



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA
DE HONGOS FILAMENTOSOS**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Carla Castillo González

Ciudad de México, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Abel Gutiérrez Ramos**

VOCAL: **Profesor: Herminia de Jesús Loza Tavera**

SECRETARIO: **Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra**

2° SUPLENTE: **Profesor: Genaro Jiménez Reyes**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: CONJUNTO “E” DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Lilianha Domínguez Malfavón

SUSTENTANTE:

Carla Castillo González

Agradecimientos técnicos

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

Al apoyo económico brindado por los proyectos DGAPA-PAPIIT-UNAM IN21714 e IN223317 otorgados a Herminia Loza Tavera.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) de la Facultad de Química, UNAM 5000-9117.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por sus enseñanzas y sabios consejos, por darme la oportunidad de formarme profesionalmente en su laboratorio.

A la Dra. Lilianha Domínguez Malfavón por asesorarme, guiarme y enseñarme tantas lecciones tan valiosas.

Al Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM, por permitirme hacer uso de las instalaciones de su laboratorio, por sus sugerencias y correcciones a este trabajo.

Al Dr. Abel Gutiérrez Ramos del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, por sus sugerencias y correcciones a este trabajo

Al Dr. Martín Vargas Suárez por su apoyo y consejos.

Al Dr. Miguel Ángel Gómez Lim del CINVESTAV Unidad Irapuato, por asesorarme en la realización de diversos experimentos.

Al Dr. Achim Loske Mehling del CFATA-UNAM Unidad Juriquilla, por asesorarme y permitirme hacer uso de las instalaciones de su laboratorio.

Agradecimientos personales

A mis padres María Concepción González Barrera y Carlos Castillo Martínez, mis ejemplos de fortaleza, respeto y cariño, por otorgarme la vida, apoyo, paciencia, consejos y una base de la cual sostenerme. Los quiero y gracias por caminar a mi lado.

A mi hermana Monserrat Castillo González por estar conmigo, por comprenderme y apoyarme en todos mis proyectos.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 105 por todos los momentos compartidos, por su apoyo y alegría, así como por su respeto y cariño.

A Earvin Jey Hernández Guzmán por ser un amigo incondicional, por su apoyo, y por todos los momentos compartidos y a todos mis amigos de la Facultad de Química (Martha, Carlitos, Erick, Efrén, Paz, Mizraim y aquellos que llegue a omitir) por toda la diversión y las inolvidables experiencias compartidas.

A todos mis amigos de la preparatoria y secundaria (Axel, Farías, Brenda, Giovanni, Arozqueta, Germán, Manuel, Mariana, Gina, Mike y Tomás) por su valiosa amistad y las gratas experiencias.

A mis profesores por enseñarme y guiarme en mi vocación y formación profesional, en especial a la Dra. Herminia Loza Tavera por apoyarme incondicionalmente.

Abreviaturas

ATMT	Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
g	gramo
g	gravedades
GFP	Proteína verde fluorescente
Gm	Gentamicina
h	horas
HygB	Higromicina B
Kan	Kanamicina
kpb	kilopares de bases
λ	longitud de onda
LB	Medio Luria Bertani
LB T-DNA	Borde izquierdo del T-DNA
M	molar
μg	microgramo
μL	microlitros
M-LB	Medio Luria Bertani
min	minuto
MM-G	Medio mínimo glucosa
MM-I	Medio mínimo adicionado con Impranil® DLN
mM	milimolar
μM	micromolar
ng	nanogramos
nm	nanómetros
PDA	Papa dextrosa agar
pb	pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE-PU	Poliéter poliuretano
PS-PU	Poliéster poliuretano
PU	Poliuretano
PU_s	Poliuretanos
RB T-DNA	Borde derecho del T-DNA
Rif	Rifampicina
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SSI	Solución salina isotónica
TAE	Amortiguador Tris-Ácido acético-EDTA
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico transferido
Tween 80	Polisorbato 90, polioxietilen sorbitano monooleato, monooleato de polietilen sorbitan
U	cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto en condiciones óptimas para dicha enzima
UV	ultravioleta

Contenido

	Página
Abreviaturas	v
Índice	vii
Índice de figuras	x
Índice de tablas	xii
1. Resumen	13
2. Antecedentes	14
2.1 Los poliuretanos	14
2.2 Biodegradación de los poliuretanos	15
2.3 Antecedentes del proyecto	16
2.4 Manipulación genética de hongos filamentosos	19
2.4.1 Marcadores de selección y genes reporteros	20
2.4.2 Electroporación de conidias germinadas	21
2.4.3 Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
2.4.4 Transformación mediada por ondas de choque	24
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares	27
5. Estrategia experimental	28
6. Materiales y Métodos	29
6.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos empleados	29
6.1.1 Cepas de hongos filamentosos	29
6.1.2 Cepas de bacterias	29
6.1.3 Plásmido y oligonucleótidos	29
6.3 Preparación de pBinGFPhp empleando <i>Escherichia coli</i> DH5- α	32

6.4	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de higromicina B en las distintas cepas de hongos	33
6.5	Electroporación de conidias germinadas	33
6.5.1	Protocolo para monitorear el porcentaje de germinación de conidias	33
6.5.2	Protocolo para linearizar pBinGFPhph	33
6.5.3	Electroporación de conidias germinadas	34
6.6	Transformación de conidias mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
6.6.1	Protocolo para hacer competente <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
6.6.2	Protocolo para transformar <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con pBinGFPhph	36
6.6.3	Protocolo para transformar conidias con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
6.7	Transformación empleando ondas de choque	37
6.8	PCR de colonia	39
6.8.1	Bacterias	39
6.8.2	Hongos	39
6.9	Microscopía de fluorescencia y confocal	40
7.	Resultados y discusión	42
7.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de higromicina B	42
7.2	Electroporación de conidias germinadas	43
7.2.1	Monitoreo del porcentaje de germinación de conidias	43
7.2.2	Linearización de pBinGFPhph	44
7.2.3	Electroporación de conidias germinadas	45
7.3	Transformación de mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
7.3.1	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con pBinGFPhph	46
7.3.2	Transformación de conidias con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
7.4	PCR de colonia de los transformantes obtenidos	50
7.5	Detección de la expresión de la EGFP por microscopía de fluorescencia y confocal	52
7.6	Transformación de conidias empleando ondas de choque	55

7.7 Resumen de resultados	56
8. Conclusiones	57
9. Perspectivas	58
10. Referencias	59
11. Anexos	64
11.1 Formulación de medios de cultivo	64
11.2 Soluciones y reactivos	68

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Síntesis de diferentes tipos de poliuretanos.	14
Figura 2. Algunas cepas de hongos filamentosos capaces de emplear Impranil como única fuente de carbono.	16
Figura 3. Cuantificación de la degradación del Impranil® DLN.	17
Figura 4. Zimogramas de la actividad esterasa e “impranilasa”.	18
Figura 5. Espectros de excitación (A) y de emisión (B) de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), la proteína azul fluorescente mejorada (EBFP) y la proteína amarillo fluorescente mejorada (EYFP).	21
Figura 6. Membrana celular antes y después de ser expuesta a un campo eléctrico.	22
Figura 7. Etapas de la infección de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a una célula vegetal.	23
Figura 8. Esquema del colapso de una burbuja de aire inmersa en un fluido causando la formación de microproyectiles de dicho fluido a alta velocidad.	25
Figura 9. Mapa de pBinGFPhph, el vector empleado para los ensayos de transformación de hongos filamentosos.	30
Figura 10. Curvas de germinación de conidias para las cuatro cepas en estudio (<i>A. fumigatus</i> A2.PL.1, <i>C. tenuissimum</i> A2.PP.5, <i>C. tenuissimum</i> A3.I.1 y <i>C. pseudocladosporioides</i> T1.PL.1).	43
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de pBinGFPhph digerido con <i>KpnI</i> .	44
Figura 12. Resultados representativos de los ensayos de electroporación.	45
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de colonia de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV2260 transformado con pBinGFPhph empleando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la EGFP.	46
Figura 14. Colonias de <i>A. fumigatus</i> A2.PL.1 resistentes a HygB	

	(120 µg/mL) obtenidas en los ensayos de transformación de conidias mediante <i>A. tumefaciens</i> GV2260.	47
Figura 15.	Transformantes obtenidos por 200 µL de co-cultivo en función de la cantidad de suspensión de <i>A. tumefaciens</i> (DO _{660nm} de 0.6) agregada.	48
Figura 16.	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la PCR de las colonias transformadas de <i>A. fumigatus</i> A2.PL.1 por ATMT, empleando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la EGFP.	50
Figura 17.	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la PCR de una colonia silvestre de <i>A. fumigatus</i> A2.PL.1, empleando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la EGFP.	50
Figura 18.	Detección de la EGFP en las colonias de <i>A. fumigatus</i> A2.PL.1 transformadas con pBinGFPhph empleando microscopía de fluorescencia.	52
Figura 19.	Detección de la EGFP en las colonias de <i>A. fumigatus</i> A2.PL.1 transformadas con pBinGFPhph empleando microscopía confocal.	53
Figura 20.	Resultados representativos de los ensayos de transformación por ondas de choque.	55

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Genotipos y fuentes de las bacterias empleadas.	30
Tabla 2. Características de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de la EGFP.	31
Tabla 3. Condiciones de capacitancia y voltaje probadas en los ensayos de electroporación de conidias germinadas.	35
Tabla 4. Reactivos y cantidades a emplear para realizar la PCR de colonia empleando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la EGFP.	40
Tabla 5. Pruebas de crecimiento de las cepas en estudio en medio PDA adicionado con HygB a diferentes concentraciones.	42
Tabla 6. Resultados de los métodos de transformación probados.	55

1. Resumen

La acumulación de residuos de poliuretano (PU) representa un serio problema ambiental, pues el aumento en su producción y uso contrasta con el poco desarrollo de los sistemas de eliminación que son complicados, costosos y poco eficientes, por lo que se ha buscado el desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de estos residuos, como la biodegradación. En nuestro grupo de trabajo se lograron aislar e identificar hongos filamentosos con la capacidad de utilizar un barniz de poliéster poliuretano (Impranil® DLN), como única fuente de carbono. Se estudió la capacidad de degradación, así como la actividad degradadora de las cepas sobre dicho polímero. Posteriormente se logró aislar e identificar a la enzima responsable de la actividad degradativa de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1, el hongo con la mayor actividad enzimática específica degradadora de Impranil, y se encontró que dicha enzima es una cutinasa, perteneciente a la familia de las carbohidrato esterasas. En nuestro laboratorio se tiene como objetivo a largo plazo clonar genes que codifiquen enzimas degradadoras de PU, con el fin de mejorar la capacidad degradadora de PU de algunas cepas, para lo cual es necesario desarrollar metodologías que permitan la introducción de DNA a estos microorganismos.

En este trabajo se probaron tres métodos de transformación genética de hongos: electroporación de conidias germinadas, transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y transformación por ondas de choque, en cuatro cepas de hongos capaces de degradar Impranil que se estudian en nuestro laboratorio, *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1, *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5, *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1 y *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1. Se logró establecer un protocolo de transformación genética para *A. fumigatus* A2.PL.1 empleando *A. tumefaciens* GV2260, siendo la condición en donde se obtuvo una mayor cantidad de transformantes aquella en la que se realizó un co-cultivo de 1×10^8 conidias/mL en 500 μ L de medio LB con 300 μ M de acetosiringona, agregando 200 μ L de una suspensión de *A. tumefaciens* con una D.O._{660nm} de 0.6 e incubando 48 h a 50 rpm. No fue posible determinar condiciones de transformación para las cepas de *Cladosporium*.

2. Antecedentes

2.1 Los poliuretanos

Los poliuretanos (PUs) son un grupo de polímeros sintéticos que fueron desarrollados por el Dr. Otto Bayer y colaboradores en 1937 (Meier-Westhues, 2007), estos son producidos a partir de la condensación de polioles y diisocianatos que, tras un complejo mecanismo de reacción, dan lugar a la formación de enlaces uretano (Figura 1A). Debido a la gran variedad de precursores es posible realizar diferentes combinaciones de éstos, obteniendo diferentes tipos de PUs con características físicas y químicas particulares. Dependiendo de la composición química de los polioles ya sea tipo éster o éter se pueden sintetizar dos clases de PUs, poliéster poliuretano (PS-PU) y poliéter poliuretano (PE-PU) (Meier-Westhues, 2007) (Figura 1B).

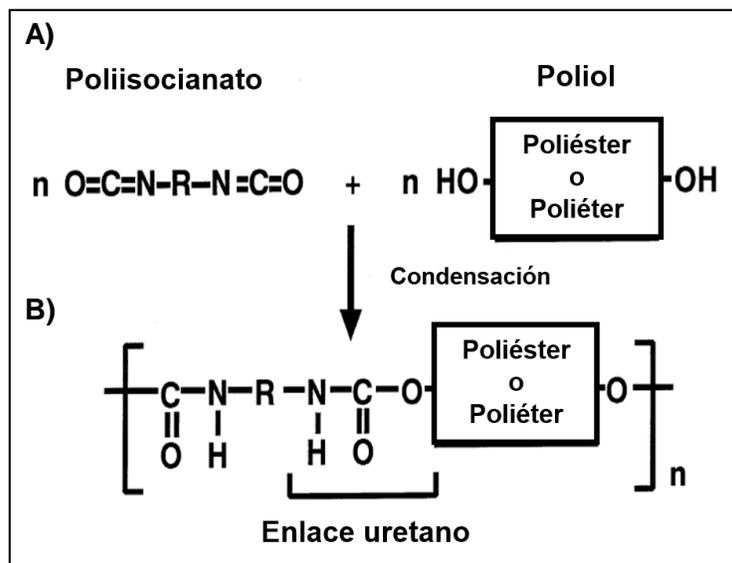


Figura 1. Síntesis de diferentes tipos de PUs. A) Reacción general. B) Clases de PUs dependiendo de la naturaleza química del poliol precursor (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

Actualmente los PUs son ampliamente usados en la industria gracias a la gran versatilidad de propiedades físicas que poseen. De manera general se clasifican como flexibles o rígidos (Chow-Pangtay, 1987). Los PUs flexibles se usan ampliamente en espumas, elastómeros, adhesivos y selladores (Aldabe *et al.*, 1999), mientras que los rígidos se emplean principalmente en aislamiento térmico en edificaciones (paneles sándwich) y a nivel industrial (en cuartos fríos, canalizaciones y calentadores de agua) (Sosa, 1998). La gran versatilidad de sus características y usos ha causado, en los últimos años, un incremento en su fabricación y consumo, generando una grave amenaza para diversos ecosistemas, por los enormes volúmenes de residuos de PU que se generan. Los residuos de PU representan un problema para los sistemas de eliminación, pues los tratamientos físicos y químicos que se emplean actualmente para su reciclaje o destrucción suelen no ser eficientes (Alavi-Nikje *et al.*, 2011), además suelen ser complicados, costosos y se corre el riesgo de generar compuestos iguales o más tóxicos para el medio ambiente (McKenna y Hull, 2016).

