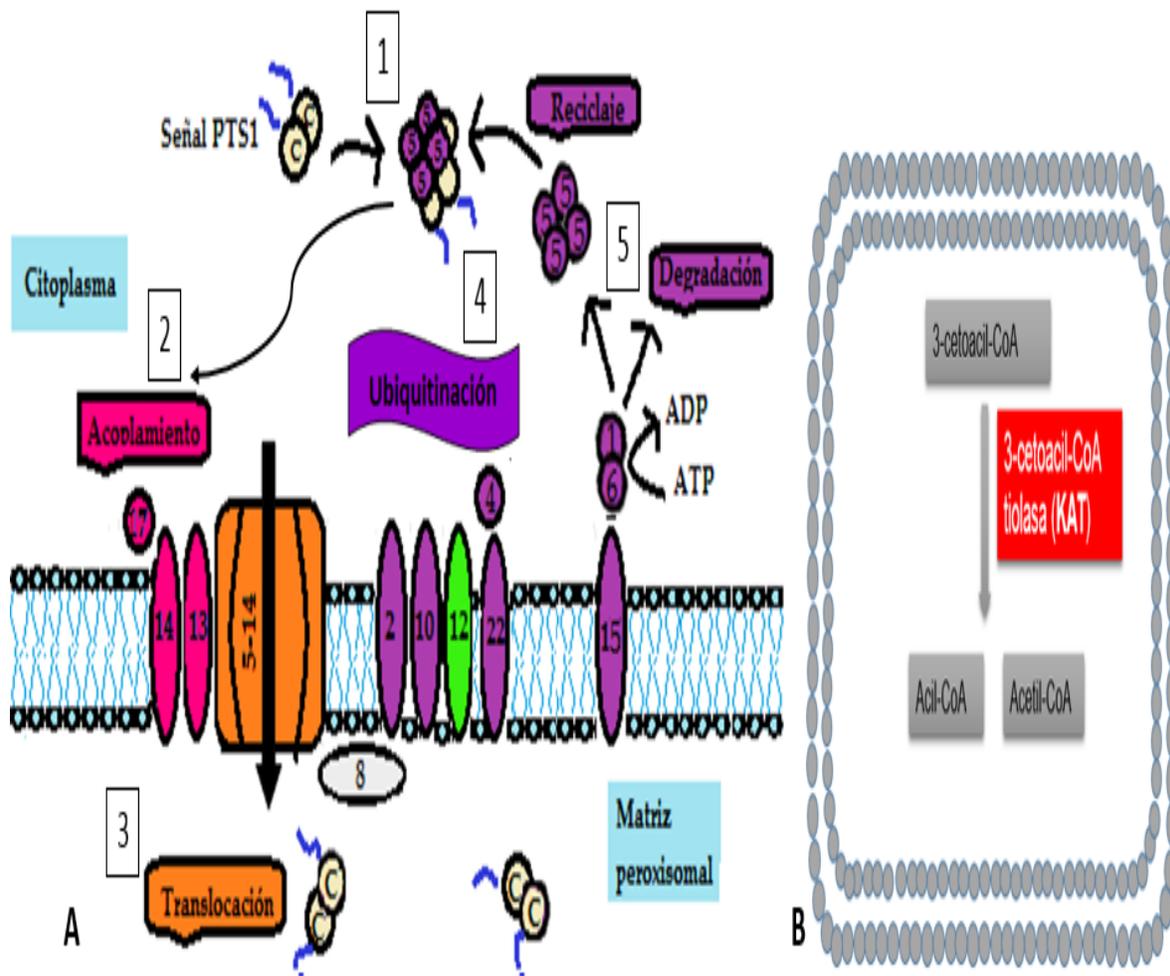


Figura 6. Ubicación de las proteínas PEX12 y KAT en el peroxisoma. **A.** Mecanismo de importación de proteínas al peroxisoma. PEX12 (color verde), proteína integral de la membrana del peroxisoma involucrada en el proceso de translocación de proteínas peroxisomales. Figura tomada y modificada de (Meinecke et al., 2016). **B.** Participación de la enzima 3-cetoacil CoA trolasa (KAT) en el último paso de la β -oxidación de ácidos grasos realizada en la matriz peroxisomal (Jin et al., 2012).

Justificación

El hongo del género *Metarhizium* es un organismo patógeno de insectos o mejor conocido como entomopatógeno que tiene un amplio rango de hospederos, dentro del género algunas de sus especies son generalistas y otras especialistas. Esta plasticidad de infección de hospederos podría estar relacionada con los factores que determinan su nicho patogénico.

Dentro de los factores genéticos de patogenicidad de los hongos del género *Metarhizium* que influyen en la selección del organismo huésped se encuentra la familia de genes *2np*, los cuales se predice mediante bioinformática que están localizados intracelularmente en peroxisomal y se ha confirmado su co-localización peroxisomal en *S. cerevisiae*.

Con el propósito de avanzar en el estudio de la familia de genes *2np* y mostrar su posible función en el establecimiento de los distintos estilos de vida de los hongos del género *Metarhizium*, es necesario demostrar la presencia de peroxisomas en dichos hongos, lo cual se puede llevar a cabo mediante fusiones génicas de proteínas peroxisomales de *Metarhizium brunneum* con proteínas fluorescentes.

Objetivos

Objetivo general

Visualizar los peroxisomas de *Metarhizium brunneum* mediante fusiones génicas

Objetivos específicos

1. Determinar la localización de las proteínas PEX12 y KAT de *Metarhizium* en *S. cerevisiae*, mediante fusiones con la proteína verde fluorescente GFP (GFP-PEX12 y KAT-GFP).
2. Etiquetar los peroxisomas de *M. brunneum* mediante agrotransformación con un vector binario que contiene la fusión KAT-GFP.

Hipótesis

Las proteínas codificadas por los genes *Kat* y *Pex12* fusionados a la proteína verde fluorescente GFP se localizan en los peroxisomas de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Metarhizium brunneum*.

2. Metodología

2.1 Cepas empleadas

Tabla 1. Cepas utilizadas y generadas en este trabajo y sus características

Organismo	Genotipo	Origen
<i>Metarhizium brunneum</i> CARO19	Silvestre	Laboratorio de Genética Molecular de Hongos.
<i>M. brunneum</i> CARO19 KAT-EGFP	Transformante KAT-EGFP.	Este trabajo
<i>M. brunneum</i> CARO19 MCHERRY	Transformante MCHERRY	Laboratorio de Genética Molecular de Hongos.
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F– φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL-1	AGL0 recA::bla pTiBo542(delta)T Mop+ CbR Hypervir, Onc-.	(Lazo et al., 1991). Donada por Dr. Augusto Schrank, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad de Federal do Río Grande do Sul, Brasil
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0.	EUROSCARF
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 2NP3-MCHERRY	YJR01. Transformante derivada de la cepa BY4741 que contiene la fusión <i>2np3-Mcherry</i> dentro del plásmido pYES 2.0. MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0. URA3.	(Ramírez-Cuellar, 2012). Laboratorio de Genética Molecular de hongos.
<i>S. cerevisiae</i> BY4742 POT1-GFP	MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0. <i>Pot1-Gfp</i>	Donadas por el Dr. Rachubinski; Universidad de Alberta, Canadá.
<i>S. cerevisiae</i> BY4742 GFP-SKL	MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0. GFP-SKL	Donadas por el Dr. Rachubinski; Universidad de Alberta, Canadá.
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 KAT-EGFP	YGG01. Transformante derivada de la cepa BY4741 que contiene la fusión <i>Kat-Gfp</i> dentro del plásmido pYES 2.0. MATa; his3Δ1; leu2Δ 0; met15Δ0; ura3Δ0. URA3.	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 EGFP-PEX12	YGG02. Transformante derivada de la cepa BY4741 que contiene la fusión <i>Egfp-Pex12</i> dentro del plásmido pYES 2.0. MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0. URA3.	Este trabajo

2.2 Plásmidos empleados

Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Procedencia
pGG690	Vector de clonación pGEM-TEasy que contiene el fragmento ~2011 pb del gen <i>Egfp</i> fusionado a la región codificante de <i>Pex12</i> de <i>M. brunneum</i> flanqueado por los oligos <i>Bgl</i> II GFPfd y <i>Spe</i> I Pex12rev	(Guerrero-Carrera, 2016) Laboratorio de Genética Molecular de Hongos. Universidad de Guanajuato
pPAGICA114	Vector de expresión binario de <i>A. tumefaciens</i> que contiene el fragmento ~2230 pb del gen <i>Egfp</i> fusionado al gen <i>Kat</i> de <i>M. brunneum</i> flanqueado por los oligos <i>Bam</i> HIKATdir y eGFP <i>Spe</i> lrev.	(Cerde-de Loera, 2016) Laboratorio de Genética Molecular de Hongos. Universidad de Guanajuato.
pYES2.0	Vector de expresión de <i>S. cerevisiae</i> .	Invitrogen
pJRC133	Vector de expresión de <i>S. cerevisiae</i> que contiene el fragmento ~2011 pb del gen <i>Egfp</i> fusionado a la región codificante del gen <i>Pex12</i> de <i>M. brunneum</i> flanqueado por los oligos <i>Bgl</i> II GFPfd y <i>Spe</i> I Pex12rev.	Este trabajo
pJRC134	Vector de clonación pGEM-TEasy que contiene el fragmento ~2004 pb del cDNA del gen <i>Kat</i> de <i>M. brunneum</i> fusionado al gen <i>Egfp</i> flanqueado por los oligos <i>Bam</i> HIKATdir-cDNA y eGFP <i>Spe</i> lrev.	Este trabajo
pJRC135	Vector de expresión de <i>S. cerevisiae</i> que contiene el fragmento ~2004 pb del cDNA del gen <i>Kat</i> de <i>M. brunneum</i> fusionado al gen <i>Egfp</i> flanqueado por los oligos <i>Bam</i> HIKATdir-cDNA y eGFP <i>Spe</i> lrev.	Este trabajo

2.3 Oligonucleótidos empleados

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados y generados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Descripción	Tamaño de amplicón
<i>Bgl</i> II GFPfd <i>Spe</i> I Pex12rev	5'- AGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAGC -3' 5'- ACTAGTTTATATTATGATCCTTCGCAAGCCTTCAG TTCCGC-3'	Par de oligonucleótidos directo y reverso flanqueados en el extremo 5' con la secuencia <i>Bgl</i> II y <i>Spe</i> I, respectivamente para amplificar la fusión <i>Egfp-Pex12</i> .	2011 pb
GFP Pex12rev	5'- CCGAAGGGCTGTGACGAACTCCATCTTGTACAG CTCGTCCATGCCGAGAGT -3'	Oligonucleótido reverso, en el extremo 5' cuenta con 24 pb de empalme del gen <i>Pex12</i> y en conjunto con el	747 pb

		oligonucleótido <i>Bgl</i> II GFPfd amplifica el gen <i>Egfp</i> para la fusión a <i>Pex12</i> .	
GFPPex12fd	5'- ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG ATGGAG TTCGTCACAGCCCTTCGG-3'	Oligonucleótido directo que en el extremo 5' cuenta con 27 pb de empalme del gen <i>Egfp</i> y en conjunto con el oligonucleótido <i>Spe</i> I Pex12rev amplifica el gen <i>Pex12</i> para la fusión a <i>Egfp</i> .	1315 pb
KATeGFPdir	5'- GGCCGCCGTCTGGGTCGCCGAG ATGGTGAGCA AGGGCGAGGAGC -3'	Par de oligonucleótidos directo y reverso para amplificar <i>Egfp</i> . El oligonucleótido directo tiene 22 pb de empalme con el gen <i>Kat</i> .	745 pb
eGFP <i>Spe</i> Irev	5'- ACTAGT TA CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG -3'		
<i>Bam</i> HI KATdir-cDNA KATeGFPrev	5'- GGATCC ATGGGTGCTTCGTTGTGCTCAACAGCC CTTGACAGAA-3' 5' - GCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT CTCGGCGACCC AGACGGCGGCC- 3'	Par de oligonucleótidos directo y reverso para amplificar el cDNA del gen <i>Kat</i> . El oligo directo lleva un sitio de restricción <i>Bam</i> HI y el oligo reverso contiene en el extremo 5' una secuencia de empalme con el gen <i>Egfp</i> y se eliminó el codón de paro de <i>Kat</i> .	1303 pb
<i>Bam</i> HI KATdir-cDNA eGFP <i>Spe</i> Irev	5'- GGATCC ATGGGTGCTTCGTTGTGCTCAACAGCC CTTGACAGAA3' 5'- ACTAGT TA CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG -3'	Par de oligonucleótidos directo y reverso para amplificar la fusión <i>Kat-Egfp</i> flanqueada por los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Spe</i> I	2004 pb

pNAT <i>Xba</i> I	5'-TAT CTAG AGCGGAGAGACGGA- 3'	Par de oligonucleótidos directo y reverso flanqueados por la secuencia <i>Xba</i> I y <i>Bgl</i> II, en el extremo 5', respectivamente, para amplificar el gen <i>Nat1</i> .	1422 pb
5NAT <i>Bgl</i> II	5' -AT AGATC TTTAGGGGCAGGGCATG- 3'		

2.4 Medios de cultivo

2.4.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Medio Luria Bertani (LB)

Para la preparación de 1 litro de medio LB líquido se agregaron 10 g de peptona biotriptasa (Bioxon) 5 g de extracto de levadura (Bioxon) y 10 g de cloruro de sodio (Karal).

2.4.2 Medio(s) de cultivo para *Agrobacterium tumefaciens*

Medio Yeast Extract-Peptone-Soil (YPS)

Para 1 L se adicionaron 1 g de extracto de levadura (Bioxon), 10 g de peptona de caseína (Bioxon), 5 g de sacarosa (Karal), 0.5 g de sulfato de magnesio (Karal).

2.4.3 Medio(s) de cultivo para *S. cerevisiae*

Medio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD)

Para 1 L se adicionaron 20 g de dextrosa (Bioxon), 20 g de peptona de caseína (Bioxon), 10 g de extracto de levadura (Bioxon).

Medio YNB-Ura BY4741

Para la preparación de 1 L se agregaron 6.7 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (BDDFICO), 20 g de dextrosa (Bioxon), 0.1 g de L-leucina, 0.1 g de L-histidina y 0.1 g de L-metionina (SIGMA).

Medio YNB-Ura BY4742

Para la preparación de 1 L se agregaron 6.7 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (BDDFICO), 20 g de dextrosa (Bioxon), 0.1 g de L-leucina, 0.1 g de L-histidina y 0.1 g de L-lisina (SIGMA).

Medio YNB-Ura Rafinosa 2%

Para la preparación de 1 L se agregaron 6.7 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (BDDFICO), 20 g de rafinosa (SIGMA), 0.1 g de cada aminoácido correspondiente. Se esterilizó el medio a través de un filtro estéril de 0.45 µm de diámetro de poro.

Medio YNB-Ura Galactosa 2%

Para la preparación de 1 L se agregaron 6.7 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (BDDFICO), 20 g de galactosa (Hycel), 0.1 g de cada aminoácido correspondiente.

Para medio sólido se agregaron 20 g de agar bacteriológico (Bioxon) por cada L de medio.

2.4.4 Medio(s) de cultivo para *Metarhizium*

Medio M-100

Para 1 L se agregaron 10 g de dextrosa (Bioxon), 3 g de KNO₃ (Karal), 62.5 mL de solución de sales M-100 y se aforó con agua destilada. Para medio sólido agregar 1.5 % de agar bacteriológico (Bioxon).

Medio Dextrosa-Sabouraud (MDS)

Para 1 L se agregaron 0.5% de peptona de carne, 0.5% de peptona de caseína y 2% de dextrosa.

Medio de Inducción con Acetosiringona (Solución IMAS)

Para 100 mL de medio se adicionaron 40 mL de la solución stock 2.5 mM para medio de inducción, 0.18 g de dextrosa (concentración final 10 mM), 0.5 mL de glicerol ultrapuro (concentración final 0.5%) y se aforó con agua destilada. El medio se esterilizó en autoclave 15 min a 120 lb. Una vez enfriado se añaden 4 mL de la solución stock 1M MES (concentración final 40 mM). Almacenamiento a temperatura ambiente.

Medio de Inducción (IMAS sólido)

Para 100 mL de medio se agregaron 40 mL de la solución stock 2.5 MM para medio de inducción, 0.09 g de glucosa (concentración final 10 mM), 0.5 mL de glicerol (concentración final 0.5%), 1.5% de agar ultrapuro y 94 mL de agua destilada. **La preparación de este medio se realizó el mismo día de la Agro-transformación de *Metarhizium*.**

Medio M-100. Agar suave (0.8%)

Para 1 L se agregaron 10 g de dextrosa (Bioxon), 3 g de KNO_3 (Karal), 62.5 mL de solución de Sales M-100 y se aforaron con agua destilada. Para un medio sólido se agregó 0.8 % de agar bacteriológico (Bioxon).

Los medios se esterilizaron en autoclave por 15 min a 125°C y 120 libras de presión.

2.5 Soluciones

2.5.1 Soluciones de uso general

Tritón X100 0.1 y 0.01%

Para 100 mL se agregó 100 μL (0.1%) y 10 μL (0.01%) de Tritón X-100 (SIGMA) y se llevó a 100 mL con agua destilada.

2.5.2 Soluciones para Agro-transformación de *Metarhizium*

Solución Stock 2.5 MM Sales para Medio de Inducción

Para 1 L se adicionaron 3.625 g de KH_2PO_4 , 5.125 g de K_2HPO_4 , 0.375 g de NaCl , 1.250 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.165 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0062 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1.250 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cada una de las sales se disolvió una a una en placa con agitador magnético marca Labnet. Autoclave 120 lb por 15 min. La solución se almacenó a temperatura ambiente.

Solución de elementos-Traza elementales para la solución de sales M-100

Para 500 mL se agregaron 30 mg de H_3BO_3 , 70 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 200 mg de ZnCl_2 , 20 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y se aforó a 500 ml con agua destilada. Se esterilizó en autoclave 15 min a 120 lb. Almacenamiento a temperatura ambiente.

Solución de Sales M-100

Para 1 L se agregaron 16 g de KH_2PO_4 , 4 g de Na_2SO_4 , 8 g de KCl , 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de CaCl_2 , 8 mL de Solución de elementos Traza Elemental M-100 y se aforó a 1L con agua destilada. Autoclave 15 min a 120 lb. Almacenamiento a temperatura ambiente.

Solución Stock 1M MES

Para la preparación de la solución stock se disolvieron 19.52 g de MES (SIGMA) en 80 mL de agua destilada. Después se ajustó el pH de la solución a 8 con KOH 5 M llevando a un volumen final de 100 mL. Esterilizar la solución por filtración a través de un filtro 0.45 μm estéril. Almacenamiento en

alícuotas de 9 mL a -20 °C. Las sales pueden precipitarse en la solución Stock fría, si esto sucede, poner la alícuota a baño maría a 65 °C seguido de agitación en vortex para disolver las sales.

Solución 0.5 M Acetosiringona (AS)

Para 100 mL se añadió 9.81 g de Acetosiringona a 90 mL de agua estéril. Después se ajustó el pH a 8 con KOH 5M y llevó a un volumen de 100 mL. Se esterilizó por filtración y se guardó en alícuotas de 10 mL en tubos estériles de 15 mL a -20°C. Los tubos se cubrieron con aluminio debido a que AS es sensible a la luz.

2.5.3 Soluciones para transformación de *S. cerevisiae* por acetato de litio (LiAc)

Tris-EDTA (TE) 10X (100 mM)

Para 100 mL se disolvió 1.21 g de Tris base y 0.37 g de EDTA en 90 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.5 con unas gotas de HCl diluido 1:20 y se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada.

Tris-EDTA 1X (10 mM)

Para 1X se realizó una dilución 1:10 de la solución TE 10X con agua destilada estéril.

Acetato de litio (LiAc) 1 M

Para 100 mL se disolvió, en placa con agitador magnético marca Labnet, 10.2 g de acetato de Litio dihidratado (SIGMA-ALDRICH) y 90 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.5 con gotas de ácido acético glacial diluido 1:40 y se llevó a 100 mL con agua destilada.

Acetato de litio 100 mM

Para 100 mM se realizó una dilución 1:10 del LiAc 1 M con agua destilada estéril.

Acetato de litio 100 mM/ TE 0.5 X

Para 100 mL se agregó 10 mL de LiAc 1 M y 5 mL de TE 10X. Se aforó a 100 mL con agua destilada.

Polyethylenglicol (PEG) 3350 50%

Para 50 mL de PEG 3350 50% se añadió 25 g de PEG de peso molecular 3350 y 15 mL de agua MilliQ a un vaso de precipitado. Se disolvió la mezcla en placa con agitador magnético Labnet. Se aforó a 50 mL con agua MilliQ, se esterilizó en un filtro de 0.45 µm estéril y se recolectó lo filtrado en un frasco estéril.

Acetato de litio 100 mM/ PEG-3350 40% / TE 1X

Para 100 mL se agregó 10 mL de LiAc 1 M, 10 mL de TE 10X y 80 mL de PEG-3350 50%.

Todas las soluciones de *S. cerevisiae* se esterilizaron a través de un filtro estéril de 0.45 µm de diámetro de poro y se guardaron a temperatura ambiente.

2.6 Recolección de conidios de *Metarhizium*

La recolección de conidios se llevó a cabo adicionando 15 mL de Tritón 0.1% estéril a la caja de medio M-100 sólido con crecimiento óptimo (5-7 días) y raspando con un asa de vidrio previamente esterilizada hasta despegar los conidios. Se recuperó la suspensión de conidios con una micropipeta de 1000 µL y se transfirió a un tubo Corning estéril con malla sintética en la boca del tubo para retener en ella el micelio que se haya arrastrado. Se repitió el procedimiento hasta clarificar la suspensión de conidios recuperada por raspado de la caja. El tubo se centrifugó en una centrifuga Beckman G5-6R a 6,000 xg por 10 min. El sobrenadante se eliminó por decantación y la pastilla de conidios se lavó con 10 mL de Tritón 0.01%. Para concluir los conidios se centrifugaron bajo las mismas condiciones mencionadas y se resuspendió en 10 mL de Tritón 0.01%. Los conidios se almacenaron a 4 °C.

2.7 Conteo en Cámara Neubauer

El conteo celular se realizó preparando una dilución seriada base 10 al tomar 100 µL de cultivo y colocarlo en un tubo de 1.5 mL con 900 µL de agua destilada estéril y se agitó en vortex. De la dilución 1:10 se tomaron 100 µL y se colocaron en un tubo de 1.5 ml con 900 µL de agua destilada estéril el cual se agitó en vortex para homogenizar la dilución 1:100. Después se colocaron 10 µL de la dilución 1:100 en las dos zonas de conteo de la cámara de Neubauer.

Fórmula de la concentración celular (No. de células/mL)

$$\text{Concentración: } \frac{\text{Número de células totales}}{2} \times 10^2 \times 10,000$$

$$\text{No. Cuadrantes contados} = 2$$

$$\text{Factor de dilución} = 10^2$$

2.8 Métodos moleculares

2.8.1 Método de extracción de DNA plasmídico (Miniprep) de *E. coli* y *A. tumefaciens*

La extracción de DNA plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina como describe Sambrook y Russel (2001). La pastilla de DNA obtenida al final del procedimiento se lavó 3 veces con 1mL de etanol 80 %, se mezcló por inversión y se decantó el sobrenadante. El tubo con la pastilla se dejó

secar a 37 °C de 5-7 min para eliminar los restos acuosos. Una vez seca la pastilla se resuspendió con 10 -20 µL de agua de grado HPLC.

La evaluación del estado del DNA plasmídico se realizó por electroforesis en un gel de agarosa 1% a 90 Volts durante 30 min teñido con SYBERSafe seguido de visualización en el transiluminador.

2.8.2 Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico de la transformante *M. brunneum* Caro19 primero se realizó el crecimiento de micelio el cual consistió en inocular 1×10^7 conidios/mL en 5 mL de medio líquido MDS se incubó a 28°C en agitación a 150 rpm durante 48 horas. Se obtuvo el micelio por medio de filtración por embudo buchner y se guardó a -70°C por 1 día. Se dividió a la mitad el micelio y se colocó en tubos de 1.5 mL. A cada tubo se le agregaron 300 µL de perlas de vidrio tratadas (incubadas en ácido clorhídrico 0.1 N durante toda la noche y esterilizadas). A cada tubo se agregaron 500 µL de NTES y se agitaron en el TissueLyserII Retsch (QIAGEN) a 30,000 oscilaciones/min durante 20 min. Después de la trituración se centrifugó a 4°C en centrifuga modelo 5417R (Eppendorf ®) a 955 xg durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5 mL, se agregaron 200 µL de cloroformo y 200 µL de fenol y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 4°C por 10 min a 20817 xg. Después se recuperó la fase acuosa en un tubo de 1.5 mL y se agregó 1 µL de RNAsa A (PureLink) e incubó 15 min a 37°C. Se agregó 20 µL de NaCl 5M y 400 µL de etanol absoluto frío (4°C) y se mezcló suavemente por inversión. Esta mezcla se centrifugó a 4°C por 10 min a 20817 xg y se decantó. Se realizó 2 lavados con etanol 80 % con centrifugado entre cada lavado. Se realizó un último lavado con etanol 80% y se centrifugó a 4°C por 10 min a 20817 xg y se decantó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 5-7 min y se resuspendió en 20-30 µL de HPLC.

2.8.3 Restricción enzimática

Para cada restricción enzimática se utilizó DNA plasmídico, enzimas de restricción de la marca New England Biolabs y agua HPLC. Se usó una unidad de enzima por µg de DNA a cortar. La reacción se incubó a 37°C por 2 h, a menos que se indique otras condiciones.

2.8.4 Purificación de fragmentos de DNA en gel de agarosa

Se preparó agarosa 1% con TAE 1X nuevo, se preparó el gel y se cargó en el pocillo toda la reacción enzimática y se sometió a electroforesis en TAE 1X nuevo a 60 Volts por 2 h en cámara de electroforesis y peine lavados con agua y jabón, enjuagados con agua destilada y etanol 100%. Posteriormente, el gel se colocó en el transiluminador de luz azul en donde se identificó la banda con el fragmento de interés. Se cortó el fragmento de agarosa que contenía a la banda de DNA de interés con la ayuda de un bisturí y se procedió a purificar el DNA mediante el kit QIA quick Gel Extraction de QIAGEN (QIAGEN, 2015), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.8.5 Ligación de fragmentos con T4 ligasa

Para la ligación de fragmentos se prepararon 4 reacciones: autoligación del vector, y las proporciones vector:inserto 1:1, 1:3 y 1:6.

	Autoligación	1:1	1:3	1:6
Plásmido	X	X	X	X
Fragmento		X	3X	6X
Buffer T4 ligasa*	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Ligasa**	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
HPLC	Llevar a 10 µL	Llevar a 10 µL	Llevar a 10 µL	Llevar a 15 µL

X: depende de la concentración

*2x Rapid Ligation Buffer (Promega)

**T4 DNA ligasa (3 unidades/µL) (Promega)

Las reacciones se incubaron durante 18 horas a 16°C en el Minicycler MJ RESEARCH.

2.8.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de amplificación de fragmentos de DNA a partir de plásmidos, consistió en 1 µL de DNA (10-50 ng), 0.5 µL de cada oligo (aprox. 500 ng), 12.5 µL de JumpStart Taq ReadyMix (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM KCl₃, 3mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP, 0.1 unidad/L de Taq DNA Polimerasa, JumpStart Taq antibody) de SIGMA y 10 µL de agua HPLC. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Bio-Systems).

A continuación, se describe las condiciones y los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de interés.

2.8.6.1 Amplificación de la fusión *Egfp-Pex12*

Para la amplificación de la fusión del gen *Egfp* (codifica para la Proteína Verde Fluorescente mejorada, del inglés Enhanced Green Fluorescent Protein) y el gen *Pex12* (codifica para la proteína de biogénesis peroxisomal 12) se utilizó el plásmido pGG690 como cadena patrón y la reacción en cadena de la polimerasa descrita en la sección 2.8.5 con los oligonucleótidos *Bgl*IIGFPfd y *Spe*IPEX12rev bajo las siguientes condiciones:

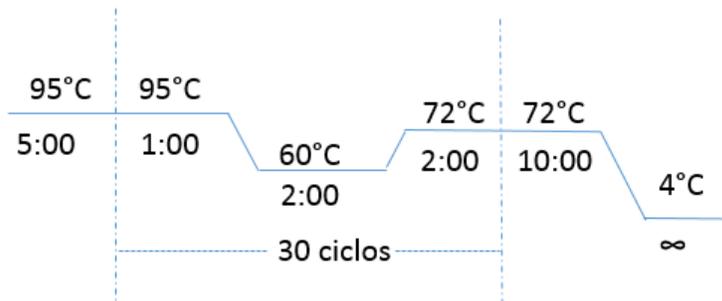


Figura 7. Condiciones de amplificación de la fusión Egfp-Pex12 de *Metarhizium brunneum* CARO19.

2.8.6.2 Amplificación de la fusión *Kat* (cDNA)-*Egfp* (PCR fusión)

Para la fusión por PCR de *Kat-Egfp* se realizaron tres rondas de PCR:

Primera ronda: amplificación de fragmentos a fusionar

Amplificación del cDNA del gen 3-cetoacil-CoA tiolasa (*Kat*)

El cDNA del gen 3-cetoacil-CoA tiolasa (*Kat*) se obtuvo mediante RT-PCR con cadena patrón del cDNA de *M. brunneum* CARO19 obtenido de 72 h post-infección del insecto de prueba *Plutella xylostella*. Para esto, se utilizaron los oligonucleótidos *Bam*HIKATdir-cDNA y KATeGFPprev y los demás reactivos de la sección 2.8.6 bajo las siguientes condiciones:

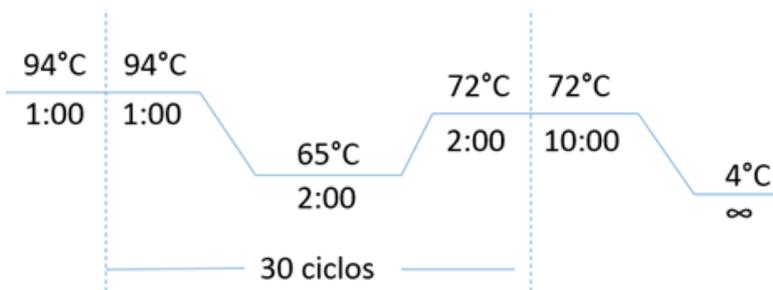


Figura 8. Condiciones de amplificación del cDNA del gen 3-cetoacil-CoA tiolasa (*Kat*) de *M.brunneum* CARO19.

Amplificación del gen enhanced green fluorescent protein (*Egfp*)

El gen *Egfp* se amplificó por PCR a partir del plásmido pPAGICA114 con los oligonucleótidos KATeGFPdir y eGFP_{Spel}rev bajo las siguientes condiciones:

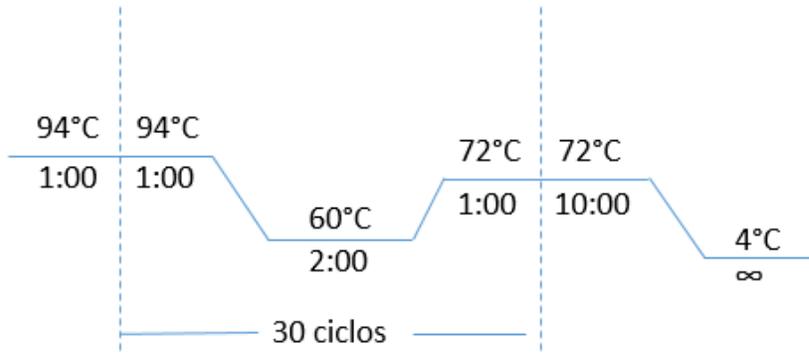


Figura 9. Condiciones de amplificación del gen *Egfp* (Enhanced Green Fluorescent Protein) para la fusión del cDNA del gen *Kat* con el gen *Egfp* de *M. brunneum* CARO19.

Segunda ronda de PCR, fusión de *Kat-Egfp*:

Para la segunda ronda de amplificación se utilizó 1 μ L de amplificación del gen *Kat*, 1 μ L de amplificación del gen *Egfp*, 12.5 μ L de JumpStart Taq ReadyMix y 10.5 μ L de agua HPLC bajo las siguientes condiciones:

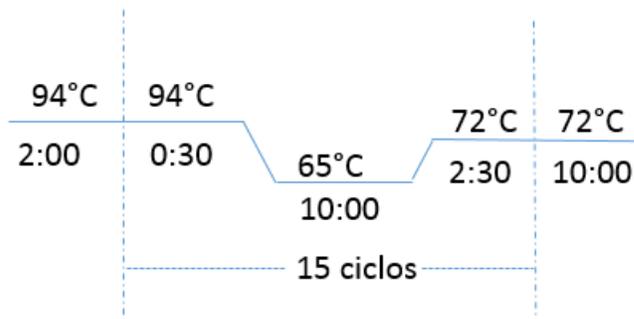


Figura 10. Condiciones de la segunda ronda de la reacción de PCR para la fusión de los amplicones *Kat* de *M. brunneum* CARO19 y *Egfp*.

Tercera ronda de PCR: amplificación de la fusión *Kat-Egfp*:

Para la tercera ronda de PCR se utilizaron 5 μ L del producto de fusión (reacción de la segunda ronda de PCR), 0.5 μ L del oligonucleótido directo *Bam*HIKATdir-cDNA, 0.5 μ L del oligonucleótido reverso eGFP*Spel*rev, 12.5 μ L de JumpStart Taq ReadyMix y 6.5 μ L de agua HPLC bajo las siguientes condiciones:

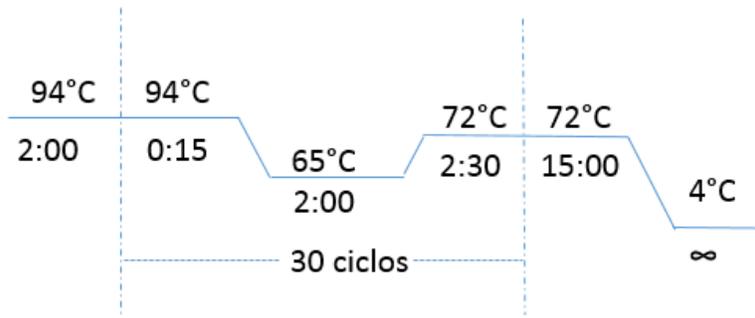


Figura 11. Condiciones de la tercera ronda (amplificación) de la fusión de *Kat* (cDNA)-*Egfp* de *M. brunneum* CARO19.

2.8.6.3 Amplificación de *Kat-Egfp* (comprobación molecular)

Para la comprobación molecular por PCR de la transformación de *M. brunneum* CARO19 con el vector pPAGICA114 se utilizaron 1 μ L de DNA genómico (50-100 ng) de la cepa transformante, 1 μ L del oligo directo *Bam*HIKATdir y 1 μ L del oligo reverso eGFP*Spel*rev, 12.5 μ L de JumpStart y 10.5 μ L de agua HPLC bajo las siguientes condiciones de amplificación:

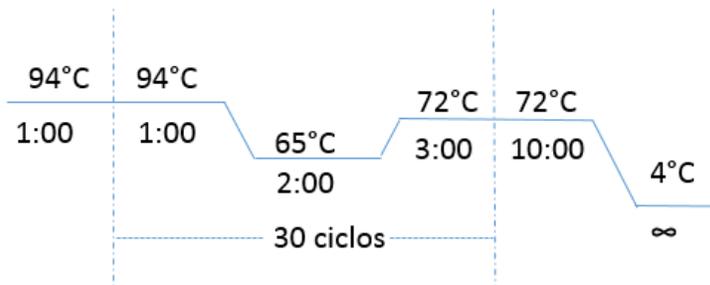


Figura 12. Condiciones de amplificación del fragmento *Kat-Egfp* para la comprobación molecular de la transformación de *M. brunneum* Caro19 con el vector pPAGICA114.

2.8.6.4 Amplificación de *Nat1* (comprobación molecular)

Para la comprobación molecular por PCR del gen *Nat1* de la transformación de *M. brunneum* CARO19 con el vector pPAGICA114 se usó 1 μ L de DNA genómico (50-100 ng) de la cepa transformante, 1 μ L del oligo directo pNAT *Xba*I y 1 μ L del oligo reverso 5NAT*Bgl*II, 12.5 μ L de JumpStart y 10.5 μ L de agua HPLC bajo las siguientes condiciones:

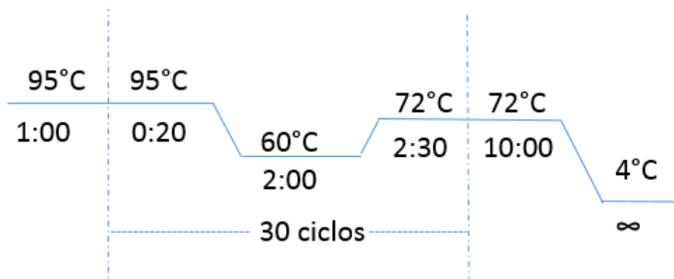


Figura 13. Condiciones de amplificación del gen *Nat1* (codifica para la proteína Nurseotricina acetil transferasa que confiere resistencia al antibiótico nurseotricina) de selección para la comprobación molecular de la transformación de *M. brunneum* Caro19 con el vector pPAGICA114.