2.2 Biodegradación de los poliuretanos

La biodegradación se refiere a cualquier proceso que permita destruir o transformar contaminantes a compuestos menos peligrosos usando bacterias, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos (Ren, 2003). Los PUs, así como muchos otros plásticos, son compuestos recalcitrantes principalmente debido a su composición química, por esto mismo por mucho tiempo se consideró que no eran susceptibles a la biodegradación, sin embargo, actualmente hay reportes en la literatura en donde se han identificado microorganismos que tienen la capacidad de degradar ciertos tipos de PUs, desde bacterias como *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa* (Kay *et al.*, 1991), *Comamonas acidovorans* (Nakajima-Kambe, 1995), *Bacillus subtilis* (Rowe y Howard, 2002) y *Alicyclophilus* sp. (Oceguera *et al.*, 2007) hasta hongos (Darby y Kaplan, 1968) como *Curvularia senegalensis* (Crabbe *et al.*, 1994) y *Alternaria solani* (Ibrahim *et al.*, 2011).

2.3 Antecedentes del proyecto

En nuestro grupo de trabajo se aislaron e identificaron cepas de hongos filamentosos con la capacidad de utilizar un barniz de PU (Impranil®) como única fuente de carbono, dichas cepas fueron obtenidas de diversas fuentes ambientales como aire, tierra de jardín, así como de espumas de PU en descomposición, colectadas en un basurero. Para poder llevar a cabo este escrutinio, muestras de diferentes ambientes se inocularon en un medio mínimo mineral con sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno (Russell *et al.*, 2011), adicionado con diferentes barnices de PU, como el Impranil® DLN, un PS-PU y PolyLack®, un PE-PU (Álvarez-Barragán, 2013). En el escrutinio empleando medio mínimo adicionado con Impranil® DLN (MM-I) se obtuvieron 37 cepas de hongos filamentosos capaces de crecer en este medio, observándose que 31 de estas fueron capaces de formar un halo de aclaramiento del Impranil alrededor de la zona donde crecían (Álvarez-Barragán, 2013), el cual está relacionado con la degradación de Impranil® DLN, pues se sabe que este polímero se clarifica al ser degradado (Howard, 2002) (Figura 2A).

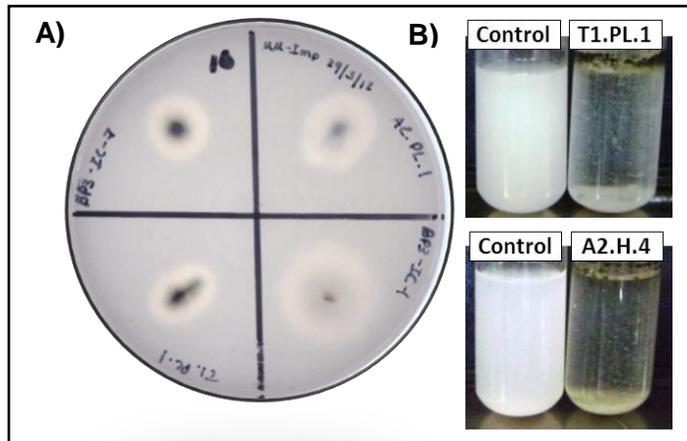


Figura 2. Algunas cepas de hongos filamentosos capaces de emplear Impranil como única fuente de carbono. A) Crecimiento de hongos filamentosos en MM-I sólido en donde se observan halos de aclaramiento. **B)** Comparación del crecimiento de hongos filamentosos en MM-I líquido respecto al control sin inocular donde se observa el aclaramiento del medio por acción del hongo (Álvarez-Barragán, 2013).

Dado que el Impranil® DLN se clarifica al ser degradado se empleó el MM-I líquido para cuantificar la capacidad de degradación de 15 cepas seleccionadas, donde se monitoreo el aclaramiento por turbidimetría (Figura 2B) y se determinaron los porcentajes de degradación del Impranil® DLN para cada cepa (Figura 3) (Álvarez- Barragán, 2013).

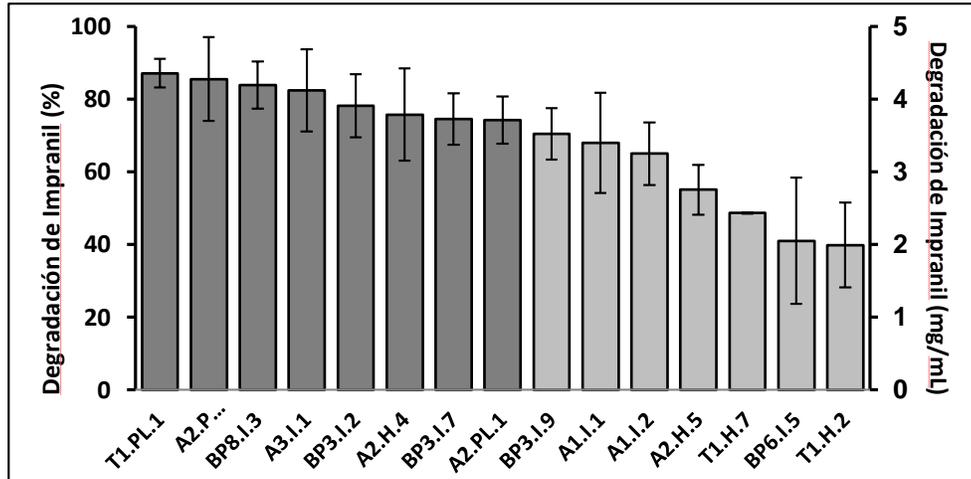


Figura 3. Cuantificación de la degradación del Impranil® DLN. Se presentan los porcentajes de degradación de Impranil® DLN obtenidos en 15 días de cultivo en MM-líquido de las 15 cepas más degradadoras (Tomado de Álvarez-Barragán, 2013).

Posteriormente se procedió a identificar a los ocho hongos con mayor capacidad de degradación de Impranil® DLN (Álvarez-Barragán, 2016). El género se determinó a través de sus características morfológicas microscópicas acorde a la clasificación de Saccardo (Barnett y Hunter, 1998), para lo cual se realizaron microcultivos que tras teñirse con azul de algodón lactofenol se observaron en microscopio de campo claro. Para la identificación de la especie correspondiente de cada hongo se llevaron a cabo técnicas de biología molecular, donde se amplificó por PCR y secuenció una región de 1,200 pb que incluían el ITS1 (internal transcribed spacer 1), el gen ribosomal 5.8S, el ITS2 (internal transcribed spacer 2) y la región D1-D2 del gen ribosomal 28S (Hinrikson *et al.*, 2005). Para el caso de los hongos pertenecientes al género *Cladosporium*, con el fin de obtener una identificación más precisa también se amplificaron secuencias parciales del gen de actina y del factor de elongación de la traducción 1 (TEF1) (Bensch *et al.*, 2012). La identificación se realizó comparando las secuencias amplificadas y secuenciadas con la base de datos del Genbank empleando la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool). Bajo estos criterios se logró determinar que las cepas A2.PP.5 y A3.I.1 son *Cladosporium tenuissimum*, T1.PL.1 es *Cladosporium pseudocladosporioides* y A2.PL.1 es *Aspergillus fumigatus*.

Con el fin de determinar las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación del Impranil® DLN así como las enzimas responsables de dichas actividades se realizaron pruebas de difusión radial y zimogramas para las actividades ureasa, esterasa, proteasa e “impranilasa” de concentrados proteicos extracelulares obtenidos de cultivos en MM-I líquido de los ocho hongos en estudio con mayor capacidad de degradación. En los ensayos de difusión radial se encontró que los extractos proteicos de todas las cepas analizadas tenían actividad esterasa, proteasa e “impranilasa” en tanto que solo *C. asperulatum* BP3.I.2 presentaba actividad ureasa (Álvarez-Barragán, 2016), por otro lado se encontraron similitudes en el zimograma de actividad esterasa y en el de actividad “impranilasa”, pues en ambos aparecían proteínas con una masa aproximada de 20 kDa en los concentrados proteicos provenientes de los hongos *C. tenuissimum* A3.I.1, *C. tenuissimum* A2.PP.5 y *C. montecillanum* A2.H.4 (Figura 4).

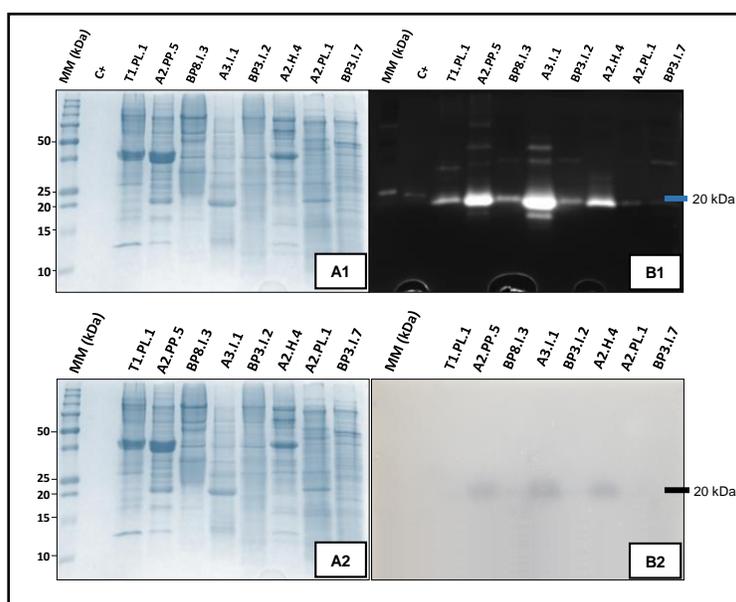


Figura 4. Zimogramas de la actividad esterasa e “impranilasa”. Se realizaron los ensayos a partir de concentrado proteico de proteína extracelular de los ocho hongos filamentosos con mayor capacidad de degradación de Impranil® DLN. **A1 y A2)** Patrón de proteínas teñido con solución de azul de Coomassie. **B1)** Zimograma de la actividad esterasa en donde se empleó como control positivo la lipasa de *P. fluorescens*. **B2)** Zimograma de la actividad “impranilasa” donde se empleó como control negativo concentrado proteico hervido de *C. tenuissimum* A3.I.1. (Álvarez-Barragán, 2016).

Para determinar la actividad enzimática específica degradadora de Impranil® DLN en proteína extracelular, se realizaron cinéticas de degradación a partir de concentrados proteicos obtenidos de cultivos de las cepas de hongos aisladas en MM-I líquido, empleando una concentración de sustrato fija en un intervalo de 6 min con 0, 5, 15, 30, 45 y 60 µg de proteína extracelular. Se encontró que los hongos con la mayor actividad

enzimática específica fue *C. tenuissimum* A3.I.1 y *C. tenuissimum* A2.PP.5 con 84 y 60 µg de Impranil degradado/min/µg de proteína (Álvarez-Barragán, 2016)

Ya que *C. tenuissimum* A3.I.1 presentaba la mayor actividad específica degradadora de Impranil® DLN y se había observado en su extracto proteico extracelular la presencia de una señal de aproximadamente 20 kDa en el zimograma para “impranilasa”, se procedió a realizar el aislamiento de la proteína responsable de dicha actividad empleando en primera instancia cromatografía de exclusión molecular y posteriormente cromatografía de intercambio iónico, monitoreando en las diferentes fracciones obtenidas actividad “impranilasa” por aclaramiento del Impranil® DLN. Para poder realizar la identificación de la enzima aislada de *C. tenuissimum* A3.I.1, a partir de las fracciones con actividad “impranilasa” obtenidas en la purificación, se realizó una electroforesis en un SDS-PAGE, se tiñó con colorante de Coomassie y se seleccionó la banda más intensa de aproximadamente 20 kDa la cual se mandó a analizar a la University of Massachusetts Medical School en la unidad de Proteomics and Mass Spectrometry Facility por MS/MS. Las muestras provenientes de la MS/MS fueron analizadas utilizando el software Mascot (Matrix Science, Londres, UK; versión 2.5.1) y los resultados revelados por el programa fueron analizados en el programa Scaffold (versión Scaffold_4.4.3, Proteome Software Inc. Portland, OR) (Álvarez-Barragán, 2016). Con base en los datos obtenidos por Scaffold se identificó a la proteína de interés como una cutinasa, una enzima perteneciente a la familia de las carbohidrato esterasas (Álvarez-Barragán, 2016).

Como objetivo a largo plazo en nuestro grupo de trabajo se busca clonar genes que codifiquen enzimas degradadoras de PU, como la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1, en cepas de hongos filamentosos que estudiamos, con el fin de mejorar su actividad degradadora de Impranil® DLN, para lo cual es necesario desarrollar metodologías que permitan la manipulación genética de dichas cepas.

2.4 Manipulación genética de hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos con paquetes enzimáticos muy complejos y diversos, razón por la cual el desarrollo de técnicas para su manipulación genética es

sumamente importante. En la actualidad se han reportado diferentes estrategias de transformación genética a las cuales suelen ser susceptibles estos microorganismos, como la electroporación de conidias germinadas, la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) y la transformación mediada por ondas de choque, además se han desarrollado sistemas robustos de selección eficiente de transformantes, que se basan principalmente en el empleo de marcadores de selección, usando vectores que contengan algún gen que otorguen resistencia a antibióticos. El desarrollo de protocolos para la transformación genética de estos microorganismos es difícil ya que hay pocos reportes de técnicas efectivas para cepas del mismo género o especie de la cepa que se esté trabajando, por lo cual es necesario probar diferentes metodologías y determinar cuál es la que funciona mejor en el respectivo modelo de trabajo (Ruiz-Díez, 2002).