2.8.7 Transformaciones

2.8.7.1 Transformación por choque térmico de *E. coli*

Se descongelaron en hielo 50 μ L de células químicamente competentes DH5 α . A las células competentes se incorporó 1 μ L de DNA plasmídico (20 - 100 ng) mezclando suavemente y se colocó 20 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo se llevó la reacción de transformación a 42°C por dos minutos e inmediatamente se puso en hielo durante 2 minutos.

Después del choque térmico se añadió 1 mL de LB líquido sin antibiótico y se mezcló por pipeteo suave. Después, se incubó la mezcla a 37°C en agitación durante 1 h. A continuación se centrifugó a 20817 xg durante 1 min donde formó una pastilla celular y una fase acuosa la cual se removió hasta dejar 100 μ L y se resuspendió por pipeteo la pastilla celular.

Las células transformadas se plaquero en medio LB sólido, con el antibiótico de selección, y se incubaron a 37°C por 16 h.

2.8.7.2 Transformación por choque térmico de *A. tumefaciens*

La transformación de *A. tumefaciens* se realizó descongelando 100 μ L de células químicamente competentes AGL-1 en hielo. Al tubo con las células se le incorporaron 5 μ L de DNA plasmídico (100-1000 ng). Se incubaron por 30 min en hielo, luego se incubaron en nitrógeno líquido por 5 minutos y por último a 37 °C por 5 min.

Después del choque térmico se añadió 1 mL de medio YPS, se colocó la reacción a 28 °C por 3 h en agitación. A continuación, se centrifugó a una temperatura de 4 °C durante 10 min a 6797 xg, se removió el sobrenadante hasta dejar 100 μ L que se resuspendieron por pipeteo hasta resuspender la pastilla bacteriana.

La transformación se plaqueó en medio YPS sólido, con el antibiótico de selección, y se incubó a 28 °C por 2 días.

2.8.7.3 Agro-transformación de *M. brunneum* CARO19

Una colonia recombinante de *A. tumefaciens* que contiene el vector de interés se creció en 5 mL de YPS líquido suplementado con carbenicilina y kanamicina a una concentración final de 50 µg/mL de cada antibiótico en un matraz de 250 mL. Se incubó a 28°C por 16-20 h en agitación. Se extrajeron 1.5 mL que se desechó. A los 3.5 mL restantes se le agregaron los reactivos de inducción: 15.3 mL de solución IMAS, 800 µL de solución 1M MES y 8 µL de 0.5 M Acetosiringona. Se cubrió el matraz con papel aluminio e incubó a 28 °C por 4-6 h en agitación a 200 rpm.

Por otra parte, los conidios de la cepa *M. brunneum* CARO19 se recolectaron y se contaron en cámara de Neubauer, los cuales se resuspendieron a una concentración final de 5×10^5 conidios/mL en Tritón 0.01%. La solución de conidios se centrifugó a 2655 xg por 5 min. El sobrenadante se decantó y a los conidios se le agregó 1 mL de la suspensión de inducción de *Agrobacterium* mezclando suavemente por inversión.

Se tomaron 200 µL de la mezcla conidios- *Agrobacterium* y se esparcieron sobre un papel filtro en una caja de cultivo. La caja de cultivo de crecimiento de colonias transformadas de *Metarhizium* consistió en un sistema de IMAS sólido y encima papel filtro negro estéril colocado de tal manera que quedara adherido al IMAS sólido. La caja de cultivo se incubó a 28°C por 2 días en oscuridad.

Luego de los 2 días de incubación, el papel filtro se transfirió a una caja de M-100 sólido adicionado con cloranfenicol 100 µg/mL y nurseotricina 350 µg/mL. Esta placa se incubó a 28°C por 1 día en incubadora con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. A la placa anterior se le vertió M-100 agar suave sobre el papel filtro y se dejó crecer a 28°C en incubadora con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad durante 5-20 días hasta la aparición de colonias transformantes.

Las colonias transformantes se tomaron con un palillo mojado con tritón 0.1% y se transfirieron a M-100 sólido con cloranfenicol y nurseotricina. Para estas colonias se realizaron 3 pases a nuevo M-100 sólido para proporcionar estabilidad genética y después se continuó con cultivos monoespóricos como se describe a continuación.

Cultivos monoespóricos de *Metarhizium*

Cada colonia transformante se creció en caja de M-100 sólido con cloranfenicol y nurseotricina a 28 °C en incubadora con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad durante 5-10 días. Se recolectaron los conidios transformantes y se prepararon diluciones con una concentración de 1,000 conidios/mL. Se sembraron 50 conidios por espatulado con asa de vidrio en medio M-100 sólido con cloranfenicol y nurseotricina. Las cajas de medio se incubaron a 28 °C en incubadora con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad durante 10 días o hasta la aparición de colonias. Para cada colonia emergente se repitió el procedimiento descrito 2 veces.

2.8.7.4 Transformación de *S. cerevisiae*

Se utilizó el protocolo de transformación genética de *S. cerevisiae* descrito por Sherman (1991) con ciertas modificaciones descritas a continuación. Una colonia fresca no mayor a dos días de edad, de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* se creció en 5 mL de YPD líquido a 28 °C en incubadora marca Vichi INO 650V7 durante toda la noche a 150 rpm. Transcurrido el crecimiento, el cultivo pre-inóculo se contó en una Cámara Neubauer, en una dilución 1:100 en agua destilada estéril, para después inocular 5×10^6 células/mL con 50 mL de YPD líquido atemperado (medio incubado a 28 °C toda la noche) en un matraz de 250 mL. El cultivo se incubó a 28 °C en agitación a 150 r.p.m. hasta que se alcanzó una concentración de 2×10^7 células/mL, se contaron en cámara Neubauer en una dilución 1:100 en agua destilada estéril, durante 3-5 horas.

El cultivo se colectó por centrifugación a 4,000 xg durante 8 min en centrifuga Beckman G5-6R, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL de agua destilada estéril para nuevamente centrifugar por 10 min a 4,000 xg. Se descartó el agua por decantación y se resuspendieron por pipeteo en 500 µL de Acetato de Litio 100 mM/ TE 0.5 X. Se incubó durante 1 hora a 30°C con agitación a 150 r.p.m. A continuación, el DNA de esperma de salmón (DNA acarreador) se incubó durante 10 min a 95°C en termociclador Minicycler MJ RESEARCH e inmediatamente se colocó en hielo. Posterior a la incubación se tomaron 100 µL de células y se agregaron en el siguiente orden:

700 µL de Acetato de Litio 100 mM/ PEG-3350 40%/ TE 1X

4 µL de DNA acarreador de cadena sencilla (1 mg/mL) precalentado 10 min a 95°C e incubado en hielo inmediatamente hasta antes de ser usado.

10 µg de DNA plasmídico

Esta mezcla se mezcló vigorosamente en vortex y se incubó durante 1 hora a 30 °C a 150 r.p.m. Inmediatamente después se incubó en el Multi-blok heater marca LAB-LINE a 42°C durante 15 min. Se centrifugó durante 8 s en microcentrifuga a máxima velocidad, se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla dos veces con 700 µL de agua destilada estéril resuspendiendo por pipeteo suave y se centrifugó en microcentrifuga durante 8 s. Se resuspendió la pastilla con 150 µL con agua destilada estéril por pipeteo suave, se sembró en medio selectivo YNB-Ura y se incubó durante 2-4 días a 28°C.

2.9 Microscopía de fluorescencia

2.9.1 Microscopía de *M. brunneum*

Para la preparación de muestra se inoculó 5 mL de medio líquido MDS y 20 µL de conidios de las cepas de *M. brunneum* por analizar en un matraz de 50 mL. Cada muestra se incubó a 28 °C a 100

rpm durante 12-14 horas. El cultivo se recolectó en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 239 xg por 10 minutos para eliminar los contaminantes del medio. Se decantó el medio y posteriormente se lavaron 2 veces con Tritón 0.01 % centrifugando a 956 xg por 8 minutos. Finalmente, se resuspendió la pastilla en Tritón X-100 al 0.1 %. Se agitó en el vortex durante 2 minutos para deshacer los agrupamientos de micelio y se tomó 10 µL de muestra que se colocaron en portaobjetos nuevo para su visualización en el microscopio.

La microscopía de las colonias transformantes de *M. brunneum* se realizó en un microscopio Nikon OPTIHOT-2 equipado con accesorios de fluorescencia. Las muestras se observaron utilizando los filtros GFP HYQ (LP= 425-475/480/485LP y TRITC HYQ 530-550/565/690-650 (Chroma, Vermont, USA). Las imágenes adquiridas se analizaron con el software SPOT Advanced versión 5.2.

2.9.2 Microscopía de *S. cerevisiae*

Para la microscopía se realizó la inducción del promotor *Gal1* de la siguiente manera: se inoculó una colonia transformante en 3 mL de medio líquido YNB–Ura Rafinosa 2% en un tubo de cultivo y se creció por 12 horas a 28 °C con agitación a 150 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.4-0.5. Se recolectaron las células por centrifugación a 5204 xg por 1 min y se lavaron 2 veces con 1 mL de agua destilada estéril. Las células se inocularon en 5 mL de medio líquido YNB–Ura Galactosa 2 % y se incubaron a 28 °C en agitación a 150 rpm durante 6 horas tomando 10 µL a cada hora y visualizando en microscopio óptico

Las fotos de epifluorescencia se tomaron en microscopio de fluorescencia Nikon OPTIHOT-2 equipado. Las muestras se observaron utilizando los filtros GFP HYQ (LP= 425-475/480/485LP y TRITC HYQ 530-550/565/690-650 (Chroma, Vermont, USA). Las imágenes adquiridas se analizaron con el software SPOT Advanced versión 5.2 se tomaron las imágenes.

Las fotos en campo claro se tomaron en un microscopio óptico Carl Zeiss Primo Star con el objetivo 40X, para lo cual se utilizó la cámara Carl Zeiss AxioCam ERc 5s y el software Axiovision Rel. 4.8.

3. Resultados

El entomopatógeno de género *Metarhizium* tiene factores de patogenicidad como la familia de genes *2np* con ubicación peroxisomal predicha por bioinformática y se demostró la localización peroxisomal de tres de las proteínas 2NP de *Metarhizium*; 2NP3, 2NP4 y 2NP6 en *S. cerevisiae* a través del etiquetamiento con la proteína MCHERRY (Ramírez-Cuellar, 2012; López Macías, 2013).

El objetivo de este trabajo fue analizar en *Metarhizium* el etiquetamiento de posibles peroxisomas empleando el gen *Kat* de *Metarhizium*, etiquetado con la proteína verde fluorescente GFP. Así mismo en *S. cerevisiae* se buscó demostrar la ubicación peroxisomal en *S. cerevisiae* de las proteínas de *Metarhizium* PEX12 y KAT etiquetadas con GFP, mediante comparación con el patrón de distribución observado en la cepa del gen *Pot1* etiquetado con GFP y/o en la cepa de levadura que expresa constitutivamente la fusión GFP-SKL.

LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LAS FUSIONES EGFP-PEX12 Y KAT-GFP EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

3.1. Construcción de la fusión *Egfp-Pex12*

Para la construcción *in silico* se utilizó la secuencia *Pas10/Peroxin-12* de *M. acridium* (Gene Bank MAC_01371) y la secuencia de *Egfp* (GenBank U57607.1), sin el codón de paro. La fusión se realizó con la herramienta SeqBuilder del programa DNASTAR. Además, se añadieron las secuencias de flanqueo de las enzimas *BglII*, inicio de *Egfp*, y *SpeI*, al final de *Pex12*. La longitud final es 2011 pb.

La amplificación por PCR de la fusión génica de *Egfp-Pex12* se realizó a partir del plásmido pGG690. Primero se amplificó el gen *Egfp* utilizando los oligos *BglII*GFPfd y GFP*Pex12*rev (Tabla 3) obteniendo un producto de amplificación de 747 pb. A su vez se amplificó el gen *Pex12* utilizando los oligos GFP*Pex12*fd y *SpeI**Pex12*rev (Tabla 3) obteniendo un producto de amplificación de 1315 pb. Estos dos fragmentos se alinearon por complementariedad de secuencias y se permitió su fusión mediante extensión con la polimerasa. Y finalmente en una tercera ronda se amplificó la fusión utilizando los oligos *BglII*GFPfd y *SpeI**Pex12*rev (Tabla 3) con un tamaño de amplificación de 2011 pb (Fig. 14). Esta fusión fue ligada al vector pGEM-TEasy con un tamaño de construcción total de 5026 pb. El vector fue introducido a *E. coli* DH5 α por choque térmico y se realizó extracción de DNA plasmídico de los transformantes por método de extracción de lisis alcalina. Después se identificó al recombinante por restricción con *Bam*HI y *BglII-SpeI*, generando los fragmentos de 3015 pb correspondiente al vector, y el fragmento de 2011 pb correspondiente a la fusión *Egfp-Pex12* (Fig. 15). La razón por la cual *Egfp* se puso al inicio de la fusión fue debido a que se ha visto que las proteínas con señal peroxisomal PTS1 tienden a degradar el extremo del carboxilo terminal; colocando *Egfp* en el extremo N-terminal donde no es degradado (Kurochkin et al., 2007).

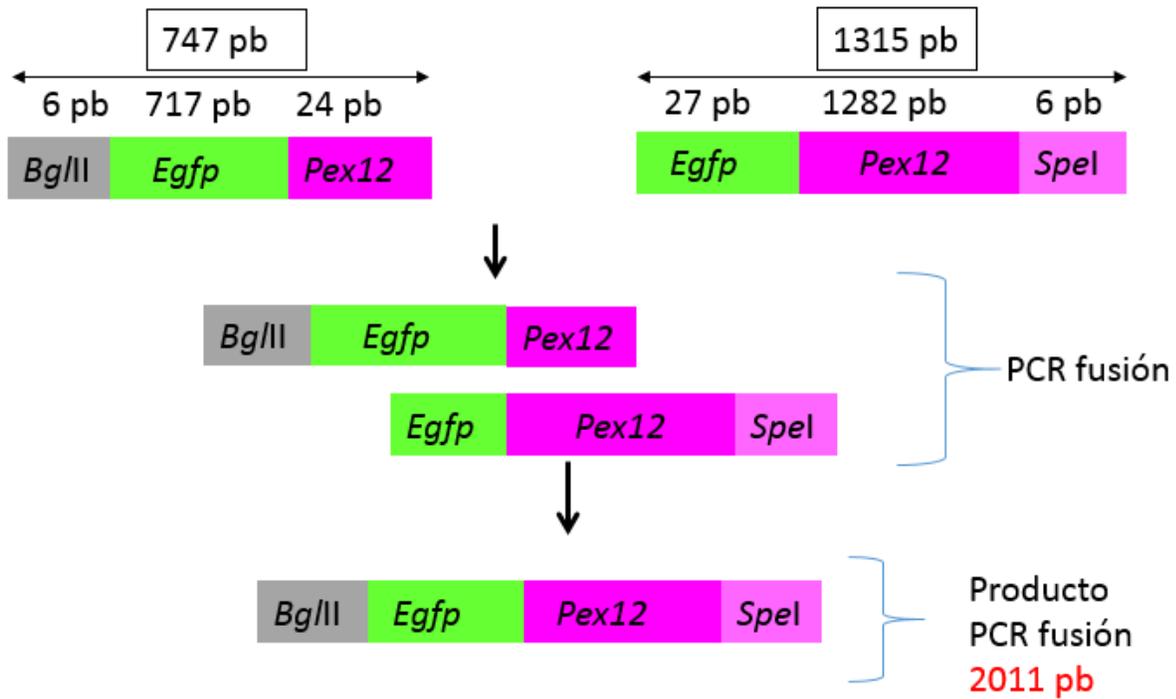
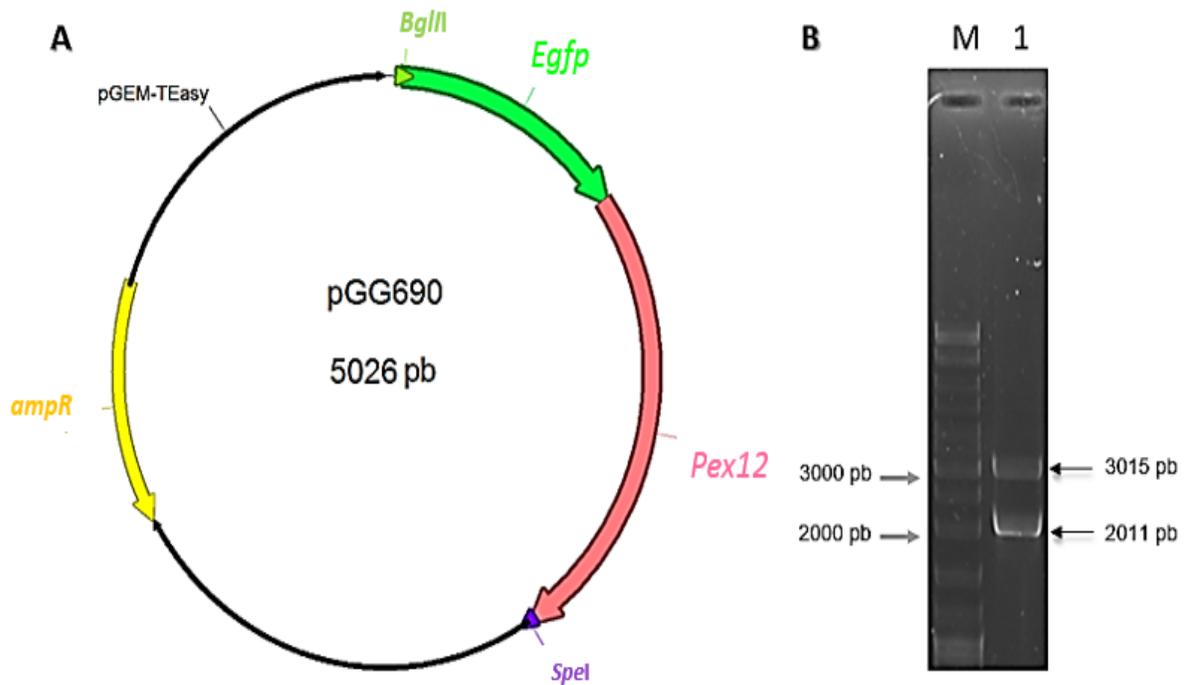


Figura 14. Diagrama de amplificación de *Egfp-Pex12* por la técnica de PCR fusión.



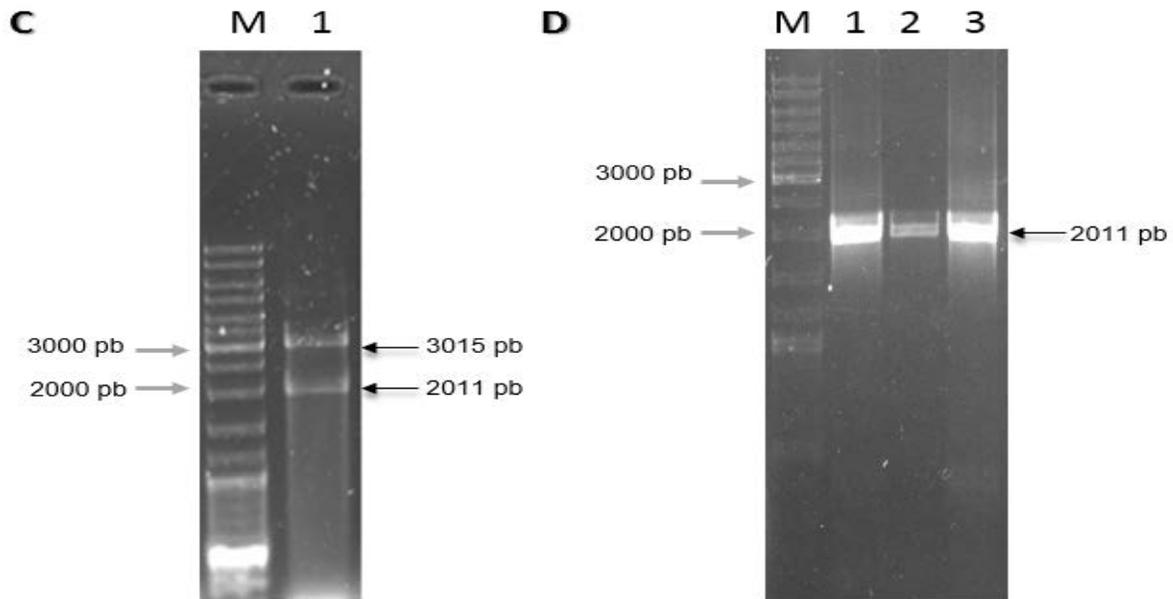


Figura 15. Diagrama de la construcción pGG690 y comprobación por restricción enzimática y PCR. A. Construcción *in silico* pGG690, compuesto por la fusión génica eGFP-Pex12 ligada al vector pGEM-TEasy realizada en el programa ApE versión 2.0.53c. **B.** Comprobación de la construcción pGG690 por análisis de restricción con *Bam*HI generando los fragmentos: pGEM-TEasy de 3015 pb y *Egfp-Pex12* de 2011 pb. **C.** Comprobación de la construcción pGG690 por análisis de restricción con las enzimas *Bgl*II y *Spe*I, secuencias que flanquean el fragmento *Egfp-Pex12*. **D.** Comprobación de pGG690 por PCR con amplificación de *Egfp-Pex12* de 2011 pb. **M.** marcador de peso molecular en pb.

3.2 Clonación de la fusión *Egfp-Pex12* en el vector pYES 2.0 de *S. cerevisiae*

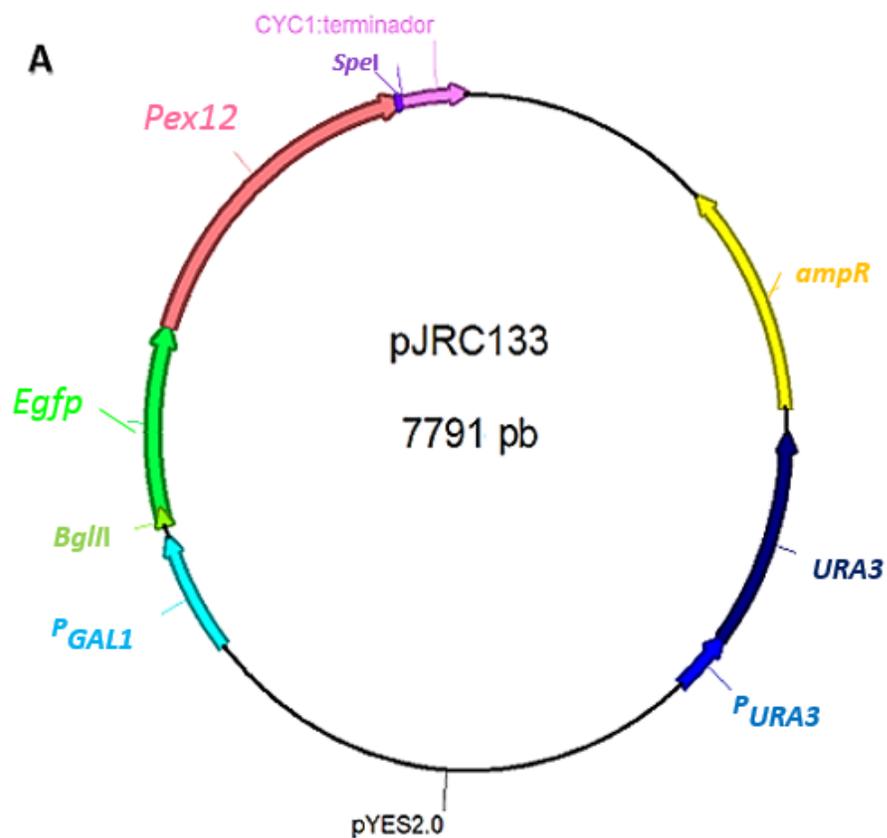
A partir del vector pGG690 se realizó la ligación del fragmento *Egfp-Pex12* al vector de expresión pYES 2.0 (Invitrogen) de *S. cerevisiae*. Primeramente se realizó una serie de digestiones como se describen a continuación: El vector pGG690 se digirió con la enzima *Bgl*II y para pYES 2.0 se realizaron 2 reacciones de digestión, en una reacción se usó la enzima *Bam*HI (pYES I) y otra con la enzima *Xba*I (pYES II). Las digestiones se incubaron a 37° C durante 2 horas. Las enzimas se removieron de las digestiones con fenol-cloroformo y pasos consecutivos mostrados en la sección 2.8.1 de materiales y métodos.

Después se realizaron las digestiones descritas a continuación: el vector pGG690 con la enzima *Spe*I; el vector pYES I se usó *Xba*I y para pYES II se usó *Bam*HI. Las digestiones se incubaron a 37° C durante 2 horas.

En seguida, el volumen total de las digestiones se separó por electroforesis en geles de agarosa y se rescataron y purificaron los fragmentos de DNA de interés por cromatografía de afinidad como se describe en el procedimiento descrito en 2.8.4 en la sección de materiales y métodos. Una vez purificados los fragmentos se verificó el tamaño de los fragmentos mediante electroforesis en gel de

agarosa y se estimó su concentración, y se realizó la ligación de *Egfp-Pex12* al vector pYES 2.0 empleando las proporciones 1:1, 1:3 y 1:6 (vector:fragmento) descrito en 2.8.5 de materiales y métodos.

Las células competentes de *E.coli* se transformaron con las ligaciones, se extrajo DNA plasmídico de 6 colonias transformantes. El plásmido recombinante se identificó y se comprobó por restricción enzimática con *HindIII* y *NcoI*, y mediante PCR con los oligos *BglII*GFPfd y *SpeI*Pex12rev (Fig. 16). La construcción generada se nombró pJRC133.



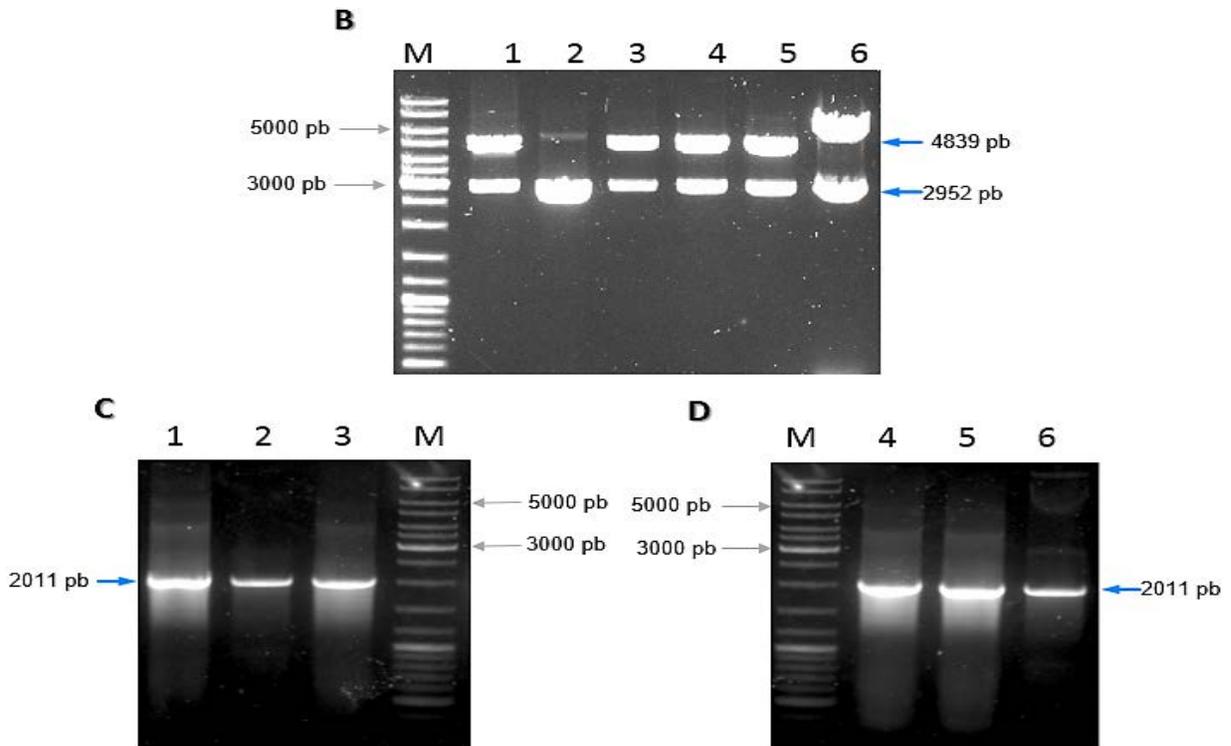


Figura 16. Diagrama de la construcción pJRC133, comprobación por restricción enzimática y PCR. **A.** Construcción pJRC133, compuesta por el fragmento *Egfp-Pex12* ligado al vector pYES2.0 realizada por el programa ApE versión 2.0.53c. **B.** Comprobación de la construcción pJRC133 por análisis de restricción con las enzimas *HindIII* y *NcoI* generando los fragmentos: 4839 pb y 2952 pb, resultados mostrados en los carriles 1-6 correspondientes a las clonas recombinantes. **C** y **D.** Comprobación por PCR de la construcción pJRC133 mediante la amplificación del fragmento eGFP-PEX12 de 2011 pb. **M.** marcador de peso molecular en pb.

3.3. Construcción de la fusión *Kat-Egfp*

La construcción *in silico* se emplearon la secuencia nucleotídica de 3-cetoacil-CoA tiolasa (*Kat*) de *M. brunneum* ARSEF 3297 (número de acceso KID77958.1, NCBI, 2017) y la secuencia de su RNAm (XM_014691627.1.)

En un contexto genómico hay 4 exones y 3 intrones con una longitud de 1513 pb (Fig. 17). El alineamiento del gen y del RNAm se llevó a cabo con el método Clustal V Method en el programa DNASTAR. Las secuencias alineadas se designaron como la secuencia de cDNA con longitud de 1278 pb.

Para la amplificación del cDNA, a la secuencia se le quitaron las 3 últimas bases del codón de paro. En el diseño del oligonucleótido directo *BamHI*KATdir-cDNA se añadió en el extremo 5' del gen la secuencia GGATCC de *BamHI*, y en el extremo 3' se le añadió una secuencia de empalme de 22 pb con el gen *Egfp*.

La fusión quedó *Kat-Egfp* que a diferencia de *Egfp-Pex12*, se ha visto que las proteínas con señal

peroxisomal PTS2 tienden a degradar el extremo N-terminal; colocando EGFP en el extremo C-terminal de KAT donde no es degradado (Kurochkin et al., 2007).

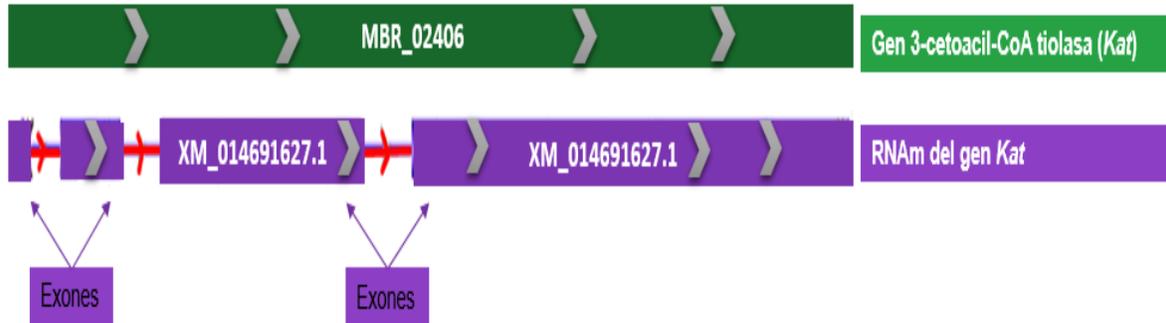


Figura 17. Contexto genómico del gen 3-cetoacil-CoA tiolasa (KAT).

Para la reacción de PCR de fusión *Kat-Egfp*; se realizó la primera ronda de PCR a partir del cDNA de *M. brunneum* obtenido previamente de insectos infectados con *Metarhizium* a las 72 h post-inoculación, con los oligos *Bam*HIKATdir-cDNA y KATeGFPprev (Tabla 3) con un producto de amplificación de 1303 pb y se amplificó el gen *Egfp* a partir del plásmido pGG690 utilizando los oligos KATeGFPdir y eGFP*Spel*rev (Tabla 3) con un tamaño de amplificación de 745 pb (Fig. 18). Estos fragmentos fueron alineados por complementariedad de secuencias realizándose la fusión por extensión de la polimerasa. Y finalmente en una tercera ronda se amplificó la fusión utilizando los oligos *Bam*HIKATdir-cDNA y eGFP*Spel*rev (Tabla 3) generando un producto de amplificación de 2004 pb (Fig. 19).

Esta fusión se ligó al vector pGEM-TEasy para obtener un tamaño de construcción total de 5004 pb. El vector modificado se introdujo a *E.coli* DH5 α por choque térmico a partir de las cuales se extrajo DNA plasmídico por método de lisis alcalina. Posteriormente se confirmó el plásmido recombinante por restricción enzimática con *Eco*RI, generando los fragmentos de 3015 pb, 1500 pb y 500 pb (Fig. 20). La construcción generada se nombró pJRC134 (Tabla 2).

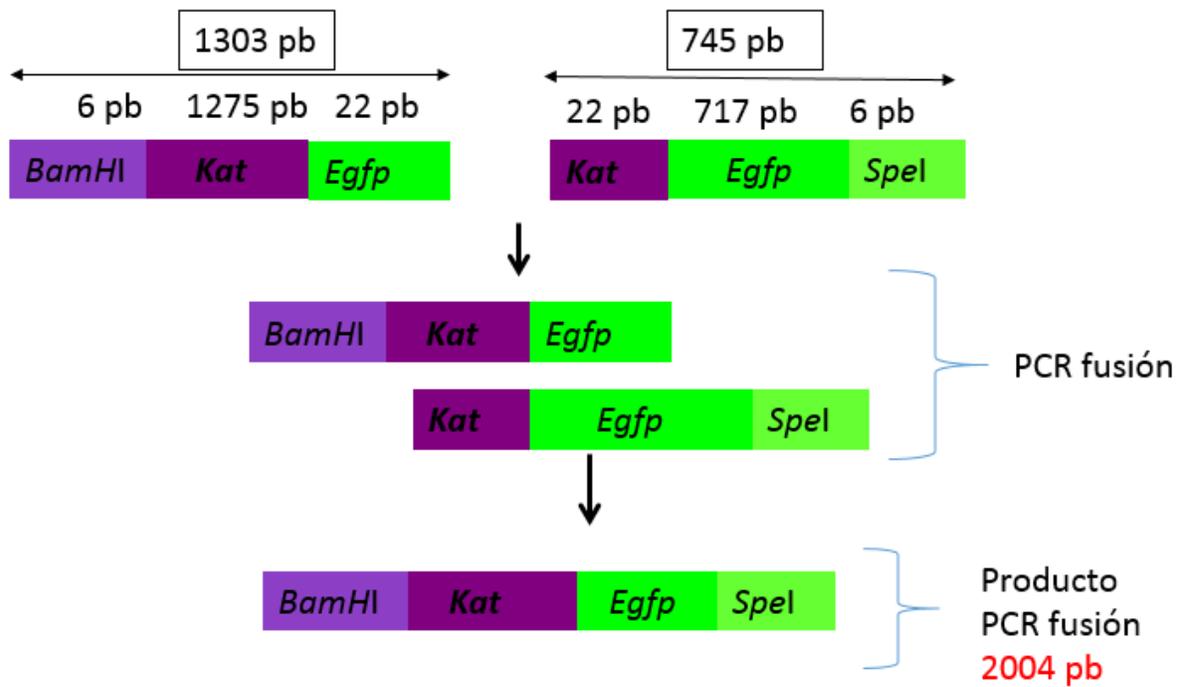


Figura 18. Diagrama de amplificación de *Kat* (cDNA)-*Egfp* por la técnica de PCR fusión.