2.4.1 Marcadores de selección y genes reporteros

Para una eficiente selección de transformantes es indispensable tener un sistema de escrutinio robusto. Comúnmente en ensayos de transformación genética de hongos filamentosos se suele emplear como marcador de selección *hph* de *Escherichia coli*. Este gen (*hph*) codifica a la higromicina B fosfotransferasa, que inactiva a la higromicina B (HygB), un antibiótico que se caracteriza por ser un aminoglucósido que actúa interrumpiendo la síntesis proteica interfiriendo en el proceso de translocación durante la traducción del mRNA, y que se sabe es activo en una gran variedad de organismos procariontes y eucariontes (Punt y van den Hondel, 1992).

En los ensayos de transformación genética de hongos filamentosos se suele emplear genes marcadores de selección en conjunto con genes reporteros que permitan evidenciar fácilmente la transformación de un organismo, tales como genes que codifiquen proteínas fluorescentes, variantes de la proteína verde fluorescente (GFP) (Lorang *et al.*, 2001). La GFP fue reportada por primera vez por Davenport y Nicol (1955), ellos observaron que la medusa *Aequorea victoria* al ser irradiada por luz UV cercana al espectro visible, presentaba fluorescencia de color verde. En años posteriores se logró aislar (Shimomura *et al.*, 1962), clonar (Prasher *et al.*, 1992) y expresar esta proteína

(Chalfie *et al.*, 1994), ayudando así al desarrollo de técnicas de biología molecular, usándola como gen reportero en ensayos de transformación genética. La expresión de esta proteína en hongos filamentosos requiere de una variante que sea traducida eficientemente por estos microorganismos, así como de un promotor fúngico adecuado para el hongo (Lorang *et al.*, 2001). El gen silvestre de la GFP de *A. victoria* no confiere un grado de fluorescencia apreciable en muchos hongos, debido principalmente a que no es traducida eficientemente (Spelling *et al.*, 1996), por lo cual se han desarrollado variantes que tienen un uso optimizado de codones para estos organismos (Cormack *et al.*, 1997), así como para plantas (Chiu *et al.*, 1996) y mamíferos (Haas *et al.*, 1996). Muchas de estas variantes como la EGFP1 y la SGFP contienen una sustitución de la serina 65 por una treonina (S65T), la cual otorga un mayor grado de fluorescencia, con un pico de absorción máxima entre 488 y 489 nm (Lorang *et al.*, 2001) y un pico de emisión máxima a 510 nm (Spiess *et al.*, 2005) (Figura 5). La expresión de variantes de la EGFP ha sido reportada ampliamente en muchos hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* (Fallon *et al.*, 2015), *A. flavus* (Du *et al.*, 1999) y *Magnaporthe oryzae* (Guo *et al.*, 2016).

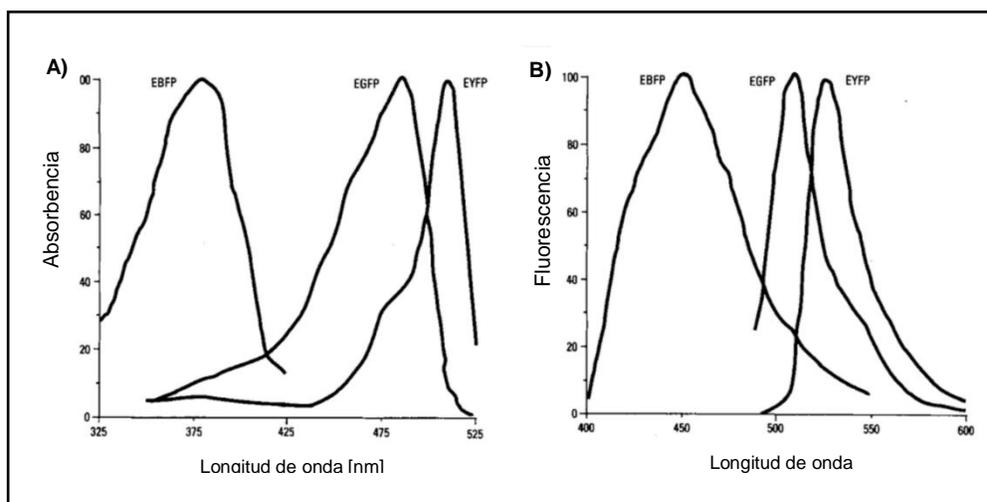


Figura 5. Espectros de excitación (A) y de emisión (B) de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), proteína azul fluorescente mejorada (EBFP) y de la proteína amarilla fluorescente mejorada (EYFP) (Kain, 1999).

2.4.2 Electroporación

La electroporación es una técnica de transformación que se suele emplear ampliamente en bacterias y cultivos celulares. Se basa en provocar un aumento de la permeabilidad

membranal al someter a las células a un campo eléctrico de determinada amplitud, que provoca la formación de poros hidrofílicos reversibles por donde la célula captura el DNA de interés (Anil *et al.*, 2008) (Figura 6). Los hongos suelen ser poco susceptibles a dicho fenómeno debido a que poseen una pared celular con una estructura compleja formada por proteínas y polisacáridos como la quitina y el quitosano (Ruiz-Herrera y Ortíz-Castellanos, 2010), la cual actúa como una barrera para la captura del DNA, es por eso que se han implementado tres variables principales para poder llevar a cabo la electroporación: empleando un pretratamiento de conidias con un agente debilitante de la pared celular (Chakraborty *et al.*, 1991), empleando protoplastos (Kothe y Free, 1996), o por medio del empleo de conidias germinadas (Sánchez y Aguirre, 1996). Existen factores importantes que pueden afectar la eficiencia de esta técnica, principalmente la etapa de crecimiento de las células, la densidad del cultivo celular, el diámetro celular, la susceptibilidad de la célula a transferir cargas eléctricas (Rivera *et al.*, 2014), así como la cantidad del vector (Robinson y Sharon, 1999) o la forma en que éste se emplee en la transformación (circular o lineal) (Sánchez y Aguirre, 1996).

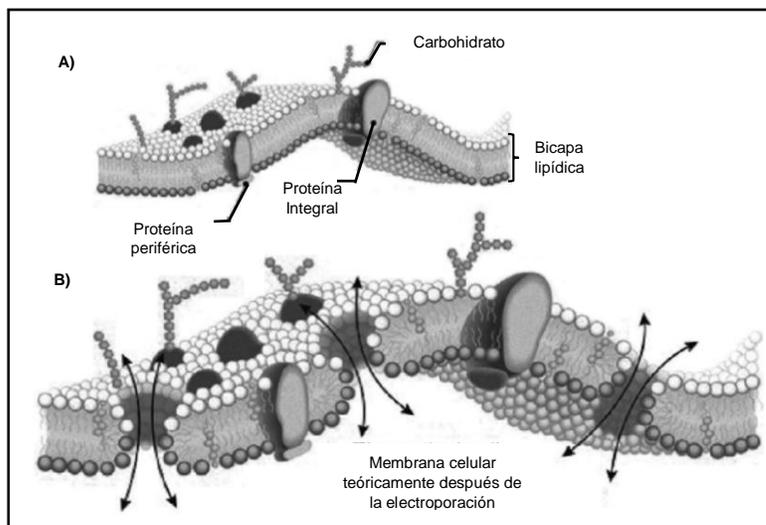


Figura 6. Membrana celular antes y después de ser expuesta a un campo eléctrico. A) Membrana celular íntegra. B) Formación de poros hidrofílicos membranales como efecto de la polarización de las cargas que rodean a la membrana, a causa de la exposición a un campo eléctrico (Modificado de Anil *et al.*, 2008).

2.4.3 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria fitopatógena Gram-negativa, que causa la formación de “tumores del cuello de la raíz” en muchas plantas dicotiledóneas (De Cleene y De Ley, 1976). Esta bacteria posee un plásmido (plásmido Ti) que contiene una región

conocida como *vir* con genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de DNA y de proteínas a una célula vegetal empleando un sistema de secreción T4SS (Christie, 1997). Posteriormente el DNA transferido (T-DNA) se integra al genoma de la célula blanco (Chilton *et al.*, 1980). El T-DNA silvestre contiene genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de fitohormonas inductoras de tumores como las auxinas y citoquininas (Binns, 2002), además se encuentra flanqueado por dos regiones de repetidos, conocidos como borde izquierdo (LB T-DNA) y borde derecho (RB T-DNA), mismos que son reconocidos por las endonucleasas *virD1* y *virD2*, para así provocar su escisión y permitir su transporte a la célula blanco con la ayuda de otras proteínas codificadas en la región *vir* (Relić *et al.*, 1998). Para llevar a cabo la expresión de los genes *vir* es necesaria la presencia de moléculas fenólicas asociadas a daño en el tejido vegetal, como lo es la acetosiringona, la cual es reconocida por *virA* un receptor membranal que provoca una cadena de señalización a través de *virG*, que culmina con la expresión de los genes *vir*, involucrados en la maquinaria de escisión, secreción y transporte del T-DNA (Subramoni *et al.*, 2014) (Figura 7).

Se ha demostrado la capacidad de emplear este proceso para transformar células fúngicas, empleando un sistema de vector binario, usando vectores que tienen la región que se desea insertar flanqueada con los bordes LB T-DNA y RB T-DNA. Estos vectores se introducen en cepas de *A. tumefaciens* cuyo plásmido Ti carece de T-DNA (la región que codifica las hormonas inductoras de tumor) pero que mantiene intacta la región *vir* (Lee y Gelvin, 2008). La ATMT es un método que se ha empleado ampliamente para transformar una gran variedad de hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* (Sugui *et al.*, 2005), *Cladosporium cladosporioides* (Zhang *et al.*, 2011), *Colletotrichum lagenarium* (Tsuji *et al.*, 2003), *Trichoderma reesei* (Zhong *et al.*, 2007), entre muchos otros. Para llevar a cabo dicho proceso se han desarrollado múltiples métodos que se basan en realizar un co-cultivo de *A. tumefaciens* (transformado con el vector con el que se desea transformar al hongo) con las conidias del hongo a transformar a determinada temperatura y condiciones de agitación, empleando acetosiringona en el medio. Existen muchos factores que afectan la eficiencia de dicho proceso, tal es el caso de la concentración de conidias a emplear, la concentración de *A. tumefaciens*, la temperatura

de co-cultivo (Soltani *et al.*, 2008) y la cepa de *A. tumefaciens* empleada (Nakamura *et al.*, 2012) (Zhang y Xia, 2017).

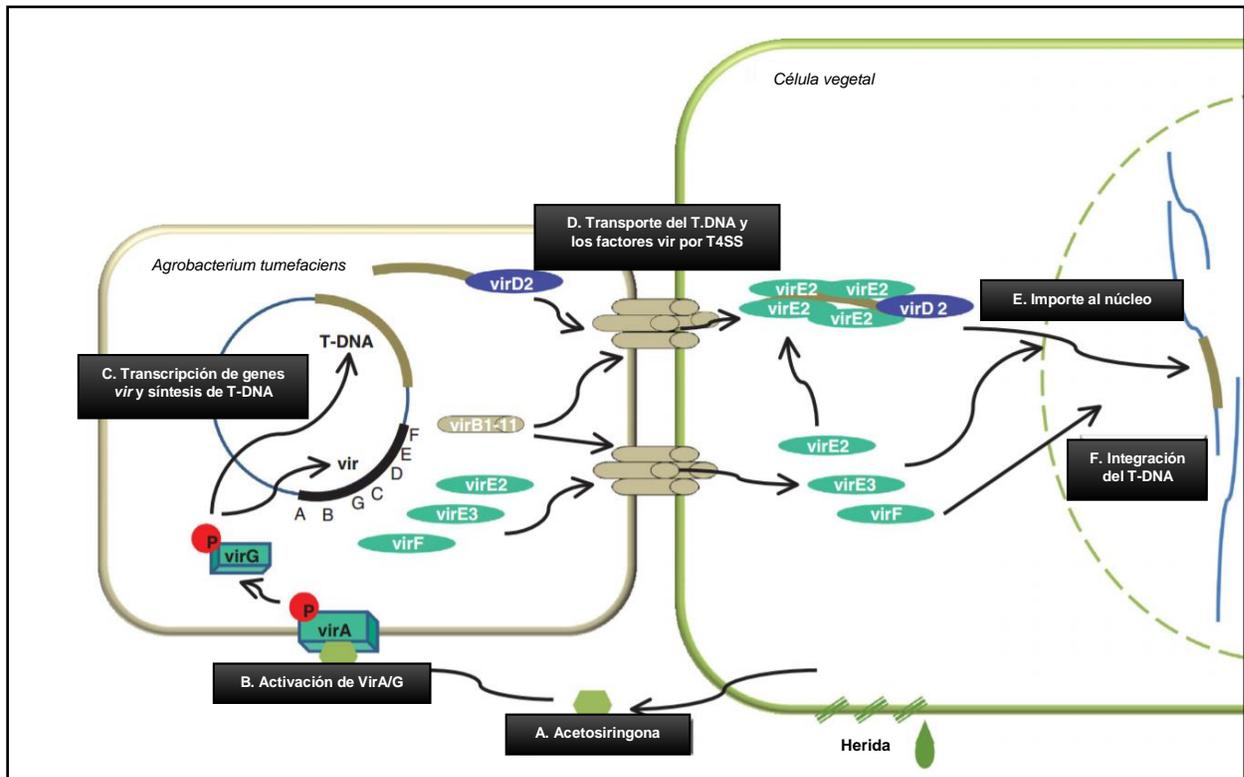


Figura 7. Etapas de la infección de *Agrobacterium tumefaciens* a una célula vegetal. **A)** Liberación de moléculas asociadas a daño (como la acetosiringona) del tejido vegetal. **B)** Activación de la cascada de señalización virA/virG a causa del reconocimiento de la acetosiringona por parte de virA. **C)** Transcripción de genes *vir* y escisión del T-DNA. **D)** Transferencia del T-DNA y de las proteínas vir a la célula vegetal por un sistema de secreción bacteriana de clase IV (T4SS) para realizar el ensamble del complejo T-DNA/proteínas vir. **E)** El complejo T-DNA/proteínas vir es importado al núcleo. **F)** El T-DNA es integrado a los cromosomas del hospedero a través de recombinación ilegítima (Modificado de Pitzschke e Hirt, 2010).