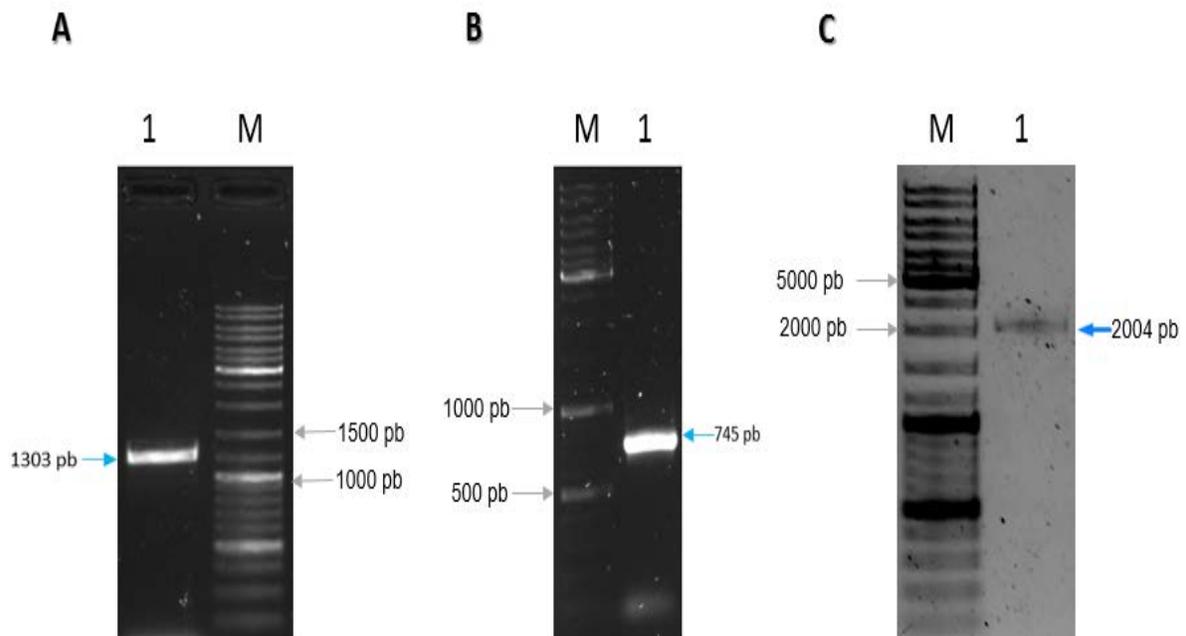


Figura 19. Electroforesis de PCR de la fusión *Kat-Egfp*. **A.** Amplificación del gen *Kat* con los oligonucleótidos *BamHI*KATdir-cDNA y KATeGFPprev tamaño de amplicón 1303 pb. **B.** Amplificación del gen *Egfp* la primera con los oligos KATeGFPdir y eGFP*SpeI*rev tamaño de amplicón 745 pb. **C.** Producto de PCR fusión con tamaño de amplicón 2004 pb. **M.** marcador de peso molecular en pb.

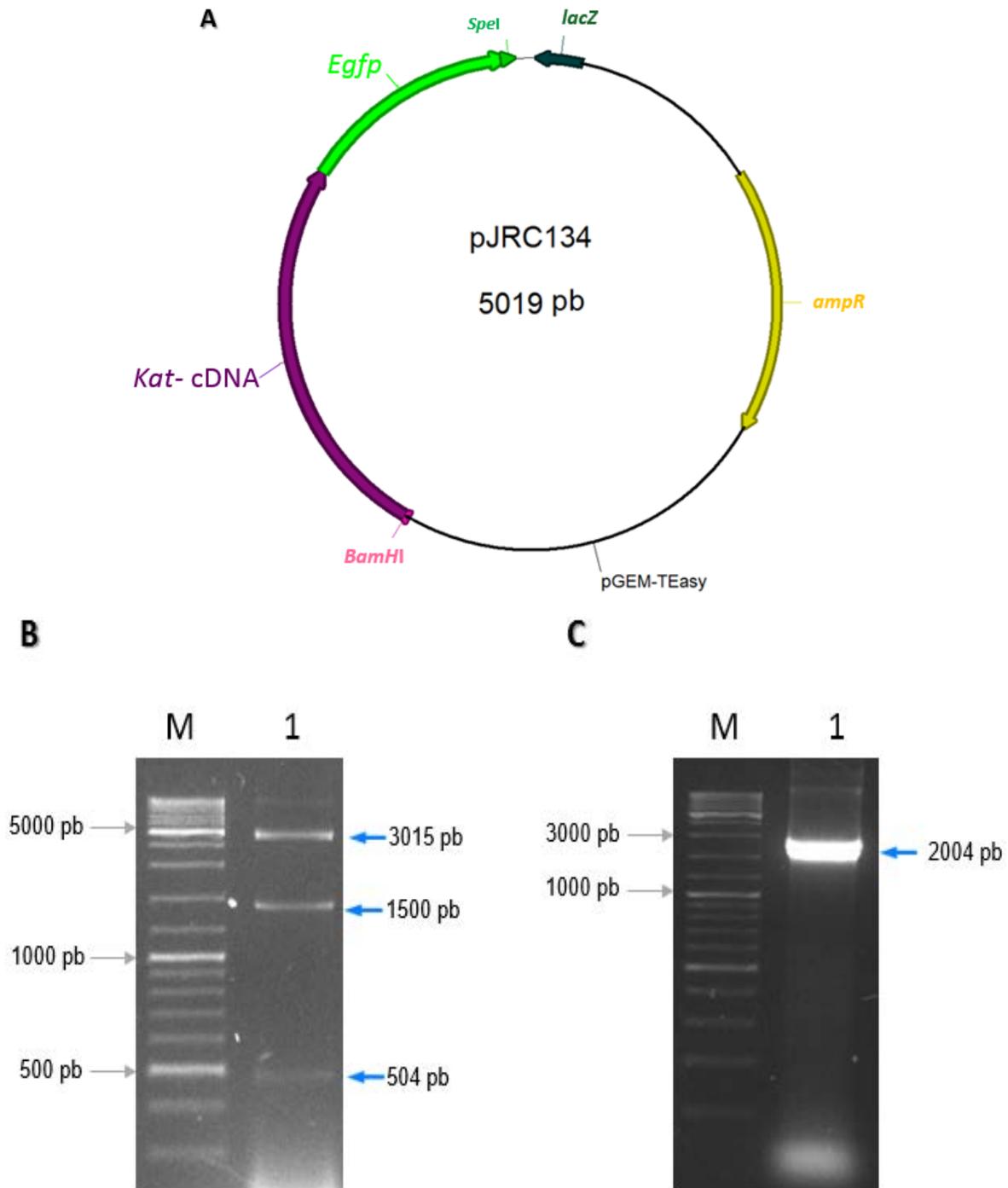


Figura 20. Diagrama de la construcción pJRC134, comprobación por restricción enzimática y PCR. **A.** Construcción *in silico* pJRC134, compuesto por el fragmento *Kat-Egfp* ligado al vector pGEM-TEasy realizada con el programa ApE versión 2.0.53c. **B.** Comprobación de la construcción pJRC134 por análisis de restricción con *EcoRI* generando los fragmentos: 3015 pb, 1500 pb y 500 pb. **C.** Comprobación por PCR de la construcción pJRC134 mediante la amplificando el fragmento *Kat-Egfp* de 2004 pb. **M.** marcador de peso molecular en pb.

3.4 Clonación de la fusión *Kat* (cDNA)-*Egfp* en el vector pYES 2.0 de *S. cerevisiae*

A partir del vector pJRC134 se recuperó la fusión *Kat-Egfp* para ligarla al vector de expresión pYES 2.0 (Invitrogen) de *S. cerevisiae*. Para esto, se digirió el vector pJRC134 con la enzima *Bam*HI y mientras que el vector pYES 2.0 se digirió con dos enzimas de manera independiente: en una reacción se usó la enzima *Bam*HI (pYES I) y en otra la enzima *Xba*I (pYES II). Las digestiones se incubaron a 37°C durante 2 horas. Las enzimas se removieron las digestiones con fenol-cloroformo y pasos consecutivos. Después de la precipitación, los DNAs purificados se digirieron nuevamente como sigue a continuación se describe: el vector pJRC134 con la enzima *Spe*I; para pYES I se usó *Xba*I y para pYES II se usó la enzima *Bam*HI. Las digestiones se incubaron a 37°C durante 2 horas.

En seguida, el volumen total de las digestiones se separó por electroforesis en geles de agarosa y el vector linearizado y la fusión *Kat-Egfp* se rescataron de los geles y se purificaron por cromatografía de afinidad por el procedimiento descrito en 2.8.4. Una vez con los fragmentos de DNA purificados se verificó su tamaño y se estimó su concentración por electroforesis en gel de agarosa. Con esta información se realizó la ligación al vector pYES 2.0 empleando las relaciones vector:inserto; 1:1, 1:3 y 1:6. Las ligaciones se usaron para transformar *E.coli*, y los plásmidos recombinantes se identificaron y comprobaron por análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, y mediante PCR con los oligos *Bam*HIKATdir-cDNA y eGFP*Spe*Irev (Fig. 21). La construcción generada se nombró pJRC135.

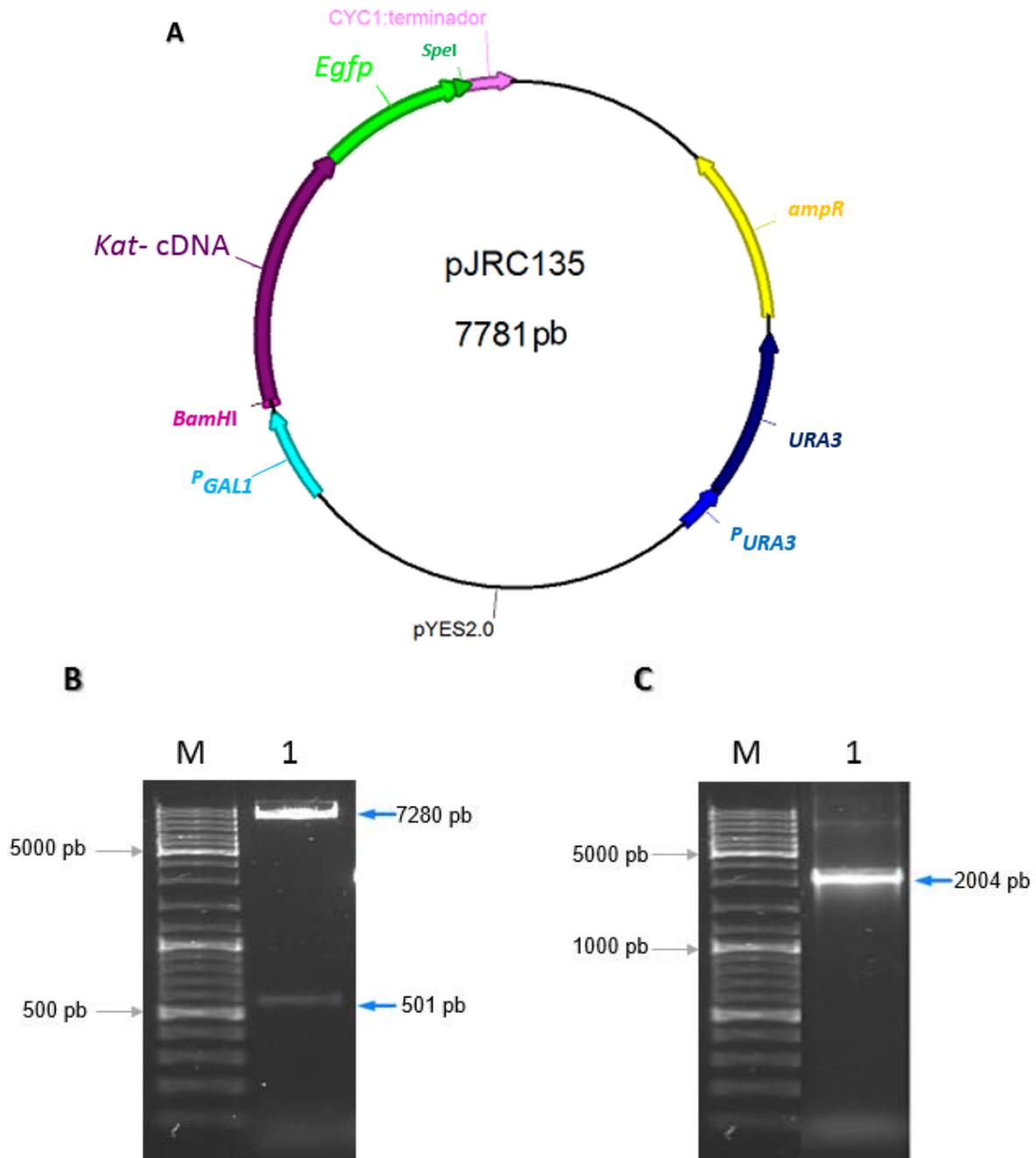


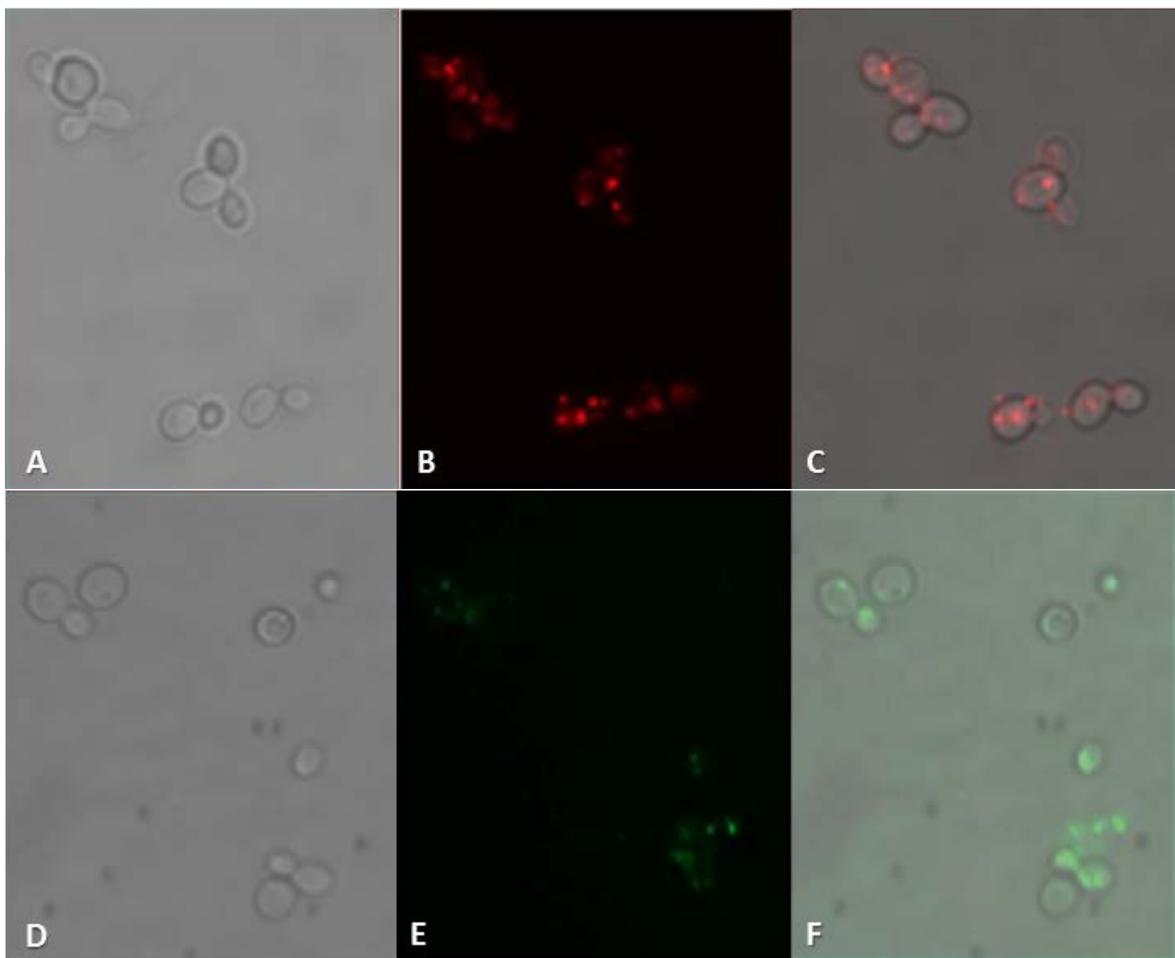
Figura 21. Diagrama de la construcción pJRC135, comprobación por restricción enzimática y PCR. A. Construcción del vector pJRC135, compuesto por el fragmento *Kat* (cDNA)-*Egfp* ligado al vector pYES 2.0, realizada con el programa ApE versión 2.0.53c. **B.** Comprobación de la construcción pJRC135 por análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Tamaño de fragmentos de restricción: 7280 pb y 501 pb. **C.** Comprobación por PCR de la construcción pJRC135 mediante la amplificación del fragmento *Kat* (cDNA)-*Egfp* de 2004 pb. **M.** Marcador de peso molecular en pb.

3.5 Transformación de *S. cerevisiae* con los vectores pJRC133 y pJRC135

S. cerevisiae es un organismo modelo en el cual se conoce tanto la biogénesis como la funcionalidad de los peroxisomas.

Con los plásmidos recombinantes pJRC133 (GFP-PEX12) y pJRC135 (KAT-GFP) se transformó *S. cerevisiae* para expresar los genes peroxisomales *Pex12* y *Kat* previamente fusionados a la etiqueta *Egfp* y encontrar un patrón de distribución de la señal fluorescente típico de peroxisomas en *S. cerevisiae*, lo que ayudará a confirmar la ubicación de estas proteínas en otro modelo como lo es *Saccharomyces* reforzando los resultados que se obtengan en *Metarhizium*.

Los peroxisomas en *S. cerevisiae* han sido ampliamente estudiados utilizando (Erdmann & Gould, 2002) Las siguientes cepas de *S. cerevisiae* previamente transformadas por Ramírez-Cuellar (2012), se utilizaron como control: cepa BY4741 nativa, la cepa BY4742 que expresa la fusión GFP-SKL (Fig. 22 D-F) y la cepa BY4742 que expresa la fusión POT1-GFP (Fig. 22 E-G) y la cepa BY4742 que expresa la fusión 2NP6-MCHERRY (Fig. 22 A-C).



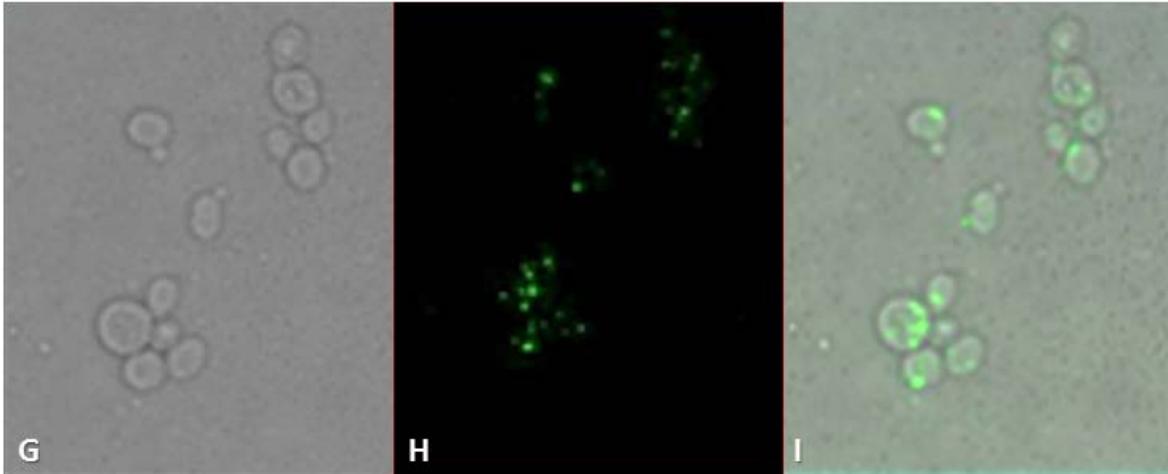


Figura 22. Microscopía de fluorescencia de cepas de *S. cerevisiae* transformadas con distintas construcciones a las 6 horas de inducción de ^PGAL1. A–C. Células de la cepa 2NP6. D–F. Células de la cepa GFP-SKL. G–I. Células de la cepa POT1-GFP. Imágenes tomadas con el programa SPOT Advanced versión 5.2. A, D y G. Campo claro. B. Filtro TRITC HYQ. E y H. Filtro GFP HYQ (LP). C, F y I. Empalme campo claro y fluorescencia.