2.4.4 Transformación mediada por ondas de choque

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de transformación genética, dentro de las cuales se encuentra el uso de ondas de choque como medio para transformar genéticamente una gran variedad de hongos filamentosos entre los que se encuentran *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* (Magaña-Ortiz *et al.*, 2013). Esta técnica se basa en la cavitación acústica, en donde al exponer a un determinado líquido a una onda sonora de determinada frecuencia, las microburbujas de aire presentes en dicho líquido colapsarán formando microproyectiles de dicho fluido (Figura 8), mismos

que impactan con la pared y membrana celular fúngica causando poros transitorios por donde entrarán las macromoléculas. En este método se suele obtener una gran diferencia en la eficiencia de transformación dependiendo del número de ondas de choque que se empleen. Hay hongos que sólo se pueden transformar a un determinado número de ondas de choque, así como también existen aquellos que son susceptibles a transformarse en un amplio rango de condiciones, lo cual se debe probablemente a la composición de la pared celular específica de cada hongo (Magaña-Ortiz *et al.*, 2013).

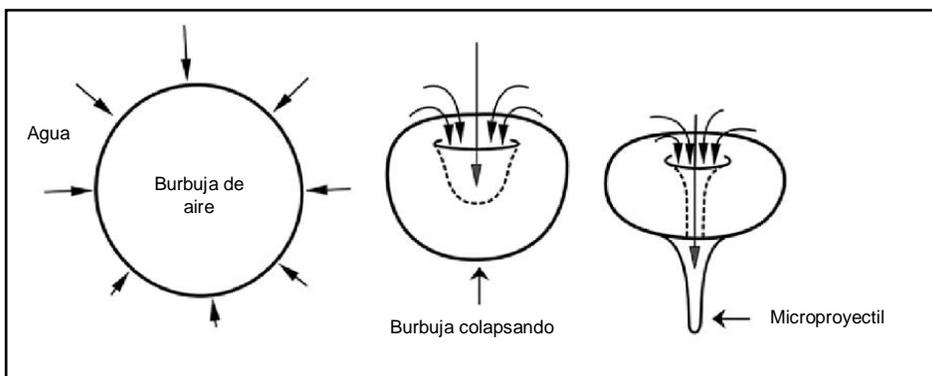


Figura 8. Esquema del colapso de una burbuja de aire inmersa en un fluido causando la formación de microproyectiles de dicho fluido a alta velocidad (Modificado de Gómez Lim *et al.*, 2015).

3. Hipótesis

Con base en los estudios reportados en la literatura en donde se emplearon metodologías exitosas de transformación genética de hongos filamentosos filogenéticamente cercanos a las cepas de hongos a trabajar (*Aspergillus fumigatus* A2.PL1, *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5, *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 y *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1), se propone que alguna o varias de las técnicas a probar (electroporación de conidias germinadas, transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y transformación mediada por ondas de choque) serán exitosas para transformar a estas cepas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

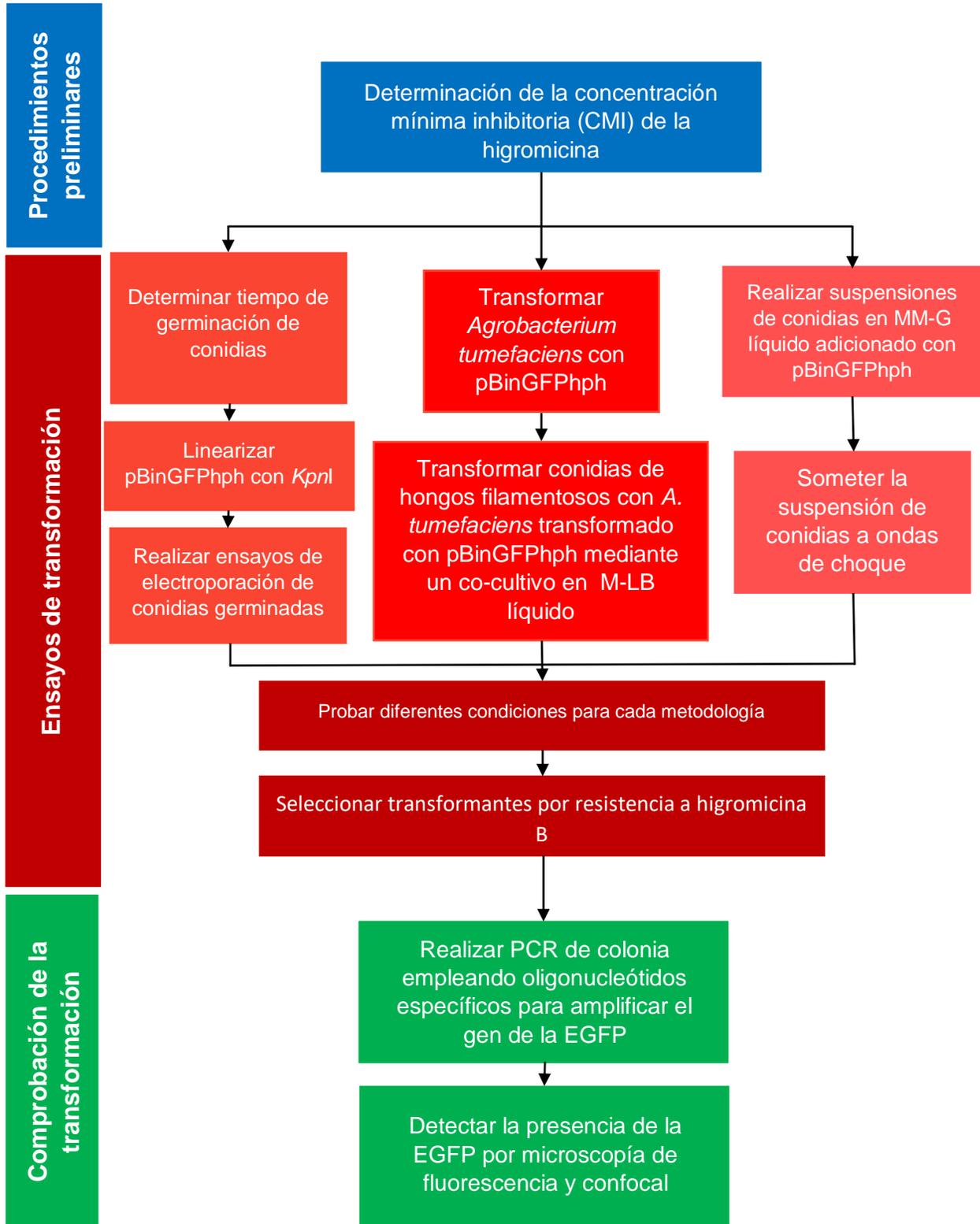
Establecer un protocolo de transformación genética para cuatro cepas de hongos filamentosos degradadores de Impranil aislados, identificados y estudiados en nuestro grupo de trabajo:

Aspergillus fumigatus A2.PL.1, *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5, *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 y *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1.

4.2 Objetivos particulares

- I. Probar diferentes métodos de transformación genética para hongos filamentosos en las cepas de trabajo (electroporación de conidias germinadas, transformación de conidias mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y transformación de conidias mediada por ondas de choque), empleando como vector pBinGFPhp.
- II. Seleccionar los transformantes obtenidos en las técnicas de transformación genética empleadas, mediante la resistencia a higromicina B.
- III. Comprobar la transformación genética empleando PCR de colonia usando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen reportero de la proteína verde fluorescente, EGFP.
- IV. Detectar la expresión de la EGFP por microscopía de fluorescencia y confocal.

5. Estrategia experimental



6. Materiales y Métodos

6.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos empleados

6.1.1 Cepas de hongos filamentosos

Para este trabajo se utilizaron cuatro cepas de los hongos filamentosos capaces de degradar Impranil® DLN aislados, identificados y estudiados por nuestro grupo de trabajo (Álvarez-Barragán, 2013). Se usaron los dos hongos con mayor capacidad de degradación de Impranil® DLN, *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5 y *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1, también se trabajó con el hongo con mayor actividad específica enzimática degradadora de Impranil® DLN de proteína extracelular *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1, y con *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1 uno de los ocho hongos filamentosos con mayor capacidad degradadora cuyo género ha sido reportado ampliamente en la literatura como susceptible a diferentes métodos de transformación de hongos filamentosos, aunque fue el que menor degradación mostró de los ocho mejores.

6.1.2 Cepas de bacterias

El plásmido pBinGFPhph se amplificó en *Escherichia coli* DH5- α , para los ensayos de transformación de conidias se empleó *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV2260, el genotipo y fuente de obtención de ambas bacterias se muestra en la Tabla 1.

6.1.3 Plásmido y oligonucleótidos

El plásmido empleado para todas metodologías de transformación en este trabajo fue pBinGFPhph, el cual fue donado por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim investigador del CINVESTAV, Unidad Irapuato. Este plásmido contiene un origen de replicación de alto número de copias (ColE1/pMB1/pBR322/pUC) y un sitio de restricción para *KpnI*. Como marcadores de selección tiene *KanR* (resistencia a kanamicina) y *hph* de *E. coli* (resistencia a higromicina B), este último tiene el promotor de la *gpdA* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y el terminador de la *TrpC* (Indol 3-glicerolfosfato sintasa), ambos de *Aspergillus nidulans* (Figura 9). Este plásmido cuenta con el gen de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) como gen reportero, mismo que está regulado por el promotor de la *gpdA* de *Aspergillus nidulans* y tiene el terminador de la NOS (nopalina

sintasa) (Figura 9). pBinGFPhph es un plásmido que tiene los bordes RB T-DNA y LB T-DNA adyacentes a los genes de la hph y de la EGFP correspondientemente, los cuales permiten el empleo de técnicas de transformación genética mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) (Lee y Gelvin, 2008).

Tabla 1. Genotipo y fuentes de *E. coli* DH5- α (Grant *et al.*, 1990) y *A. tumefaciens* GV2260 (Hellens *et al.*, 2000).

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> DH5- α	F- <i>endA1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 λ-recA1 <i>gyrA96 relA1 deoR</i> $\Delta(lacZYA-argF)$U169 ϕ80d/<i>lacZ</i>Δm15</i>	Cepario del presente laboratorio ¹
<i>A. tumefaciens</i> GV2260	C58 [pGV2260(pTiB6S3 Δ T-DNA)], marcador cromosomal: rifampicina, marcador de plásmido Ti: carbenicilina.	Cepario de la Dra. Patricia Coello Coutiño ²

Laboratorio 105 del Conjunto E, Facultad de Química de la UNAM, Ciudad de México, grupo a cargo de la Dra. Herminia Loza Tavera (¹) y grupo a cargo de la Dra. Patricia Coello Coutiño (²).

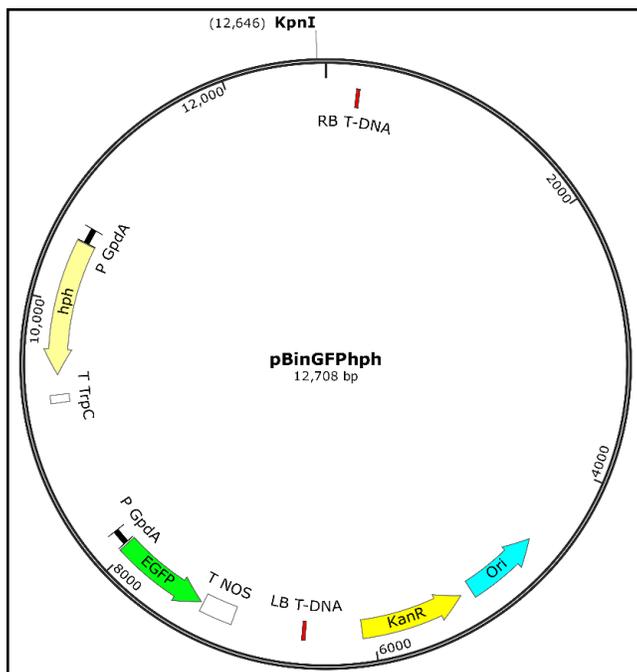


Figura 9. Mapa de pBinGFPhph. Este vector fue empleado para todos los ensayos de transformación de hongos filamentosos. El mapa se obtuvo empleando el programa SnapGene Viewer.

La presencia de pBinGFP_{hph} en los transformantes fue detectada por reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos específicos para amplificar una sección de 603 pb del gen de la EGFP (Tabla 2). Los oligonucleótidos fueron diseñados por la Dra. Lilianha Domínguez Malfavón, posdoctorante de nuestro laboratorio.

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de la EGFP. Las temperaturas de fusión y los % de GC se obtuvieron por el programa SnapGene Viewer.

Nombre	Secuencia	Contenido de GC (%)	Temperatura de fusión (°C)	Masa molecular (g/mol)
GFP-F	5'-TCACGAACTCCAGCAGGAC-3'	58	58	5828.8
GFP-R	5' GCCAGAAGTTCAGCGTGTC-3'	58	58	5890.8

6.2 Protocolos para almacenamiento de cepas

6.2.1 Almacenamiento de conidias en glicerol a -70 °C

- 1) A partir de cultivos puros del hongo que se desea preservar, tomar una asada e inocularla en medio papa dextrosa agar (PDA) (Ver Anexos) por estría masiva e incubar a 25 °C.
- 2) Permitir que el hongo crezca hasta llenar la caja y aparezcan conidias abundantemente.
- 3) Adicionar 10 mL de una solución de glicerol al 30% en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.5 (estéril) sobre la caja de Petri con el hongo y raspar con asa Drigalsky.
- 4) Colectar la suspensión de conidias en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL, agregando 1 mL de la suspensión en cada uno.
- 5) Congelar la suspensión de cada hongo utilizando nitrógeno líquido y almacenar en un ultracongelador a -70 °C.