Las colonias transformantes se seleccionaron por prototrofia a Uracilo. Dichas colonias transformantes se indujeron para que sobreexpresaran el gen modificado clonado en pYES2.0, con el protocolo descrito en 2.9.2 de materiales y métodos.

Para las cepas control la inducción fue exitosa con un mayor índice de fluorescencia a las 6 horas (Fig. 22). No se muestran células transformadas con *Egfp-Pex12* y *Kat-Egfp* debido a que no mostró fluorescencia.

Las observaciones de las células transformantes con *Pex12-Egfp* o *Kat-Egfp* en campo claro mostraron células más pequeñas (ver Fig. 23 D y F). Se tomaron fotos antes y después de la inducción. Antes de la inducción las células madre y las células hija presentaban dimensiones mayores que después de la inducción. Mientras que después de la inducción la célula madre e hija tenían un rango de variación de tamaño menor

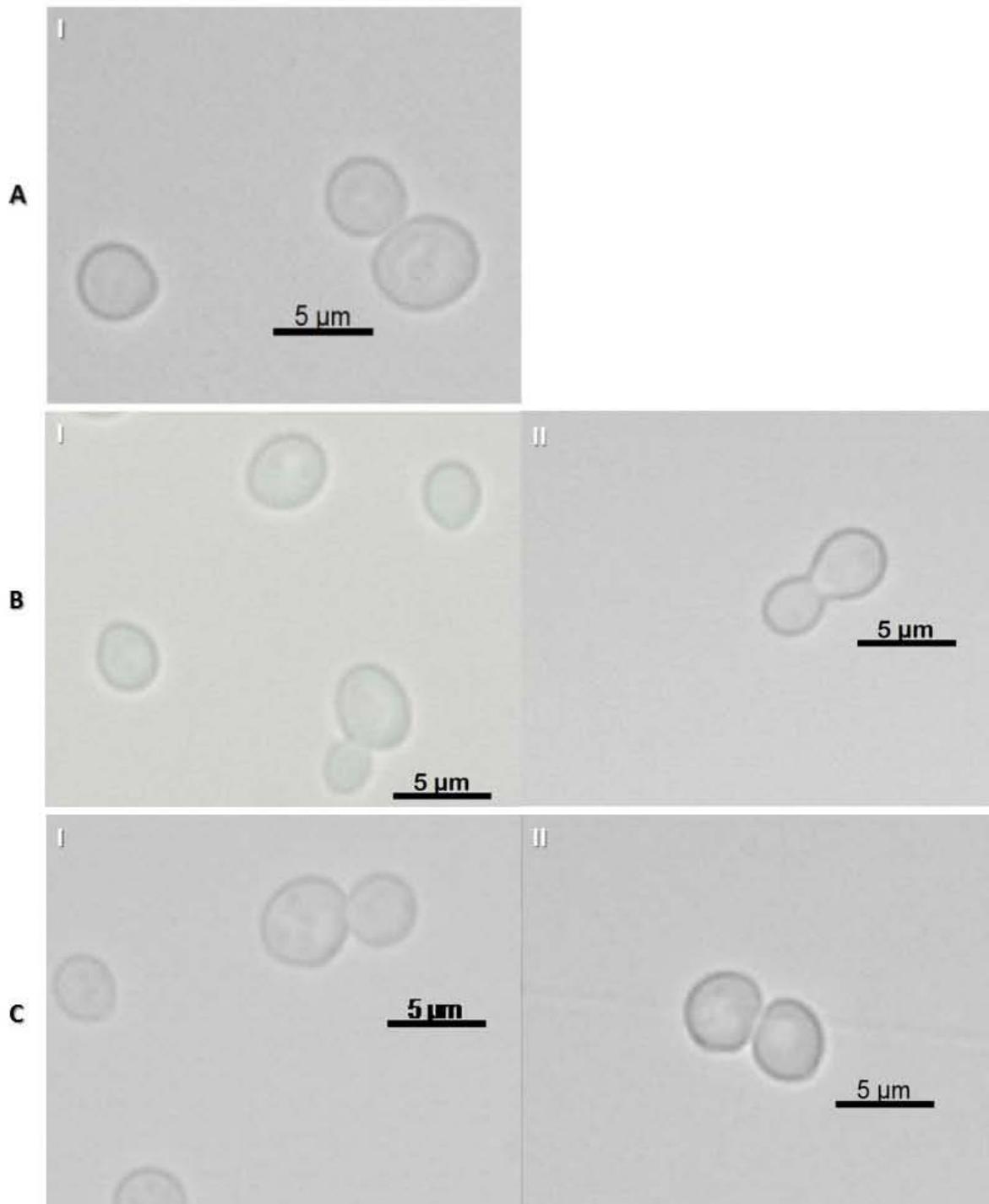
En contraste con las cepas control (BY4741, 2NP6-MCHERRY, GFP-SKL y POT1-GFP), en campo claro mostraban un tamaño similar antes y después de la inducción. Además, que mostraban actividad metabólica activa observable como células en división, células madre con una célula hija (Fig. 23).

Por lo tanto, las fusiones génicas de los genes *Pex12-Egfp* o *Kat-Egfp* de *Metarhizium* al ser inducidas en *Saccharomyces* provocan algún tipo de estrés en las células provocándoles la muerte.

Para demostrar cuantitativamente las observaciones en el cambio de tamaño de las células antes y 6 horas después de inducción del promotor GAL1 (P^{GAL1}) se realizó una gráfica de caja-bigotes para BY4741 (control negativo), POT1-GFP (control positivo) y las cepas de interés GFP-PEX12 y KAT-GFP con el programa Excel 2010. De cada cepa se midieron 50 células por tratamiento (antes y después de la inducción) con excepción de la cepa BY4741 donde sólo se tienen mediciones sin inducir debido a que el medio de inducción carece del aminoácido uracilo, marcador de selección para las células transformantes de pYES2.0. En la gráfica se muestra lo observado en las imágenes, así mismo la distribución de los datos mostró una disminución en el tamaño de la célula después de la inducción (Fig.24). Esta diferencia en tamaño se corrobora al realizar la comparación donde de la cepa POT1-GFP, en la cual sí se obtuvieron células con fluorescencia verde y localización en la membrana peroxisomal.

Después que la gráfica caja-bigotes mostró la dispersión de los datos se buscó un método estadístico que demostrara que había diferencia significativa en los datos. Para esto se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. Primero se estableció como hipótesis nula (H_0) que el promedio de la longitud de las células de *S. cerevisiae* era igual para todos los tratamientos con un 95% de confianza y como hipótesis alternativa (H_1) que en al menos uno de los tratamientos el promedio de la longitud de las células es distinto con un 95% de confianza. Con Excel 2010 se realizó el análisis de datos que generó la tabla de análisis de varianza (Fig. 25A). Donde con la comparación del estadístico $F >$ valor crítico para F mostrando que hay una diferencia significativa (marcado en amarillo). Enseguida lo que se hizo fue ver qué grupo o grupos hacen esta diferencia significativa por lo cual se realizó la prueba de Tukey a partir de la cual se calculó el multiplicador, el cuadrado del error medio (MSE) y el tamaño de la muestra de cada grupo (n) y con estos datos se calculó la Diferencia Honestamente Significativa (HSD) (Fig. 25 B). Por otra parte, se elaboró una tabla con la diferencia de los promedio entre cada grupo. En la tabla se identificaron las celdas con un valor mayor a HSD (celda color rosa), sin importar el signo de la diferencia del promedio. La mayor diferencia (celda color azul) se obtuvo al comparar los controles BY4741 y POT1-GFP con las células transformantes GFP-PEX12 y KAT-GFP después de la inducción (Fig.25 C).

Con la gráfica y la prueba estadística se demostró que el proceso de inducción provocó una reducción en el tamaño de las células de *S. cerevisiae* donde la expresión de PEX12-GFP y KAT-GFP producen un efecto tóxico en el metabolismo de las células transformantes. No se realizó alguna prueba molecular en las transformantes no fluorescentes pero se concluye que son transformantes por crecer en medio con ausencia de Uracilo.



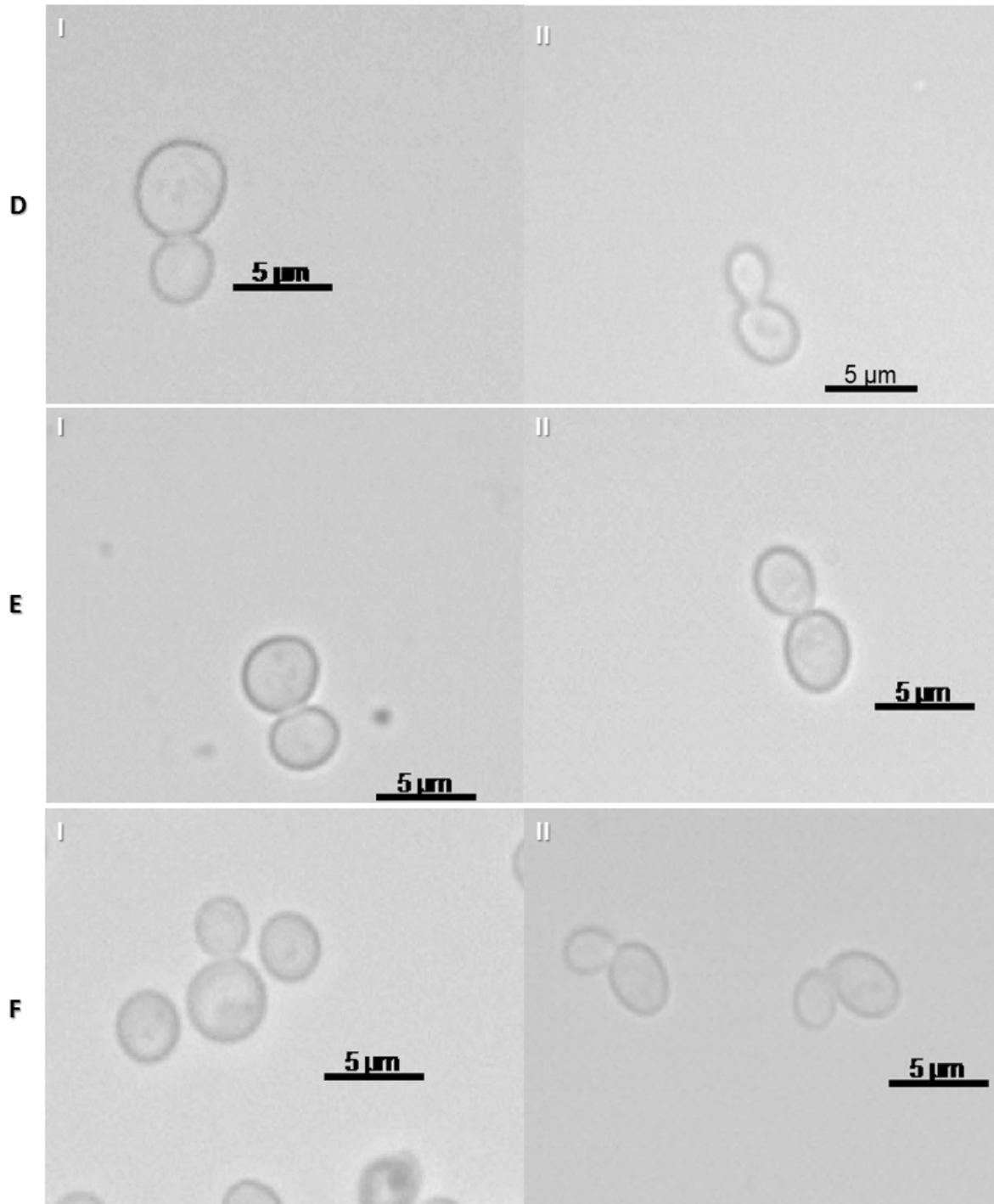


Figura 23. Microscopía de células transformadas de *S. cerevisiae*. A. Células de cepa control sin transformar BY4741. B. Células de cepa control 2NP6-MCHERRY. C. Células de cepa control GFP-SKL. D. Células de cepa transformada con pJRC133 (PEX12-GFP). E. Células de cepa control POT1-GFP F. Células de cepa transformada con el plásmido pJRC135 (KAT-GFP). I. Células antes de la inducción de P^{GAL1} . II. Células después de 6 horas de la inducción de P^{GAL1} . Imágenes tomadas con el programa Axiovision Rel. 4.8.

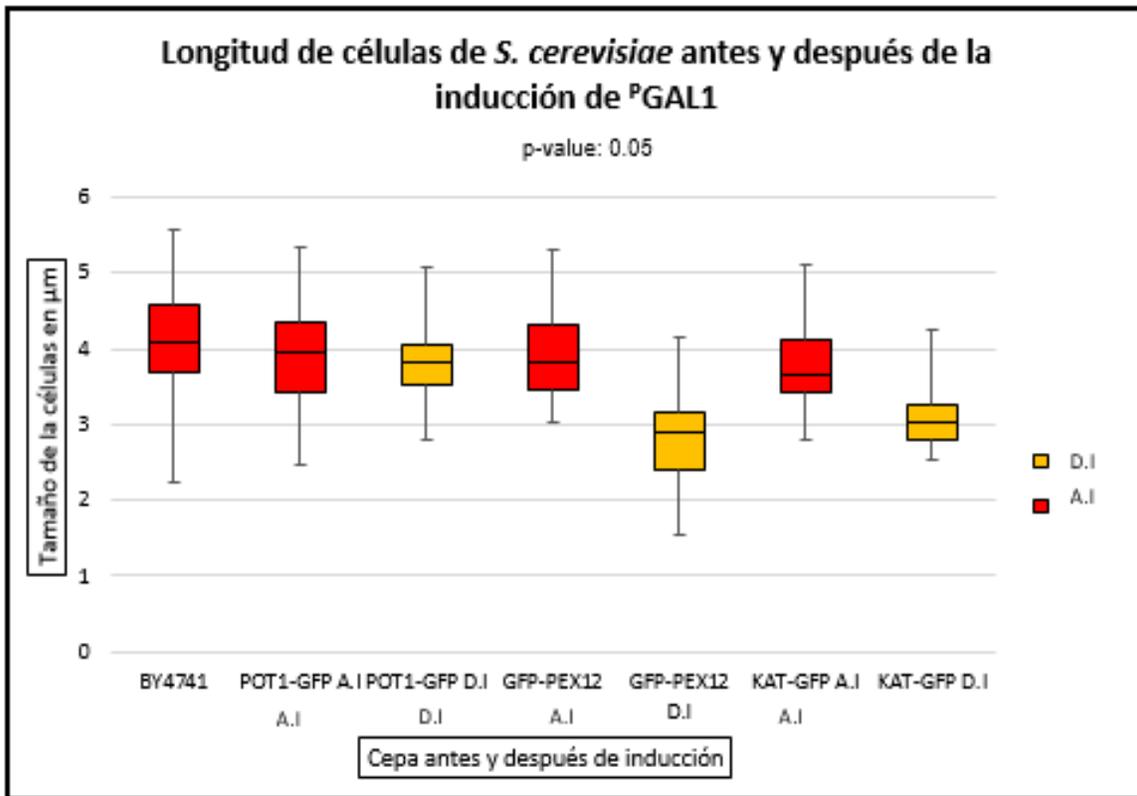


Figura 24. Gráfica caja-bigotes de la longitud de las células de *S. cerevisiae* antes y después de la inducción de ^PGAL1. En rojo se muestran los datos antes de la inducción (A.I) y en amarillo después de la inducción (D.I). BY4741 es el control negativo.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	71.01983081	6	11.83663847	43.07101553	2.70E-39	2.124504742
Dentro de los grupos	96.18587843	350	0.274816796			
Total	167.2057092	356				

PRUEBA DE TUKEY	
Multiplicador	4.17
MSE	0.274816796
n	50
HSD	0.309152447

TABLA DE DIFERENCIAS							
	BY4741	GFP-PEX12 A.I	GFP-PEX12 D.I	KAT-GFP A.I	KAT-GFP D.I	POT1-GFP A.I	POT1-GFP D.I
BY4741		0.234705882	1.297843137	0.375882353	1.045098039	0.20372549	0.311764706
GFP-PEX12 A.I	-0.234705882		1.063137255	0.141176471	0.810392157	-0.030980392	0.077058824
GFP-PEX12 D.I	-1.297843137	-1.063137255		-0.921960784	-0.252745098	-1.094117647	-0.733333333
KAT-GFP A.I	-0.375882353	-0.141176471	0.921960784		0.669215686	-0.172156863	-0.064117647
KAT-GFP D.I	-1.045098039	-0.810392157	0.252745098	-0.669215686		-0.841372549	-0.733333333
POT1-GFP A.I	-0.20372549	0.030980392	1.094117647	0.172156863	0.841372549		0.108039216
POT1-GFP D.I	-0.311764706	-0.077058824	0.986078431	0.064117647	0.733333333	-0.108039216	

Figura 25. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. A. Análisis de datos. B. Prueba de Tukey. C. Tabla de diferencia del promedio entre cada cepa. Datos generados en Excel 2010. Los colores de las celdas en color rosa muestran un valor mayor a HSD, sin importar el signo de la diferencia del promedio. Las celdas en color azul indican los calores con la mayor diferencia obtenida al comparar los controles BY4741 y POT1-GFP con las células transformantes GFP-PEX12 y KAT-GFP después de la inducción.

VISUALIZACIÓN DE PEROXISOMAS EN *METARHIZIUM BRUNNEUM*

3.6 Agrotransformación de *M. brunneum* con el vector pPAGICA114

Para demostrar que la proteína KAT de *Metarhizium brunneum* tiene en su secuencia la señal peroxisomal PTS2, relacionada con la localización peroxisomal, se realizó el alineamiento con las proteínas 3-cetoacil CoA tiolasa de *S. cerevisiae* donde ya está bien estudiada su secuencia y en *Neurospora crassa*, el cual es el organismo modelo de hongos.