Para asegurar que las cepas se conservaron adecuadamente, descongelar y reactivar sembrando 100 μ L de la suspensión en medio PDA e incubar a 25 °C por 7 días, para posteriormente verificar morfología colonial y ausencia de contaminaciones.

6.2.2 Almacenamiento de conidias en solución salina isotónica

- 1) A partir de suspensiones de conidias preservadas en glicerol a -70 °C, tomar una alícuota de 100 μ L e inocularla en medio PDA por estría masiva.
- 2) Permitir que el hongo crezca hasta llenar la caja y aparezcan conidias abundantemente.
- 3) Agregar 10 mL de solución salina isotónica (SSI) (0.9% m/v NaCl) adicionada con Tween 80 al 0.01 % (estéril) sobre la caja de Petri con el hongo y raspar con asa Drigalsky.
- 4) Colectar la suspensión de conidias en tubos Falcon estériles de 15 mL.
- 5) Lavar 3 veces centrifugando a 1,775 x *g* en una centrífuga (IEC HNS-II) con SSI.
- 6) Resuspender en 5 mL de SSI y determinar la concentración (conidias/mL) con ayuda de una cámara de Neubauer.
- 7) Ajustar a una concentración de 1×10^7 conidias/mL y almacenar en refrigeración a 4 °C.

6.3 Preparación de pBinGFP_{hph} empleando *Escherichia coli* DH5- α

- 1) Transferir 100 μ L de una suspensión de *E. coli* DH5- α competente preservada en glicerol a -70 °C, a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, agregar 50 ng de pBinGFP_{hph} e incubar 30 min en hielo.
- 2) Incubar en un baño agua a 42 °C por 45 min.
- 3) Incubar 2 min en hielo y después agregar 1 mL de medio Luria Bertani (LB).
- 4) Incubar 1 h a 37 °C y 100 rpm.
- 5) Sembrar 200 μ L de la suspensión anterior en medio sólido LB con kanamicina (Kan) (30 μ g/mL) por 24 h y 37 °C. Para confirmar la transformación realizar PCR de

colonia acorde al protocolo correspondiente y posteriormente realizar la extracción y purificación de pBinGFP_{hph} a través del protocolo que indica el manual del GeneElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit.

6.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de higromicina B en las distintas cepas de hongos

- 1) Inocular 5×10^6 conidias en medio PDA adicionado con higromicina B (HygB) a la concentración a probar.
- 2) Incubar a 25 °C por 8 días.

6.5 Electroporación de conidias germinadas

6.5.1 Protocolo para monitorear el porcentaje de germinación de conidias

- 1) Inocular 1×10^7 conidias en un tubo de cultivo con 5 mL de medio YPG (Ver Anexos) e incubar a 30 °C y 250 rpm.
- 2) Tomar muestra cada hora cuantificando el porcentaje de conidias germinadas empleando una cámara de Neubauer. Al ya llegar a un porcentaje cercano al 90% realizar mediciones cada 30 min. Tomar muestras hasta obtener un porcentaje $\geq 90\%$ de conidias germinadas.

6.5.2 Protocolo para linearizar pBinGFP_{hph}

- 1) Transferir a un tubo Eppendorf de 0.6 mL 50 μ L de amortiguador *KpnI* (10X), 50 μ g de DNA, 50 U de *KpnI*, y suficiente agua para completar 500 μ L de volumen e incubar a 37 °C por 1 h.
- 2) Llevar a cabo una electroforesis cargando 5 μ L de la reacción en un gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 1X. Terminada la electroforesis observar empleando una cámara de UV.

6.5.3 Electroporación de conidias germinadas (Modificado de Cortés-Espinosa et al., 2012)

- 1) Inocular 5×10^7 conidias en un tubo de cultivo con 5 mL de medio YPG e incubar a 30 °C y 250 rpm, por el tiempo necesario para obtener $\geq 90\%$ de conidias germinadas por cepa.
- 2) Transferir la suspensión a un tubo Falcon de 15 mL estéril y lavar las conidias dos veces con agua estéril fría centrifugando a $1,775 \times g$ en una centrífuga (IEC HNS-II).
- 3) Resuspender las conidias en 1 mL de amortiguador YED-H (Ver Anexo) frío e incubar a 30 °C y 100 rpm por 1 h.
- 4) Transferir la suspensión a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y centrifugar a $3,000 \times g$ en una microcentrífuga, resuspender las conidias en 200 μL de amortiguador de electroporación frío (Ver Anexos) y mantener la suspensión en hielo.
- 5) En una cubeta de electroporación mezclar 100 μL de la suspensión anterior fría con 2 μg de pBinGFPhph, e incubar en hielo por 15 min.
- 6) Llevar a cabo los ensayos de electroporación con las diferentes condiciones de voltaje, resistencia y capacitancia a probar (Tabla 3).
- 7) Después de la electroporación, añadir 1 mL de medio YED-S (Ver Anexos) frío a la cubeta y mantener en hielo durante 15 min.
- 8) Transferir la suspensión celular a un tubo de cultivo estéril de 15 mL e incubar a 30 °C y 200 rpm (Agitación rotatoria) durante 90 min.
- 9) Pasar la suspensión celular a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y centrifugar a $3,000 \times g$, en una microcentrífuga, para posteriormente eliminar el sobrenadante dejando aproximadamente 200 μL de la suspensión.
- 10) Sembrar 100 μL de la suspensión en medio PDA con HygB a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Incubar a 25 °C durante 8 días.
- 11) Si se obtuvieron colonias candidatas a transformantes, resembrar en medio PDA con HygB (CMI) a 25 °C.

Incluir un control de crecimiento y un control de antibiótico, en los cuales se realice el experimento agregando agua desionizada estéril en lugar de pBinGFPhp sembrando en medio PDA sin HygB y en medio PDA con HygB correspondientemente, para cada cepa.

El aparato que se empleó para realizar la electroporación fue el Gene Pulser Electroporator (Bio Rad), que pertenece al Departamento de Alimentos de la Facultad de Química, UNAM.

Tabla 3. Condiciones de electroporación probadas. Para todos los ensayos se empleó una resistencia de 200 Ω .

Condición	Capacitancia (μ F)	Voltaje (V)
1	3	1500
2		2000
3	25	2000
4	500	450

6.6 Transformación de conidias mediante *Agrobacterium tumefaciens*

6.6.1 Protocolo para hacer competente a *Agrobacterium tumefaciens*

- 1) Inocular 5 mL de LB con una colonia de *A. tumefaciens* e incubar a 28 °C por 24 h a 220 rpm.
- 2) Transferir 2 mL de pre-cultivo del paso 1 a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de LB líquido e incubar a 25 °C hasta obtener una densidad óptica a 660 nm ($DO_{660\text{ nm}}$) de 0.5.
- 3) Enfriar en hielo por 10 min.
- 4) Transferir a tubos Eppendorf de 2 mL y centrifugar a 3,824 x *g* en una microcentrífuga por 5 min a 4 °C. Repartir en tubos Eppendorf todo el cultivo obtenido en el paso 2.
- 5) Para cada repetición del paso 4 resuspender la pastilla en 1 mL de $CaCl_2$ 20 mM, glicerol al 10%.
- 6) Hacer alícuotas de 100 μ L y almacenar en ultracogelador a -70 °C.

6.6.2 Protocolo para transformar *Agrobacterium tumefaciens* con pBinGFP_{hph}

- 1) Descongelar las alícuotas de *A. tumefaciens* tratadas con CaCl₂ en hielo por 15 min.
- 2) Añadir 7 µg de pBinGFP_{hph} a la suspensión anterior y posteriormente congelar en nitrógeno líquido por 5 min.
- 3) Incubar a 37 °C por 25 min.
- 4) Agregar 1 mL de LB e incubar por 3 h a 28 °C y 250 rpm (agitación rotatoria).
- 5) Sembrar en cajas con LB sólido adicionado con rifampicina (Rif) (100 µg/mL) y Kan (30 µg/mL) e incubar a 28 °C por 3 días.
- 6) Si se obtuvieron candidatas a transformantes en el paso anterior, resebrar en LB adicionado con Rif (100 µg/mL) y Kan (30 µg/mL) e incubar a 28 °C por 3 días para corroborar el fenotipo.

Realizar un control de crecimiento y un control de antibiótico para cada condición, en los cuales se realice el experimento sin agregar pBinGFP_{hph} sembrando en LB con Rif sin Kan y en LB con Rif y Kan correspondientemente.

6.6.3 Protocolo para transformar conidias con *Agrobacterium tumefaciens*

- 1) Inocular 5 mL de LB adicionado con Rif (100 µg/mL) y Kan (30 µg/mL) con una colonia de *A. tumefaciens* transformado con pBinGFP_{hph} e incubar a 25 °C y 250 rpm (agitación rotatoria) por 1 día.
- 2) Transferir 1 mL de la suspensión anterior a 10 mL de LB en un matraz Erlenmeyer de 250 mL e incubar a 25 °C y 250 rpm hasta obtener una DO₆₀₀ de 0.6 (aproximadamente 5 h).
- 3) De la suspensión anterior transferir los distintos volúmenes a probar (200, 300, 400, 500 ó 600 µL) a tubos Eppendorf y recuperar las células centrifugando a 16,162 x g en una microcentrífuga por 5 min desechando el sobrenadante.

- 4) Transferir a cada tubo Eppendorf una alícuota de una suspensión de conidias de la cepa de interés con 5×10^7 conidias y recuperar células centrifugando a $16,162 \times g$ en una microcentrífuga por 5 min desechando el sobrenadante.
- 5) Resuspender la pastilla en 500 μL de LB adicionado con acetosiringona 300 μM y transferir a un tubo de cultivo de 13x100 mm con tapón de rosca.
- 6) Incubar a 25 °C y 50 rpm (agitación rotatoria) durante 48 h.
- 7) Tomar 200 μL del co-cultivo y sembrar en 4 cajas de Petri (50 μL de co-cultivo por caja) con medio PDA adicionado con HygB (CMI) y gentamicina (Gm) (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 8 días aproximadamente.
- 8) Continuar incubando a 25 °C y 50 rpm los 300 μL restantes del co-cultivo hasta que completen 72 h de co-cultivo.
- 9) Tomar 200 μL del co-cultivo y sembrar en 4 cajas de Petri (50 μL de co-cultivo por caja) con medio PDA adicionado con HygB (CMI) y Gm (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 8 días aproximadamente.
- 10) Si se obtuvieron colonias candidatas a transformantes en el paso anterior, resembrar las colonias transformadas en PDA adicionado con HygB (CMI) e incubar a 25 °C por 8 días para corroborar el fenotipo.

Realizar controles de antibiótico para cada condición, en los cuales se realice el experimento sin agregar *A. tumefaciens* transformado con pBinGFPhh sembrando en medio PDA con HygB (CMI).

6.7 Transformación de conidias empleando ondas de choque

- 1) A partir de suspensiones de conidias preservadas en glicerol a -70 °C, tomar una alícuota de 100 μL e inocularla en medio PDA por estría masiva.
- 2) Permitir que el hongo crezca hasta llenar la caja y aparezcan conidias abundantemente.
- 3) Agregar 10 mL de SSI adicionada con Tween 80 al 0.01% (estéril) sobre la caja de Petri con el hongo y raspar con asa Digrafsky.

- 4) Colectar la suspensión de conidias en tubos Falcon estériles de 15 mL.
- 5) Lavar 3 veces centrifugando a $1,775 \times g$ en una centrífuga (IEC HNS-II) con SSI.
- 6) Resuspender en 5 mL de medio mínimo glucosa (MM-G) (Ver anexos) líquido y determinar la concentración (conidias/mL) con la cámara de Neubauer.
- 7) Ajustar a una concentración de 1×10^7 conidias/mL y almacenar en refrigeración a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 8) Transferir una alícuota de la suspensión anterior con 1×10^5 conidias a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
- 9) Agregar $50 \text{ } \mu\text{g}$ de pBinGFPhph a la suspensión anterior y agregar suficiente MM-G líquido para completar 1 mL.
- 10) Transferir la suspensión anterior a una pipeta de transferencia de plástico estéril y sellarla.
- 11) Colocar la pipeta de transferencia en el generador de ondas de choque y someter el tratamiento a probar a las diferentes condiciones de ondas de choque (250, 300 o 350). Para todos los experimentos las ondas de choque se generaron a 6 kV a una frecuencia de 0.5 Hz.
- 12) Sembrar la suspensión en MM-G sólido con un papel filtro e incubar 24 h a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Verificar que la suspensión se distribuyó homogéneamente en el papel filtro.
- 13) Transferir el papel filtro a MM-G sólido adicionado con HygB (CMI) e incubar 8 días a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Si quedaron restos de la suspensión de conidias en el MM-G sólido, tratar de tomar la mayor cantidad con un papel filtro y transferirlo a MM-G sólido adicionado con HygB (CMI) e incubar a 8 días a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 14) Si se obtuvieron colonias candidatas a transformantes en el paso anterior, resembrar en MM-G con HygB (CMI) e incubar 8 días a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para corroborar el fenotipo. Realizar un control de crecimiento y un control de antibiótico para cada condición, en los cuales se realice el experimento sin agregar pBinGFPhph sembrando en medio PDA sin HygB y en medio PDA con HygB correspondientemente.

El generador experimental de ondas de choque utilizado se encuentra en el laboratorio de ondas de choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, unidad Querétaro, a cargo del Dr. Achim Max Loske Mehling.

6.8 PCR de colonia

6.8.1 Bacterias

- 1) Tomar con un palillo estéril una colonia aislada y resuspender en 50 μL de agua desionizada estéril.
- 2) Calentar la muestra en baño de agua a 94 °C por 10 min.
- 3) Centrifugar por 5 minutos a 16,162 x g en una microcentrífuga.
- 4) Llevar a cabo la PCR acorde a la tabla 4 empleando como molde 9.95 μL del sobrenadante obtenido en el paso 3. Respecto al programa a usar en el termociclador, como primera etapa incubar a 95 °C por 5 min, como segunda etapa para la fase de desnaturalización de la cadena molde emplear 95 °C por 30 s, para la fase de alineamiento 56 °C por 30 s y para la extensión de la cadena 72 °C por 72 s, finalmente para la tercera etapa incubar a 72 °C por 7 min. Emplear 35 ciclos de la segunda etapa del programa mencionado.
- 5) Llevar a cabo una electroforesis cargando 5 μL de reacción de PCR en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. Terminada la electroforesis observar empleando una cámara de UV. El amplicón esperado de la EGFP es de 603 pb.

6.8.2 Hongos (Modificado de Rasmus y Normand, 2015)

- 1) Tomar 1 cm^2 de una colonia aislada y transferir a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Tratar de tomar la menor cantidad de medio posible.
- 2) Congelar a -70 °C con ayuda de nitrógeno líquido y macerar con un pistilo estéril.
- 3) Agregar 200 μL de agua desionizada estéril e incubar en baño de agua a 94 °C por 10 min.
- 4) Centrifugar a 16,162 x g en una microcentrífuga por 5 min y hacer dilución 1:10 del sobrenadante usando agua desionizada estéril.

Tabla 4. Reactivos y cantidades a emplear para realizar la PCR de colonia empleando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la EGFP.

Reactivos	Stock	Reacción	Volumen de reacción
Amortiguador Taq +(NH₄)₂SO₄, - MgCl₂	10X	1 X	1.5 µL
dNTP's	10 mM	200 µM	0.3 µL
GFP-F	10 µM	0.5 µM	0.75 µL
GFP-R	10 µM	0.5 µM	0.75 µL
MgCl₂	25 mM	2.5 mM	1.5 µL
Molde	-	Sobrenadante	9.95 µL
Taq DNA Polimerasa	5 U/µL	1.25 U	0.25 µL

5) Llevar a cabo la PCR acorde a la tabla 4 empleando como molde la dilución de conidias rotas preparada anteriormente. Respecto al programa a usar en el termociclador, como primera etapa incubar a 95 °C por 5 min, como segunda etapa, para la fase de desnaturalización de la cadena molde emplear 95 °C por 30 s, para la fase de alineamiento 56 °C por 30 s y para la extensión de la cadena 72 °C por 72 s, finalmente para la tercera etapa incubar a 72 °C por 7 min. Emplear 35 ciclos de la segunda etapa del programa mencionado.

6) Después de la PCR llevar a cabo una electroforesis cargando 5 µL de reacción en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Terminada la electroforesis observar el gel empleando una cámara de UV. El amplicón esperado de la EGFP es de 603 pb.

6.9 Microscopía de fluorescencia y confocal

1) Esterilizar una caja de Petri de vidrio que contenga un papel filtro en su base y encima un triángulo de vidrio con dos portaobjetos.

- 2) Cortar un cubo de medio PDA de aproximadamente 2 cm de largo, 2 cm de alto y 2 cm de ancho con un bisturí estéril y colocarlo en la parte central de uno de los portaobjetos estériles.
- 3) A partir de una colonia aislada, resistente a HygB inocular los cuatro lados del cubo de medio sólido empleando el asa micológica.
- 4) Colocar sobre el cubo de medio PDA el otro portaobjetos empleando pinzas estériles.
- 5) Agregar 5 mL de agua desionizada estéril a la caja de Petri cuidando que no tenga contacto con el portaobjetos e incubar a 25 °C por 8 días.
- 6) Retirar con cuidado uno de los portaobjetos y retirar el cubo de medio PDA.
- 7) Observar las muestras empleando un microscopio de fluorescencia y uno confocal. Para realizar las microscopías de fluorescencia se empleó el microscopio trinocular de EPI fluorescencia FM320TA-8M (Amscope), usando un filtro de excitación de 490 nm y un filtro de emisión de 530 nm. El ancho de banda que dejan pasar los filtros empleados no está especificado, sin embargo, los filtros de excitación “azul” fabricados por esta casa comercial por lo general tienen un ancho de banda que fluctúa entre los 435 y 495 nm (Amscope, 2015). Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Amscope LOW-LUX de 8 MP. Estos equipos pertenecen al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. Para las observaciones en microscopía confocal se usó un microscopio Olympus FV1000 empleando un láser diodo de 473 nm y un filtro de emisión de 510 nm. Las imágenes se procesaron con el programa Olympus FV10-AWS versión 03.00.01.15. Este equipo pertenece a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

7. Resultados y discusión

7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de higromicina B (HygB)

La HygB es un antibiótico aminoglucósido que es activo en células eucariontes y procariontes, se caracteriza por inhibir el proceso de translocación durante la traducción del mRNA evitando la síntesis peptídica, por lo cual es ampliamente usado en el área de biología molecular. Para poder realizar un escrutinio confiable de transformantes se realizaron ensayos de resistencia a HygB para determinar la CMI de cada cepa empleando una cantidad de conidias conocida. Todos los hongos en estudio resultaron ser sensibles a este antibiótico, y se encontró que la inhibición total de crecimiento fúngico para *C. tenuissimum* A3.I.1 y *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 ocurrió a los 60 µg/mL, para *C. tenuissimum* A2.PP.5 ocurrió a los 90 µg/mL y para *A. fumigatus* A2.PL.1 a los 120 µg/mL (Tabla 5). La sensibilidad por parte de las cepas en este estudio concuerda con trabajos reportados anteriormente donde cepas de hongos filogenéticamente cercanos como *Aspergillus fumigatus* (Sugui *et al.*, 2005) y *Cladosporium cladosporioides* (Zhang *et al.*, 2011) resultaron ser sensibles a la HygB.

Tabla 5. Pruebas de crecimiento de las cepas en estudio en medio PDA adicionado con HygB a diferentes concentraciones. (+) Representa un ensayo donde hubo crecimiento, (-) representa un ensayo en el cual hubo una inhibición total del crecimiento y N/R representa una prueba no realizada. En amarillo se encuentran las CMI determinadas para cada cepa.

Cepa	Concentración HygB (µg/mL)				
	50	60	90	120	150
<i>A. fumigatus</i> A2.PL.1	N/R	+	+	-	-
<i>C. tenuissimum</i> A2.PP.5	N/R	+	-	N/R	N/R
<i>C. tenuissimum</i> A3.I.1	+	-	-	N/R	N/R
<i>C. pseudocladosporioides</i> T1.PL.1	+	-	-	N/R	N/R

7.2 Electroporación de conidias germinadas

7.2.1 Monitoreo del porcentaje de germinación de conidias

El primer método de transformación para hongos filamentosos que se probó fue la electroporación de conidias germinadas, pues con base en reportes donde se hace mención que hongos filamentosos de la especie *Aspergillus niger* (Cortés-Espinosa *et al.*, 2012; Ozeki *et al.*, 1994) son susceptibles a este método, se decidió emplearlo ya que uno de los hongos de trabajo es un *Aspergillus fumigatus*. El protocolo seleccionado consiste de un pre-cultivo en el cual se busca la germinación de la mayor cantidad posible de conidias antes de someter las células a un campo eléctrico, por lo cual se realizaron curvas temporales para cada una de las cepas de trabajo, para así determinar un tiempo al cual el 90% de las conidias germinaran bajo las condiciones de pre-cultivo probadas. Las curvas de germinación demostraron que bajo las condiciones probadas *A. fumigatus* A2.PL.1 fue la cepa que germinó con mayor velocidad, pues alcanzó el 90% de conidias germinadas a las 3.5 h, por otro lado *C. tenuissimum* A2.PP.5 y *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 obtuvieron dicho porcentaje a las 7.5 h mientras que *C. tenuissimum* A3.I.1 lo logró hasta las 12.5 h (Figura 10).

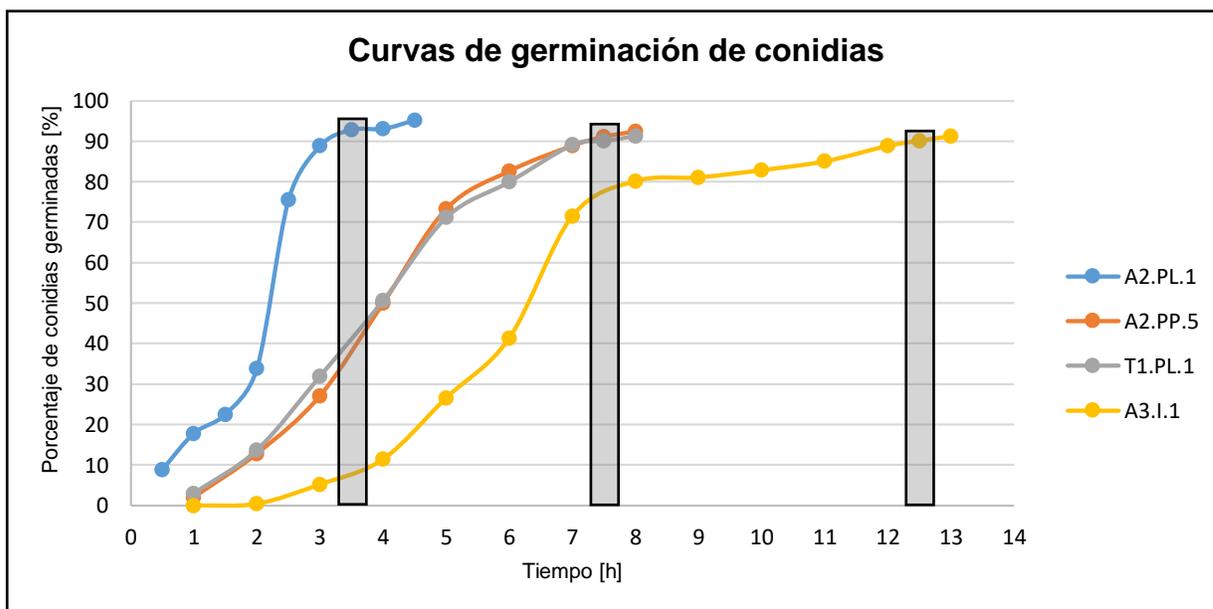


Figura 10. Curvas de germinación de conidias para las cuatro cepas en estudio (*A. fumigatus* A2.PL.1, *C. tenuissimum* A2.PP.5, *C. tenuissimum* A3.I.1 y *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1) en medio YPG. Los tiempos de germinación seleccionados para poder obtener un porcentaje mayor al 90% de conidias germinadas son aquellos que están marcados con una barra de color gris. Se realizaron tres repeticiones para cada curva.

7.2.2 Linearización de pBinGFPhph

Con base en reportes de electroporación de conidias germinadas en donde se demostró que usar un plásmido linearizado aumenta la eficiencia de transformación (Sánchez y Aguirre, 1996), se decidió realizar las pruebas de electroporación de conidias germinadas con el vector linearizado, para lo cual se realizó una reacción de digestión usando *KpnI*, aprovechando el hecho de que pBinGFPhph tiene un solo sitio de reconocimiento a dicha enzima de restricción. En la figura 11 se puede observar que el plásmido ya linearizado aparece como una banda de aproximadamente 12.7 kpb que corresponde a la longitud esperada para dicho plásmido, pues la longitud teórica de pBinGFPhph es de 12,708 pb, por otro lado el plásmido circular aparece como bandas de tamaño menor a 12 kpb, esto debido principalmente a la formas superenrolladas de los topoisómeros que presenta, causando una disminución en el tamaño tridimensional que les permite avanzar con mayor facilidad en el gel de agarosa, comprobando así que la reacción de digestión de pBinGFPhph con *KpnI* fue exitosa.

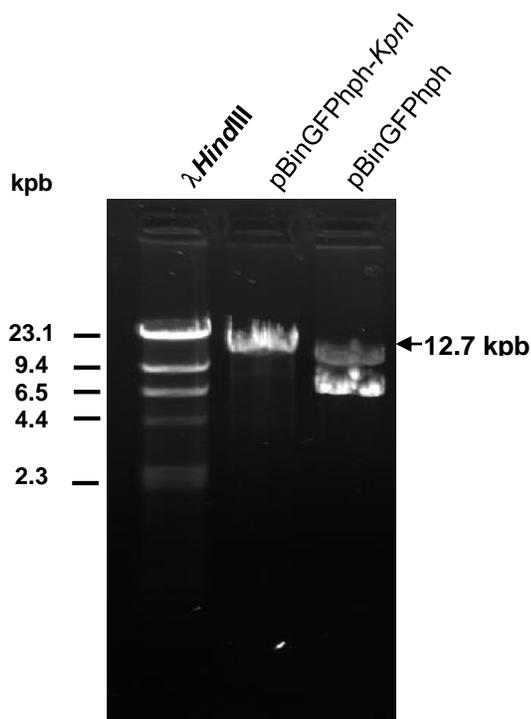


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de pBinGFPhph digerido con *KpnI*. En el primer carril se observa el marcador molecular λ HindIII. En el segundo carril se cargó 1 μ L de la reacción de digestión de pBinGFPhph con *KpnI*, en donde se observa una banda intensa de aproximadamente 12.7 kpb que corresponde al plásmido linearizado. En el tercer carril se cargaron 200 ng de pBinGFPhph circular empleado para la reacción de restricción, en donde se observan bandas con una longitud menor a las 12.7 kpb que representan a los diferentes topoisómeros presentados por el vector circular.

7.2.3 Electroporación de conidias germinadas

Una vez determinada la curva de germinación conidial y de obtener pBinGFPhp linearizado se procedió a realizar los ensayos de electroporación en los cuales se probaron diferentes condiciones de voltaje y capacitancia; sin embargo, en ninguno de los ensayos realizados se obtuvieron transformantes. En todos los controles de crecimiento hubo desarrollo fúngico, lo cual indicó que las condiciones de electroporación empleadas no dañaron a las conidias. Por otro lado, en todos los controles de antibiótico hubo inhibición completa del desarrollo fúngico, lo cual indicó que el antibiótico funcionó correctamente (Figura 12). Estos resultados se pueden deber a muchos factores, pues puede que la cantidad de plásmido empleado (Robinson y Sharon, 1999) o la concentración de conidias (Ozeki *et al.*, 1994) no haya sido la adecuada, ya que la relación entre estas dos variables está íntimamente relacionada con la eficiencia de transformación. Otro factor que pudo ocasionar dicho comportamiento, es que las condiciones empleadas no fueron las adecuadas para poder polarizar las cargas membranales y permeabilizar las conidias (Anil *et al.*, 2008).