Se realizó un alineamiento en el programa Bioedit con ClustalW Multiple Alignment de las secuencias POT1 de *S. cerevisiae* (ID P27796, UniProt), la secuencia para la 3-cetoacil CoA tiolasa del hongo *N. crassa* (ID Q7S6N9, Unitprot) y KAT de *M. brunneum* (ID XP_014547113.1, NCBI). Para las tres secuencias se muestra la secuencia consenso PTS2 (Fig. 26).

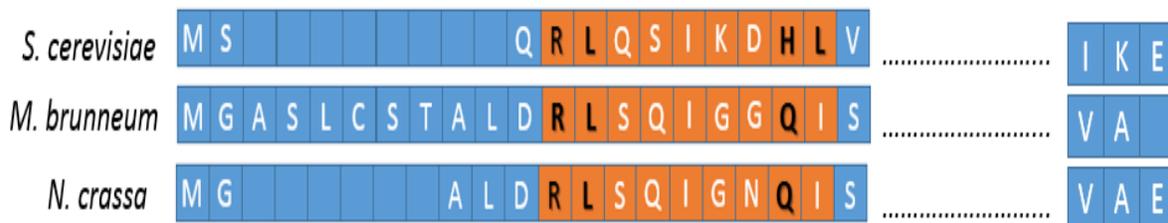


Figura 26. Secuencia de la señal de localización peroxisomal 2 (PTS2) en la secuencia de la proteína 3-cetoacil CoA tiolasa. El alineamiento de las secuencias se realizó con ClustalW en el programa Bioedit. En naranja se muestra la secuencia consenso PTS2.

Como método de transformación se utilizó la agrotransformación la cual a diferencia de otros métodos sirve para hongos recalcitrantes; no se necesita preparar protoplastos; se pueden

transformar distintos tejidos como conidios, protoplastos y micelio vegetativo y fructífero; la habilidad de integrar genes exógenos dentro del genoma de forma estable y un alto número de transformantes con sólo 1 copia de DNA integrada (Kurochkin et al., 2007) .

Para la agrotransformación se seleccionó una colonia de *A. tumefaciens* transformada con el vector pPAGICA114 construido por Cerda-de Loera (2016) y previamente comprobado por PCR con los oligos *BamHI*KATdir y eGFP*SpeI*rev para obtener un producto de amplificación de 2230 pb correspondiente con la fusión genómica *Kat-Gfp* (Fig. 27). El vector pPAGICA114 contiene las siguientes biopartes: los bordes izquierdo (LB) y borde derecho (RB), el promotor PGDA (^PPGDA) que regula al gen *Nat1* de *Streptomyces noursei* que confiere resistencia a nurseotricina, el promotor del gen del factor de elongación 1- α (^PEF-1 α) que regula la expresión de la fusión *Kat-Egfp* y el gen *Kat* (secuencia genómica con exones e intrones y sin codón de paro) fusionado a *Egfp* (Cerda-de Loera, 2016).

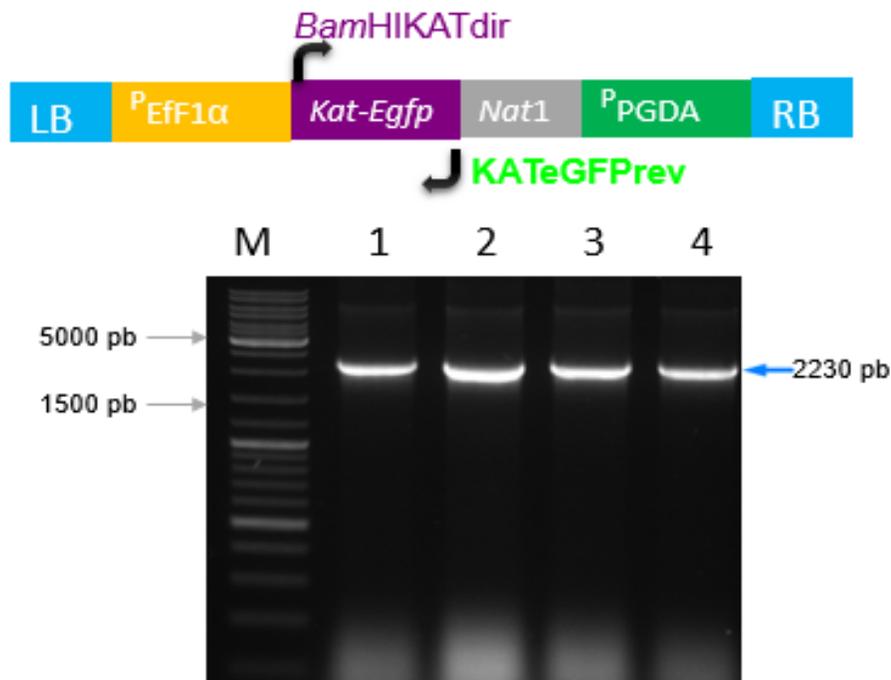


Figura 27. Diagrama de la construcción pPAGICA114 y comprobación por PCR de las colonias transformantes de *A. tumefaciens*. Amplificación de la fusión *Kat-Egfp* con un tamaño de amplificación de 2230 pb en los transformantes de *A. tumefaciens*. **M.** Marcador de peso molecular en pb

Después de la transformación de *M. brunneum* con la colonia transformante *A. tumefaciens* pPAGICA114 se seleccionaron las colonias transformantes en placa por su resistencia a nurseotricina y posteriormente se realizaron 2 pases monoespóricos. En cada pase monoespórico se seleccionaron las colonias de acuerdo al patrón de distribución de peroxisomas mostrado en la

microscopía de fluorescencia después de 4 días de sembrado de las colonias en placa con medio M-100, tiempo en el que mostraron un estado óptimo de crecimiento de las hifas y una fuerte intensidad de EGFP.

A partir de estos transformantes se realizó la extracción de DNA genómico y la amplificación por PCR del gen *Kat* con los oligos *Bam*HIKATdir y KATeGFPprev y del gen *Nat1* con los oligos pNAT XbaI y 5NAT *Bgl*II. En la figura 28 se muestra el patrón de amplificación de los 2 marcadores moleculares *Kat* y *Nat1* (1422 pb) con los tamaños esperados en uno de los transformantes. Este resultado indicó que este transformante de *M. brunneum* lleva en su genoma la construcción KAT-GFP y el marcador de selección *Nat1* (Fig. 28), este transformante se denominó CARO19KAT-eGFP con número de catálogo *M. brunneum* CARO19KAT-eGFP.

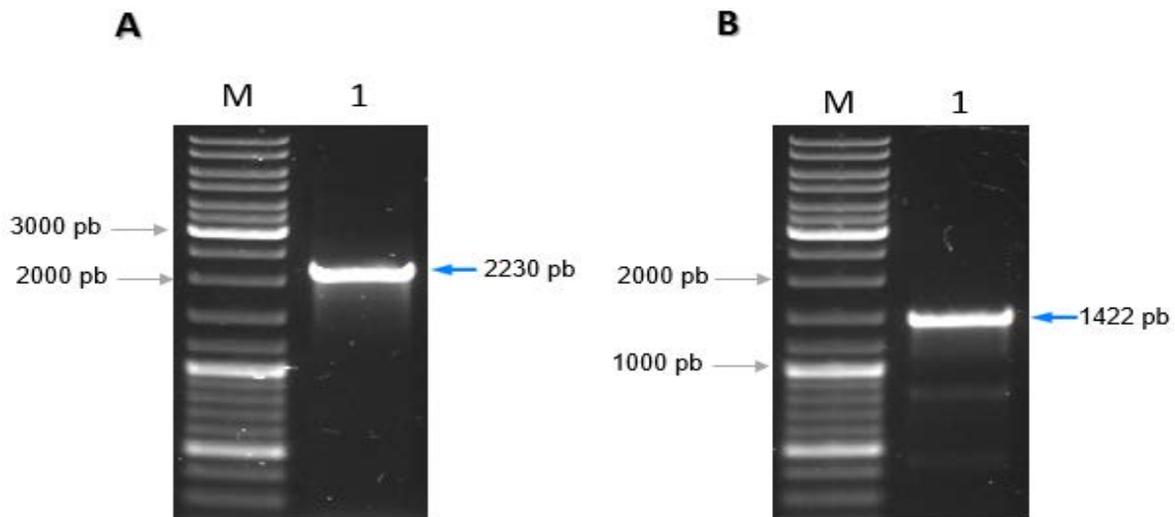
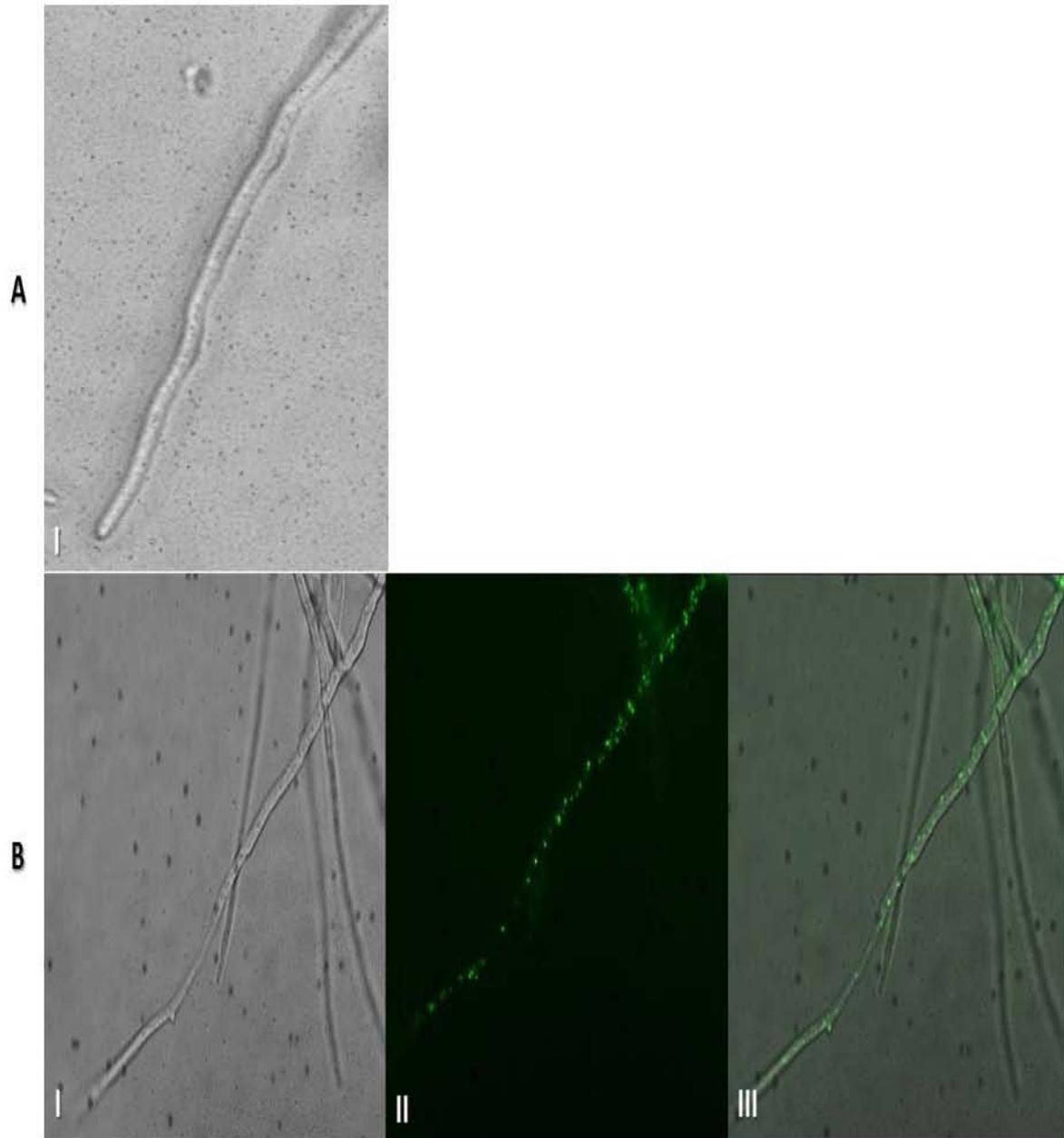


Figura 28. Comprobación molecular por PCR del transformante de *M. brunneum*. A. Amplificación de la fusión *Kat-Egfp*. B. Amplificación del gen *Nat1* que le confiere resistencia a nurseotricina.

Finalmente, el transformante *M. brunneum* CARO19KAT-eGFP obtenido se creció en medio líquido y se observó el patrón de distribución de la fluorescencia a lo largo de la hifa dado por la expresión de la fusión KAT-EGFP. Se usaron como cepas control las cepas de *Metarhizium* que expresan constitutivamente a la proteína rojo fluorescente MCHERRY y la proteína EGFP soluble, las cuales se esperaba se distribuyeran de manera homogénea en el citoplasma. En la figura 29 el transformante KAT-EGFP se aprecia claramente una distribución de la fluorescencia en pequeños “puntos”, lo cual es típico de una distribución peroxisomal (Fig. 29 B) y la cual es totalmente distinta a la observada en los controles de ubicación citoplásmica (EGFP o MCHERRY), la cual en estos

casos se ve distribuida de manera homogénea en el citoplasma, no se definen “puntos” como en el caso de KAT-EGFP (Fig. 29, D-I). En el Laboratorio de Genética Molecular de Hongos no se había observado en microscopio una transformante con fluorescencia de ubicación peroxisomal para *Metarhizium* pero se comparó con los controles que no son de sitio-localización.



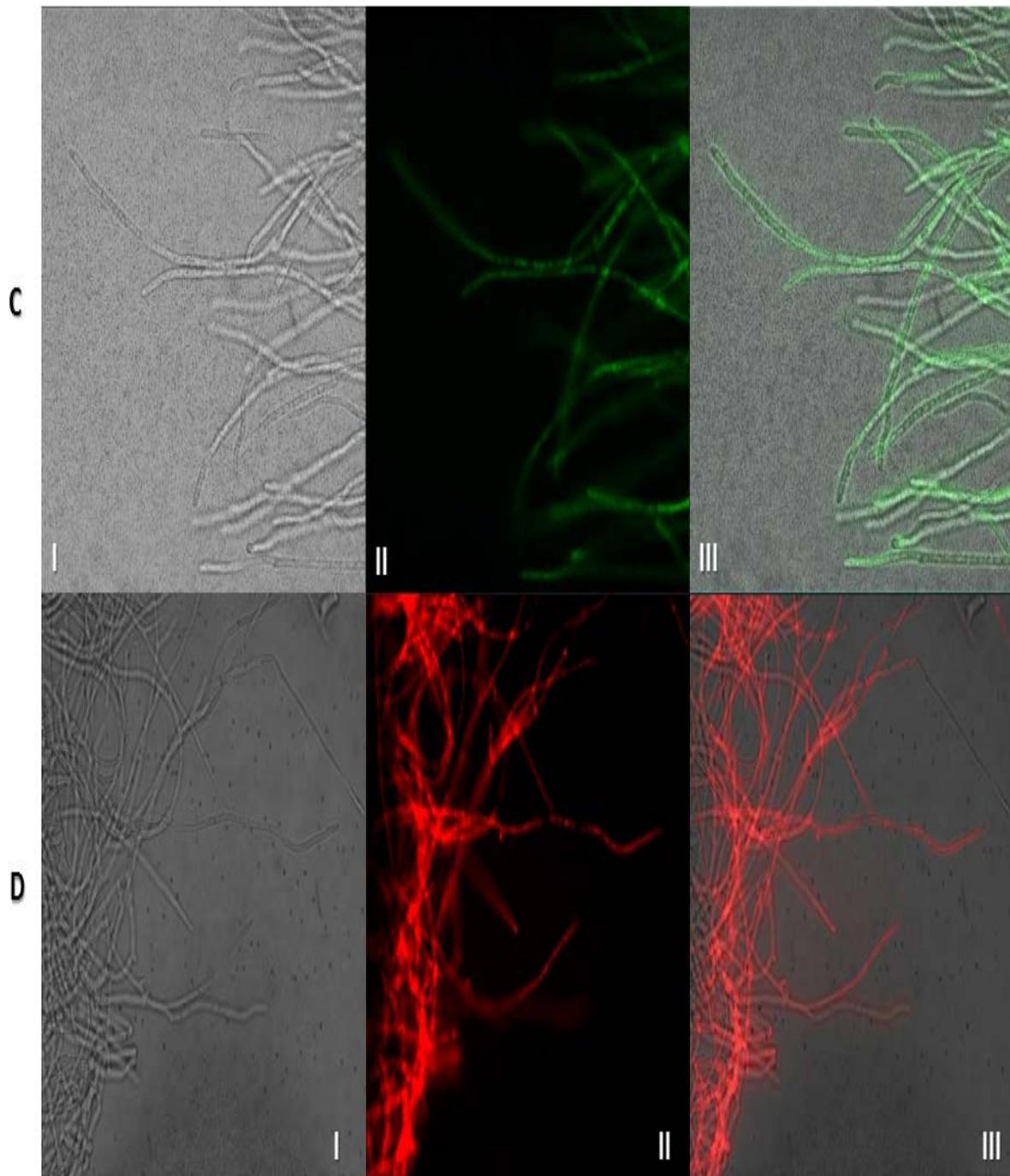


Figura 29. Fluorescencia de hifas de *M. brunneum* etiquetadas con proteínas reporteras. A. Cepa sin transformar. **B.** Transformante que expresa la fusión KAT-EGFP. **C.** Transformante que expresa la proteína EGFP. **D.** Transformante que expresa la proteína MCHERRY **I.** Campo claro; **II.** Fluorescencia. **III.** Empalme campo claro y fluorescencia.

4. Discusión

Los patógenos de insectos que son usados como control biológico para disminuir o eliminar insectos plaga muestran algunas características principales: matan, reducen la reproducción, provocan crecimiento lento o acortan la vida de la plaga; usualmente son específicos de las especies blanco o específicos de ciertas etapas de vida; su efectividad depende de las condiciones ambientales o la abundancia del hospedero; actúan relativamente lento en comparación con un pesticida químico debido a que les toma varios días para adecuar el control de la plaga, no obstante, tienen la ventaja de disminuir la aplicación de insecticidas químicos (Hoffmann & Frodsham, 1993). Como resultado secundario trae el beneficio medioambiental y hasta después de 24 horas se puede ver reducción drástica en la ingesta del cultivo favoreciendo la producción agrícola.