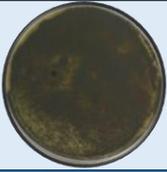
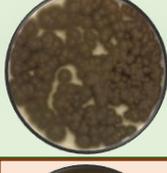
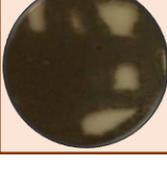
Cepa	Control de crecimiento	Control de antibiótico	Prueba
<i>A. fumigatus</i> A2.PL.1			
<i>C. tenuissimum</i> A3.I.1			
<i>C. tenuissimum</i> A2.PP.5			
<i>C. pseudocladosporioides</i> T1.PL.1			

Figura 12. Resultados representativos de los ensayos de electroporación. Imágenes de los resultados obtenidos empleando 500 μ F, 450 V y 200 Ω para todas las cepas de trabajo, *A. fumigatus* A2.PL.1, *C. tenuissimum* A2.PP.5, *C. tenuissimum* A3.I.1 y *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1. Control de crecimiento: Representa los resultados obtenidos al no agregar pBinGFPhp durante el tratamiento sembrando en medio PDA. Control de antibiótico: Representa a los resultados obtenidos al no agregar pBinGFPhp durante el tratamiento sembrando en medio PDA con HygB (CMI). Prueba: Representa a los resultados obtenidos al agregar pBinGFPhp durante el tratamiento sembrando en medio PDA con HygB (CMI). Para cada experimento se realizaron 3 repeticiones.

7.3 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

7.3.1 Transformación de *A. tumefaciens* con pBinGFPhph

7.3.2 Debido a que no se logró transformar ninguna de las cepas empleado electroporación de conidias germinadas, se procedió a realizar ensayos de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Se decidió emplear este método ya que en la literatura se ha reportado que hongos filamentosos del mismo género y/o especie de las cepas de trabajo, como *Aspergillus fumigatus* (Sugui *et al.*, 2005) y *Cladosporium cladosporioides* (Zhang *et al.*, 2011), son susceptibles a transformarse por ATMT. Para poder realizar los ensayos, en primera instancia, fue necesario transformar a *A. tumefaciens* GV2260 con pBinGFPhph, en donde se empleó una técnica de transformación por competencia química usando CaCl₂. Para la selección de transformantes, *A. tumefaciens* se sembró en medio adicionado con rifampicina (Rif) y kanamicina (Kan), pues *A. tumefaciens* GV2260 contiene un marcador cromosomal de selección que otorga resistencia a Rif, mientras que el antibiótico de selección bacteriana de pBinGFPhph es Kan. Posteriormente se realizó una PCR de colonia empleando oligonucleótidos específicos para amplificar una sección del gen de la EGFP, donde se obtuvo un amplicón de 603 pb que es el tamaño esperado (Figura 13), confirmando así la transformación de *A. tumefaciens* GV2260 con pBinGFPhph.

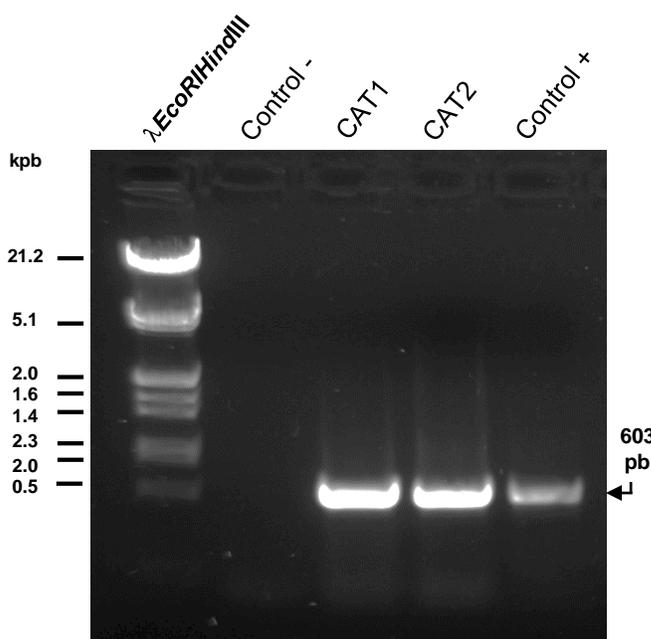


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de colonia de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 transformada con pBinGFPhph empleando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la EGFP. En el primer carril se muestra el marcador molecular λ EcoRIHindIII. En el segundo carril (Control -) se cargaron 5 μ L de una PCR sin agregar cadena molde. En el tercer y cuarto carril (CAT1 y CAT2) se cargaron 5 μ L de las PCR de dos colonias candidatas resistentes a Rif y Kan elegidas al azar, obtenidas de la resiembra en medio de selección, en donde se observa un amplicón de aproximadamente 603 pb. En el quinto carril (Control +) se cargaron 5 μ L de una PCR en la que se emplearon 10 ng de pBinGFPhph como molde, donde se observa un amplicón de aproximadamente 603 pb.

7.3.3 Transformación de conidias con *A. tumefaciens*

Después de transformar *A. tumefaciens* GV2260 con el plásmido pBinGFPhp, se procedió a realizar los ensayos de ATMT, para los cuales se realizaron co-cultivos de conidias recién cosechadas con distintas cantidades de *A. tumefaciens* GV2260 transformado con pBinGFPhp en M-LB líquido adicionado con acetosiringona para promover la expresión de los genes *vir* de *A. tumefaciens*. Los ensayos realizados para *A. fumigatus* A2.PL.1 fueron exitosos y se obtuvieron colonias resistentes a HygB (120 µg/mL) en la mayoría de las condiciones probadas, como las mostradas en la figura 14. La condición más eficiente fue aquella en la cual se co-cultivó por 48 h empleando 200 µL de una suspensión de *A. tumefaciens* con una densidad DO_{660nm} de 0.6 (Figura 15). Para verificar el correcto funcionamiento del antibiótico de selección se emplearon controles en donde se llevó a cabo el protocolo descrito para cada condición probada sin agregar *A. tumefaciens* transformado con pBinGFPhp, en todos los controles de antibiótico no hubo crecimiento de colonias fúngicas lo cual indicó un correcto funcionamiento del antibiótico.



Figura 14. Colonias de *A. fumigatus* A2.PL.1 resistentes a HygB (120 µg/mL) obtenidas en los ensayos de transformación de conidias mediante *A. tumefaciens* GV2260. Control de antibiótico (1) y ejemplos de colonias transformadas (2-5). Las fotografías fueron tomadas a 5 días de incubación.

En la literatura se menciona que el éxito de este método depende en gran medida de la relación que existe entre la cantidad de *A. tumefaciens* y de conidias, pues un exceso o una deficiencia en cualquiera de las dos variables puede disminuir dramáticamente la frecuencia de transformación (Zhang *et al.*, 2011). Esto se observó en los co-cultivos de 48 h, donde al aumentar la cantidad de *A. tumefaciens* se afectó de manera importante el proceso, como se puede observar de forma clara al emplear 500 y 600 µL de la

suspensión de *A. tumefaciens*, mientras que, al realizar los co-cultivos a 72 h, la mayor frecuencia se presentó agregando 600 μL de una suspensión de *A. tumefaciens* con una $\text{DO}_{660\text{nm}}$ de 0.6 (Figura 15).

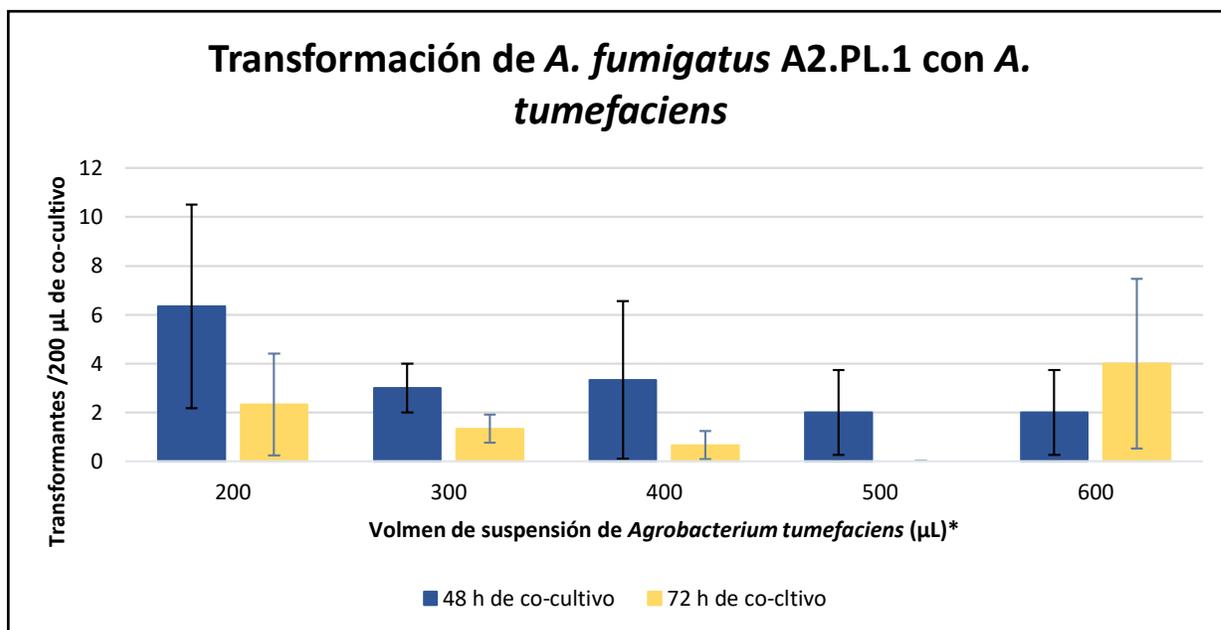


Figura 15. Transformantes obtenidos por 200 μL de co-cultivo en función de la cantidad de suspensión de *A. tumefaciens* ($\text{DO}_{660\text{nm}}$ de 0.6) agregada. Se muestran los resultados obtenidos para los dos tiempos de co-cultivo probados, 48 h en azul y 72 h en amarillo. La mayor cantidad de transformantes obtenidos se logró incubando a 48 h con 200 μL de suspensión de *A. tumefaciens*. La mayor cantidad de transformantes obtenidas co-cultivando 72 h se logró agregando 600 μL de la suspensión de *A. tumefaciens*. La concentración de acetosiringona empleada para todos los ensayos realizados fue 300 μM y la temperatura de co-cultivo fue de 25 $^{\circ}\text{C}$. Para cada experimento se realizaron 3 repeticiones. *Los volúmenes fueron obtenidos a partir de una suspensión de *A. tumefaciens* en medio LB a $\text{D.O.}_{660\text{nm}}$ de 0.6.

Las pruebas realizadas para *C. tenuissimum* A2.PP.5, *C. tenuissimum* A3.I.1 y *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 resultaron negativas para todas las condiciones probadas, este comportamiento se pudo deber a que la relación entre la concentración de conidias con la cantidad de *A. tumefaciens* no fue la adecuada, o bien a que la cepa de *A. tumefaciens* empleada (GV2260) no es compatible con las cepas de hongos que se deseaban transformar. En la literatura se ha reportado que la cepa de *A. tumefaciens* que se emplea para los ensayos de transformación es de suma importancia (McClelland y Wickes, 2009; Krishnamohan *et al.*, 2001), pues dependiendo del plásmido Ti que ésta

porte, así como del contexto cromosomal, se puede conferir una determinada especificidad para poder infectar ciertos huéspedes. Hasta el momento solo se ha reportado un caso en donde se logró transformar a un hongo del género *Cladosporium* empleando *A. tumefaciens* LBA4404 (Zhang *et al.*, 2011), cepa que deriva de *A. tumefaciens* TiAch5 y que posee al plásmido pAL4404, el cual es un derivado del plásmido Ti. En reportes anteriores se ha observado que *A. tumefaciens* LB4404 y GV2260 poseen diferencias muy marcadas en cuanto a su especificidad para infectar determinados hongos filamentosos (Nakamura *et al.*, 2012), por lo cual muy probablemente esta es la razón de los resultados negativos.

7.4 PCR de colonia de los transformantes obtenidos

Para comprobar la transformación de las colonias de *A. fumigatus* A2.PL.1 resistentes a HygB obtenidas por transformación mediada por *A. tumefaciens* (ATMT), se realizó PCR a cinco colonias elegidas al azar. La electroforesis en gel de agarosa al 1% reveló la presencia de un amplicón de aproximadamente 603 pb, correspondiente a la presencia del gen de la EGFP en todas las colonias probadas, siendo éste el tamaño esperado (Figura 16), como control negativo se realizó una PCR a una colonia silvestre, donde no se observó ningún amplicón (Figura 17) confirmando así la transformación de dichas colonias con pBinGFPhph. Las diferencias en la intensidad de los amplicones obtenidos en las PCR de colonia se pudo deber a que la alícuota que se tomó como cadena molde, al ser de extracto celular, contenía una gran variedad de componentes que pudieron bajar la eficiencia de la reacción, anteriormente ya ha sido reportado la presencia de compuestos que pueden generar estos resultados en PCR de colonia de hongos filamentosos (Zhou *et al.*, 2000). Por otro lado, las condiciones de PCR probadas fueron estandarizadas para emplear como cadena molde a pBinGFPhph, cuya longitud y complejidad es mucho menor que el DNA genómico que se emplea para las PCR de colonia, lo cual también pudo afectar la eficiencia de la reacción.