Aproximadamente 1,000 especies de hongos de los filo Microsporidia, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Basidiomycota y Ascomycota son conocidos por matar insectos (Shang et al., 2015). Los insectos, a su vez pueden responder a la actividad patógena del hongo a través del cambio en el comportamiento como por ejemplo el incremento de su temperatura corporal por exposición al sol deteniendo el desarrollo de las blastosporas y facilitando la acción de los hemocitos (Téllez-Jurado, Cruz Ramírez, Mercado Flores, Asaff Torres, & Arana-Cuenca, 2009) o a través de la respuesta inmune en procesos como la síntesis de melanina que suele depositarse sobre los patógenos formando encapsulados, la fagocitosis para eliminar al invasor cuando se encuentra en concentraciones bajas y la nodulación se forma para eliminar al invasor cuando está en cantidades mayores (St Leger and Roberts, 1997).

Con base en el enfoque genómico en el grupo de trabajo del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato se identificó la familia de genes *2np* (Padilla-Guerrero, 2006) y mediante ensayos de expresión heteróloga de dichas proteínas con la proteína rojo fluorescente se demostró la ubicación peroxisomal en *S. cerevisiae* (Ramírez-Cuellar, 2014).

En los transformantes obtenidos de *S. cerevisiae*, con las proteínas PEX12 y KAT, al realizar la inducción del promotor GAL1 con galactosa y su monitoreo a las 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas post-inducción no se observó fluorescencia, pero sí una disminución en el tamaño de la célula hija. La disminución del tamaño de la célula se verificó en la gráfica de caja-bigotes donde la dispersión de los datos para las células sin inducción tenía valores más altos en comparación con las células después de la inducción. Figura Además, que con el método estadístico de análisis de varianza (ANOVA) de un factor se confirmó la diferencia significativa entre las cepas transformantes y las cepas control. Con la prueba de Tukey se identificó que las cepas y condiciones de inducción tienen una diferencia significativa entre las células BY4741 y POT1-GFP con las células transformantes con GFP-PEX12 y KAT-GFP. Los resultados que se esperaban en microscopía es que las células metabólicamente activas, división celular donde los organelos se transportan entre la célula madre y célula hija, los peroxisomas se encontrarían en la periferia de las células y con igual número en las célula madre y

la yema (Fagarasanu et al., 2006). La disminución del tamaño de la célula puede ser debido a que la inducción específica de los genes *Kat* o *Pex12* donde sus proteínas pudieron tener un mal plegamiento y esto represente un estrés muy fuerte, llevando a la célula a la modificación de la velocidad de crecimiento y/o supervivencia de la célula (Folch-Mallol et al., 2004), ya que observamos muerte celular. Además la regulación en cada compartimiento celular puede conducir a la degradación de la proteína (Siddiqui et al., 2012). Otra posible causa es la proteína EGFP puede producir en algunos casos daños citotóxicos que derivan en el daño celular (Ansari et al., 2016) o que en la transformación se hayan conseguido falsos positivos de células de levadura transformadas aunque esto último es menos probable porque células tratadas con el método de transformación por LiAc no crecieron en medio YNB-Ura. Este resultado impidió visualizar la localización de las proteínas híbridas KAT-EGFP y PEX12-EGFP en la levadura *S. cerevisiae*.

Con el plásmido pPAGICA114 se realizó la Agrotransformación de la cepa CARO19 de *M. brunneum*, donde se obtuvo como resultado el transformante denominado *M. brunneum* CARO19 KAT-eGFP comprobado molecularmente y por microscopía de fluorescencia y confocal se logró observar la fluorescencia de EGFP con un patrón de distribución de fluorescencia en forma de “pequeños puntos” típico de los peroxisomas en contraste con la fluorescencia en todo el citoplasma en los controles de las cepas MCHERRY y EGFP. Por lo que podemos concluir que la proteína KAT se ubica en los peroxisomas. Este resultado también nos permitió identificar y observar por primera vez a los peroxisomas de *Metarhizium* puesto que dichas estructuras no habían sido descritas anteriormente en este hongo.

Con el etiquetamiento de los peroxisomas y su visualización a lo largo de la hifa de *Metarhizium brunneum* será posible realizar ensayos de interacción con el insecto blanco para dar seguimiento a la biogénesis y comportamiento de estas vesículas durante el proceso infectivo y su posible participación en la colonización y estimulación del crecimiento de las plantas como sorgo o brócoli, debido a que los peroxisomas de las plantas están involucrados en diversos procesos metabólicos y fisiológicos tales como la β -oxidación de ácidos grasos durante la germinación de las semillas para que los lípidos almacenados sean usados como alimentación; la fotorespiración de las hojas en la cual los poros de los peroxisomas permiten la difusión de pequeños solutos intermedios de la fotorespiración (glicerato) y el ciclo del glioxalato (succinato); el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, de nitrógeno y de sulfuro; la fotomorfogénesis; la biosíntesis de fitohormonas; la senescencia y la defensa contra patógenos y herbívoros (del Río, 2013).

Para los entomopatógenos, tales como las levaduras y los hongos filamentosos son capaces de degradar n-alcanos, las cutículas de insectos representan una fuente de hidrocarburos importantes para el ciclo del carbono (Pedrini et al., 2013). Por consiguiente dado que las enzimas con actividad de 2NP pueden ser capaces de metabolizar hidrocarburos.

El exoesqueleto de los insecto tiene como primera barrera la epicutícula o capa de cera, la cual es una mezcla abundante de lípidos de cadenas cortas, metiladas, saturadas e insaturadas de hidrocarburos. En los insectos los hidrocarburos son sintetizados a partir de los ácidos grasos a través de la ruta de elongación-descarboxilación (Qiu et al., 2012). Los hidrocarburos, principalmente n-alcenos, alcanos y cadenas con ramificaciones de metilación, son lípidos cuticulares con actividad antifúngica y componentes tóxicos para entomopatógenos (Blomquist et al., 1987).

Con los datos anteriores se puede formular una hipótesis que puede ser probada en el laboratorio donde las proteínas 2NP con actividad de nitropropano dioxigenasa localizadas en los peroxisomas podrían degradar los hidrocarburos presentes en la cutícula de los insectos.

Otro aspecto importante de los peroxisomas en el proceso infeccioso, en un estudio morfológico se mostró que los ascomicetos filamentosos contienen estructuras derivadas de los peroxisomas llamados cuerpos de Woronin, tienen función estructural en los poros septales para prevenir la filtración del citoplasma durante un daño a la hifa. En la etapa inicial de infección, los cuerpos de Woronin se requieren para el desarrollo y la función del apresorio. Después de la infección son necesarios para la supervivencia de la hifa fúngica infecciosa durante el crecimiento invasivo y la colonización del hospedero (Pedrini et al., 2013).

Con el etiquetamiento y localización intracelular de los peroxisomas en *Metarhizium* con la fusión KAT-EGFP permitirá una mejor comprensión de la función de los genes *2np*, por lo cual es necesario realizar la transformación de la cepa de *Metarhizium* construida en este trabajo, con los genes *2np* etiquetados con una proteína fluorescente diferente a la EGFP para realizar empalme y determinar co-localización. Además se necesitaría realizar ensayos de interacción *Metarhizium*- insecto-planta para elucidar el papel de los genes *2np* en dicha interacción. Otra perspectiva de este trabajo sería realizar de nuevo la transformación de *S. cerevisiae* con *Egfp-Pex12* y *Kat-Egfp*, pero empleando una cepa diploide y ver si se pueden obtener transformantes más estables y capaces de emitir la fluorescencia con distribución peroxisomal.

5. Conclusiones

Se analizó la expresión de la fusión KAT-GFP en *Metarhizium* y se determinó la localización celular, donde el transformante presenta un patrón punteado y uniforme a lo largo del citoplasma de la hifa, que concuerda con lo observado para peroxisomas en otros hongos.

No se observó emisión de fluorescencia al expresar los genes de *M. brunneum Pex12* o *Kat* fusionados a *Egfp* en *S. cerevisiae*. Sin embargo, se observó una disminución en el tamaño de la célula sugiriendo que las construcciones genéticas generadas en este trabajo ocasionan una alteración del crecimiento posiblemente debido a efectos citotóxicos por la expresión de las fusiones genéticas peroxisomales.

6. Bibliografía

- Albertini, M., Girzalsky, W., Veenhuis, M., & Kunau, W. H. (2001). Pex12p of is a component of a multi-protein complex essential for peroxisomal matrix protein import. *European Journal of Cell Biology*, 80(4), 257–270. doi: <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00164>
- Ansari, A. M., Ahmed, A. K., Matsangos, A. E., Lay, F., Born, L. J., Marti, G., ... Sun, Z. (2016). Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Reviews*, 12(5), 553–559. doi: <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9670-8>
- Aw, K. M. S., & Hue, S. M. (2017). Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. *Journal of Fungi*, 3(2), 30. doi: <https://doi.org/10.3390/jof3020030>
- Bartoszewska, M., Opaliński, Ł., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2011). The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 33(10), 1921–1931. doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0664-y>
- Behie, ., Moreira, C. C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P. M., & Bidochka, M. J. (2017). Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nature Communications*, 8, 14245. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms14245>
- Behie, S. W., Zelisko, P. M., Bidochka, M. J., Cocking, E. C., Galloway, J. N., Schulze, W., ... Fagan, W. F. (2012). Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. *Science*, 336(6088), 1576–1577. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1222289>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2006). *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia*, 98(5), 737–745. doi: <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832645>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512–530. doi: <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438. doi: <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Blomquist, G. J., Nelson, D. R., & De Renobales, M. (1987). Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 6(4), 227–265. doi: <https://doi.org/10.1002/arch.940060404>
- Borges, D., O. Diaz, A., Nelis, S. J. A., & Gómez, E. (2010). *Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 44 (3), 49-55.

- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos* (pp. 6-7). Lima, Perú.: Centro Internacional de la Papa.
- Cerda-de Loera, V. E. (2016). Estudio del gen 2np5 de *Metarhizium* spp (pp. 1-63). Tesis de maestría. Universidad de Guanajuato.
- Daubner, S. C., Gadda, G., Valley, M. P., & Fitzpatrick, P. F. (2002). Cloning of nitroalkane oxidase from *Fusarium oxysporum* identifies a new member of the acyl-CoA dehydrogenase superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 2702–2707. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.052527799>
- del Río, L. A. (Ed.). (2013). *Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism* (Vol. 69, pp. 136-147). Dordrecht: Springer Netherlands. doi: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5>
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2), 134–150. doi: <https://doi.org/10.1017/S0953756299001756>
- Erdmann, R. (1994). The peroxisomal targeting signal of 3-oxoacyl-CoA thiolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 10(7), 935–44. doi: <https://doi.org/10.1002/yea.320100708>
- Erdmann, R., & Gould, S. J. (2002). *Visualization and purification of yeast peroxisomes*. Guthrie, C., & Fink, G. R. *Methods in Enzymology* (Vol. 351, pp. 365-381).doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)51858-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)51858-9)
- Fagarasanu, M., Fagarasanu, A., & Rachubinski, R. A. (2006). Sharing the wealth: Peroxisome inheritance in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. (Vol. 1763, pp. 1669–1677). doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.015>
- FAO. (2001). El estado mundial de la agricultura y la alimentación, 2001 (pp. 35-43). Roma, Italia: Cumbre Mundial sobre la alimentación, Conferencia de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fillmore, N., Abo Alrob, O., & Lopaschuk, G. D. (2011). Fatty Acid beta-Oxidation. doi: <https://doi.org/10.21748/lipidlibrary.39187>
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. (Vol. 46, pp. 24–46).
- Gliessman, S. R. (2002). Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible (pp.191-192)

. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

- Golo, P. S., Gardner, D. R., Grilley, M. M., Takemoto, J. Y., Krasnoff, S. B., Pires, M. S., ... Roberts, D. W. (2014). Production of Destruxins from *Metarhizium* spp. Fungi in Artificial Medium and in Endophytically Colonized Cowpea Plants. *PLoS ONE*, 9(8), e104946. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104946>
- Gonzalez, N. H., Felsner, G., Schramm, F. D., Klingl, A., Maier, U.-G., Bolte, K., ... Distel, B. (2011). A Single Peroxisomal Targeting Signal Mediates Matrix Protein Import in Diatoms. *PLoS ONE*, 6(9), e25316. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025316>
- Guerrero-Carrera, Y. S. (2016). Etiquetamiento de una proteína integral del peroxisoma de *Metarhizium*. *Jóvenes en la ciencia*, 2(1), 571–575.
- Hoffmann, M. P., & Frodsham, A. C. (1993). *Natural enemies of vegetable insect pests* (p. 50). Cornell University: Cornell Cooperative Extension publication.
- Jin, K., Ming, Y., & Xia, Y. X. (2012). MaHog1, a Hog1-type mitogen-activated protein kinase gene, contributes to stress tolerance and virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *Microbiology*, 158(Pt_12), 2987–2996. doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.059469-0>
- Kurochkin, I. V., Mizuno, Y., Konagaya, A., Sakaki, Y., Schönbach, C., & Okazaki, Y. (2007). Novel peroxisomal protease Tysnd1 processes PTS1- and PTS2-containing enzymes involved in beta-oxidation of fatty acids. *The EMBO Journal*, 26(3), 835–45. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601525>
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lazarow, P. B. (2006). Chapter 3.1.7. The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1599–1604. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.011>
- Lazo, G. R., Stein, P. A., & Ludwig, R. A. (1991). A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 9(10), 963–7.
- Lee, J. R., Kim, S. Y., Chae, H. B., Lee, J., Hyun, J., & Yeol, S. (2009). Antifungal activity of *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase. *BMB Reports*, 42(5), 281–285.
- Lee, S. J., Kim, S., Yu, J. S., Kim, J. C., Nai, Y.-S., & Kim, J. S. (2015). Biological control of Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) using *Metarhizium anisopliae* JEF-003

- millet grain. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(2), 217–221. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2015.02.003>
- Leger, R. J., Fank, D. C., Roberts, D. W., & Staples, R. C. (1992). Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry*, 204(3), 991–1001. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16721.x>
- López Macías, P. I. (2013). Aislamiento, estudio de la expresión y localización de integrantes de la familia e genes 2np del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* (pp. 1-75). Tesis de maestría. Universidad de Guanajuato.
- Medina-Garnica, C. I. (2016). Estudio del gen 2 -nitropropano dioxigenasa 1 (2np1) de *Metarhizium brunneum* (pp. 1-98). Tesis de maestría. Universidad de Guanajuato.
- Meinecke, M., Bartsch, P., & Wagner, R. (2016). Peroxisomal protein import pores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(5), 821–827. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2015.10.013>
- Padilla-Guerrero. (2010). Estudio de la participación de genes de expresión diferencial durante el proceso patogénico de *Metarhizium anisopliae* (pp. 1-76). Tesis de doctorado. Universidad de Guanajuato.
- Padilla-Guerrero, I. E. (2006). Análisis de la expresión de genes en el proceso de invasión de *Metarhizium anisopliae* a su hospedero (pp. 1-35). Tesis de maestría. Universidad de Guanajuato.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Zhang, S., & Keyhani, N. O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4, 24. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00024>
- Peraza-Reyes, L., Zickler, D., & Berteaux-Lecellier, V. (2008). The Peroxisome RING-Finger Complex is Required for Meicyte Formation in the Fungus *Podospora anserina*. *Traffic*, 9(11), 1998–2009. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00812.x>
- Platta, H. W., Brinkmeier, R., Reidick, C., Galiani, S., Clausen, M. P., & Eggeling, C. (2016). Regulation of peroxisomal matrix protein import by ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(5), 838–849. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.010>
- QIAGEN. (2015). QIA quick Gel Extraction. Alemania.

- Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E., ... Feyereisen, R. (2012). An insect-specific P450 oxidative decarboxylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 14858–14863. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208650109>
- Ramírez-Cuellar, A. J. (2012). Análisis de la expresión de genes 2np de *Metarhizium anisopliae* ante diferentes factores abióticos y localización intracelular del productos de los genes 2np3 y 2np6 (pp. 1-87). Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato.
- Salceda Sacanelles, R. (2008). Peroxisomas: organelos polifacéticos. *REB. Revista de Educación Bioquímica*, 27(3), 85–92.
- Samuels, R. I., Charnley, A. K., & Reynolds, S. E. (1988). The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia*, 104(1), 51–58. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00437924>
- 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(1), 101–107. doi: <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267–1274. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Shang, Y., Feng, P., & Wang, C. (2015). Fungi That Infect Insects: Altering Host Behavior and Beyond. *PLOS Pathogens*, 11(8), e1005037. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005037>
- Siddiqui, M. S., Thodey, K., Trenchard, I., & Smolke, C. D. (2012). Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Research*, 12(2), 144–170. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00774.x>
- Smith, J. J., & Aitchison, J. D. (2013). Peroxisomes take shape. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 803–817. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm3700>
- Soam Prakash, N. V. (2014). Metabolites of *Metarhizium anisopliae* against Malaria Vectors and Non Target Organisms. *Entomology, Ornithology and Herpetology: Current Research*, 4(2). doi: <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000147>
- St. Leger, R. J., & Wang, C. (2010). Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 901–907. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2306-z>
- St Leger, R. J., & Roberts, D. W. (1997). Engineering improved mycoinsecticides. *Trends in Biotechnology*, 15(3), 83–85. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10071-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10071-8)

- Téllez-Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., & Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*.
- Thomas, M. B., & Read, A. F. (2007). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 377–383. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1638>
- van der Klei, I. J., & Veenhuis, M. (2013). The Versatility of Peroxisome Function in Filamentous Fungi (pp. 135–152). doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5_8
- Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L., & Wang, C. (2012). Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1287–1292. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1115983109>
- Wang, C., & St Leger, R. J. (2007). The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants. *Eukaryotic Cell*, 6(5), 808–816. doi: <https://doi.org/10.1128/EC.00409-06>
- Wang, S., Fang, W., Wang, C., St. Leger, R. J., & Swearingen, W. (2011). Insertion of an Esterase Gene into a Specific Locust Pathogen (*Metarhizium acridum*) Enables It to Infect Caterpillars. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002097. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002097>
- Wassermann, M., Selzer, P., Steidle, J. L. M., & Mackenstedt, U. (2016). Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 768–771. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.010>
- Wolins, N. E., & Donaldson, R. P. (1997). Binding of the peroxisomal targeting sequence SKL is specified by a low-affinity site in castor bean glyoxysomal membranes. A domain next to the SKL binds to a high-affinity site. *Plant Physiology*, 113(3), 943–9.
- Wraight, S. P., Ugine, T. A., Ramos, M. E., & Sanderson, J. P. (2016). Efficacy of spray applications of entomopathogenic fungi against western flower thrips infesting greenhouse impatiens under variable moisture conditions. *Biological Control*, 97, 31–47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.016>