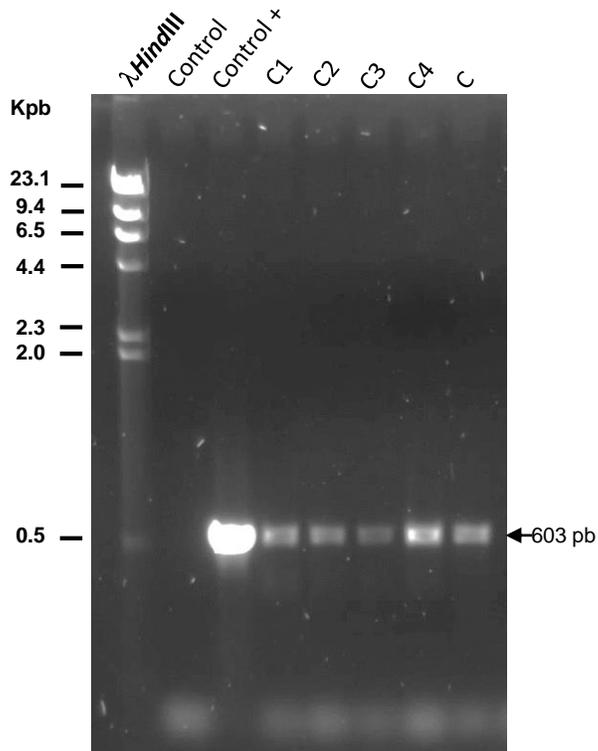


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR de las colonias transformadas de *A. fumigatus* A2.PL.1 por ATMT, empelando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la EGFP. En el primer carril se observa el marcador molecular λ HindIII. En el segundo carril (Control -) se cargaron 5 μ L de una PCR donde no se agregó cadena molde. En el tercer carril (Control +) se cargaron 5 μ L de una PCR donde se agregaron 10 ng de pBinGFPph como cadena molde, en donde se observó un amplicón de aproximadamente 603 pb. Del carril 4 al 8 (C1-C5) se cargaron 5 μ L de una PCR de 5 colonias de *A. fumigatus* A2.PL.1 resistentes a HygB obtenidas por ATMT, en donde se observan amplicones de aproximadamente 603 pb.

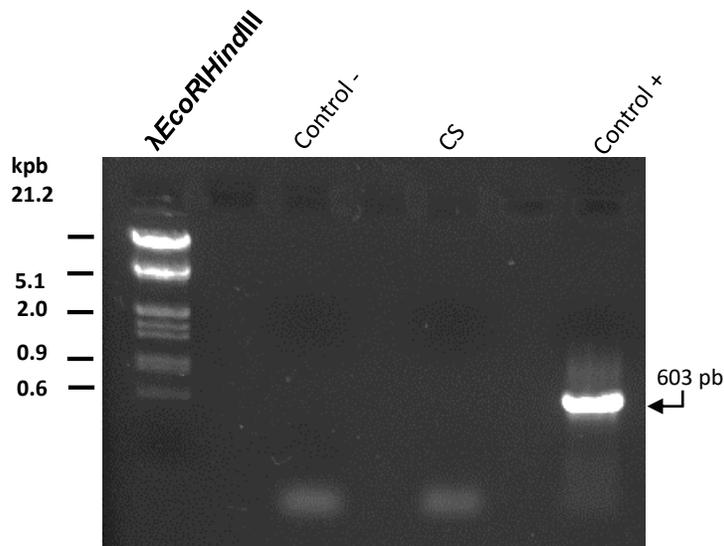


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR de una colonia silvestre de *A. fumigatus* A2.PL.1 empleando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la EGFP. En el carril 1 se observa el marcador molecular λ EcoRIHindIII. En el carril 3 (Control -) se agregaron 5 μ L de una PCR donde no se agregó cadena molde. En el carril 5 (C5) se agregaron 5 μ L de una PCR de una colonia silvestre, en donde no se observa ningún amplicón. En el carril 7 (Control +) se agregaron 5 μ L de una PCR donde se agregaron 10 ng de pBinGFPph como cadena molde, en donde se observa un amplicón de aproximadamente 603 pb.

7.5 Detección de la expresión de la EGFP por microscopía de fluorescencia y confocal

Como ya se había mencionado en la sección de materiales y métodos, el plásmido empleado en los ensayos de transformación contiene como gen reportero que codifica a la EGFP, una proteína variante de la GFP. La EGFP al ser excitada, presenta fluorescencia verde con un pico de emisión máximo a 510 nm (Spiess *et al.*, 2005). Para detectar la expresión de la EGFP se observaron microcultivos de las colonias transformadas de *A. fumigatus* A2.PL.1 en un microscopio de epifluorescencia empleando un filtro de excitación con un ancho de banda de 435-495 nm y un filtro de emisión de 530 nm. Todas las muestras transformadas presentaron fluorescencia, sin embargo, el control empleado que consistió en un microcultivo de *A. fumigatus* A2.PL.1 silvestre, también la presentó (Figura 18), por lo cual, con esta técnica no se pudo corroborar la presencia de la EGFP en el tejido fúngico. La fluorescencia verde por parte de hongos del género *Aspergillus* ya ha sido reportada (Sung-Yan *et al.*, 2009), y se sabe que este fenómeno es multifactorial ya que puede deberse a la presencia de otro tipo de moléculas como la aflatoxina G1, que se puede llegar a expresar en *A. fumigatus* (Pepeljnjak *et al.*, 2004; Ismail *et al.*, 2016) y presenta fluorescencia verde al ser excitada entre 300 y 440 nm (Cole y Cox, 1981).

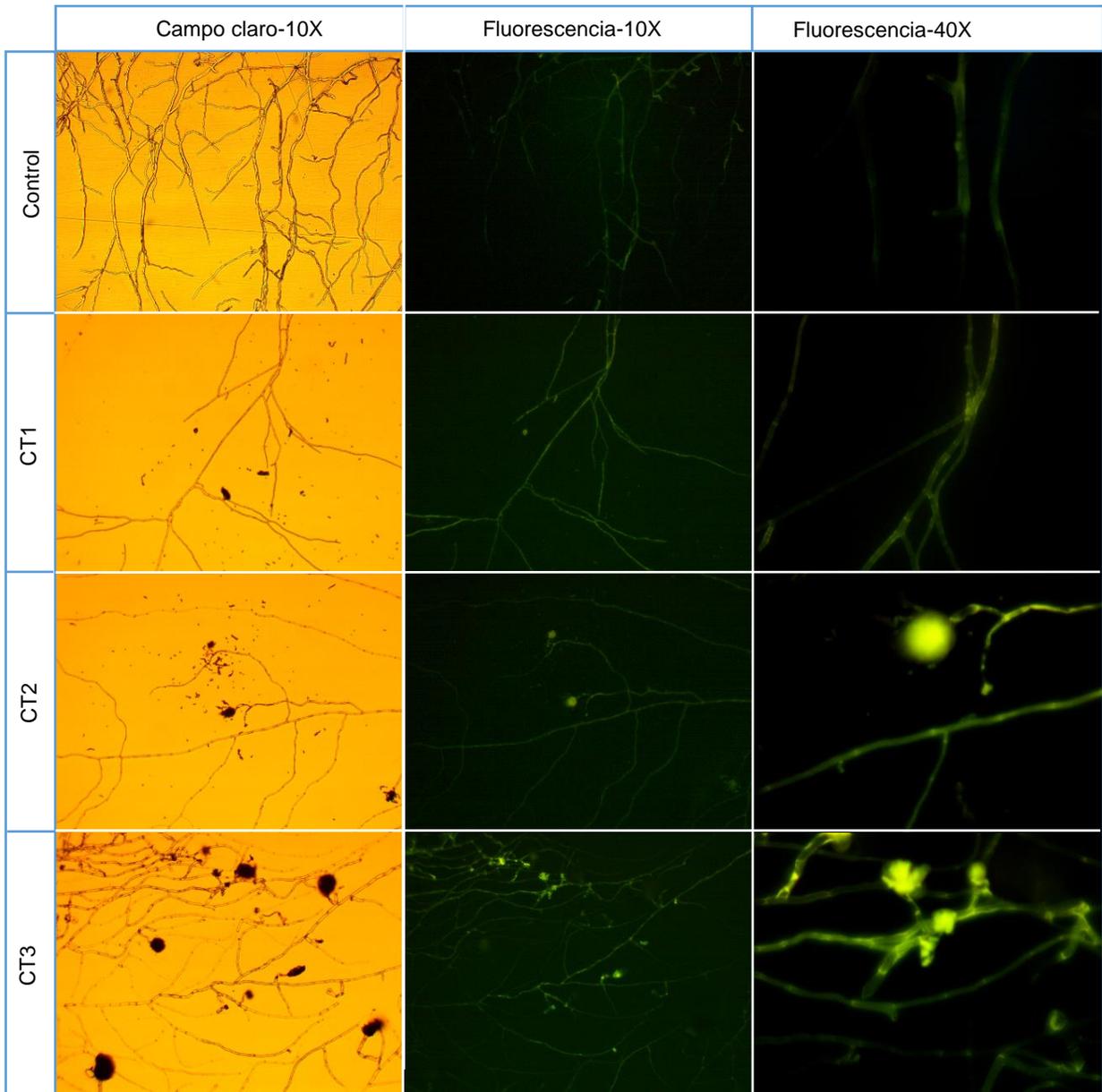


Figura 18. Detección de la EGFP en las colonias de *A. fumigatus* A2.PL.1 transformadas con pBinGFP_{hph} empleando microscopía de fluorescencia. Se presentan fotografías de microscopía de campo claro a 10X, microscopía de fluorescencia a 10X y 40X empleando un filtro de 435-495 nm. El control representa un microcultivo de una colonia silvestre de *A. fumigatus* A2.PL.1; CT1-CT3 representan microcultivos de colonias de *A. fumigatus* A2.PL.1 transformadas con pBinGFP_{hph}.

Para diferenciar la autofluorescencia presentada por la cepa silvestre de *A. fumigatus* A2.PL.1 de la expresión de la EGFP, se observaron microcultivos de una colonia silvestre y de dos colonias transformadas con pBinGFPhph en un microscopio confocal empleado un láser diodo de 473 nm, para así reducir el ancho de banda evitando la excitación de otras moléculas que provoquen la autofluorescencia verde en el tejido fúngico y poder observar solamente la fluorescencia generada por la EGFP. Se observó que el control, un microcultivo de una colonia silvestre, no presentó fluorescencia mientras que los microcultivos de las colonias transformadas si la presentaron (Figura 19), confirmando así la expresión de la EGFP en las colonias transformadas.

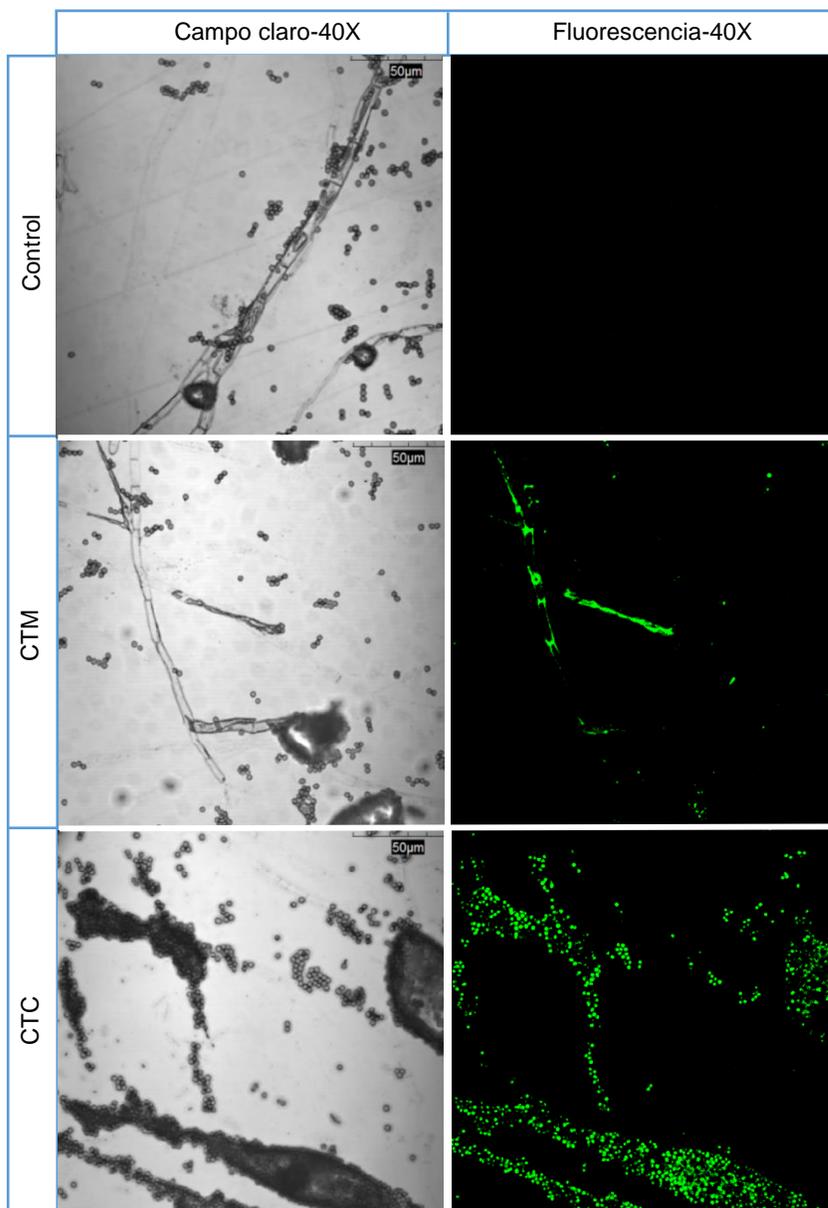


Figura 19. Detección de la EGFP en las colonias de *A. fumigatus* A2.PL.1 transformadas con pBinGFPhph empleando microscopía confocal. Se presentan fotografías de microscopía de campo claro a 40X y de fluorescencia a 40X empleando un láser diodo de 473 nm. El Control corresponde a un microcultivo de una colonia silvestre de *A. fumigatus* A2.PL.1. CTM y CTC corresponden a microfotografías de micelio y conidias correspondientemente de microcultivos de una colonia de *A. fumigatus* A2.PL.1 transformada con pBinGFPhph.

7.6 Transformación de conidias empleando ondas de choque

Dado que empleando transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* únicamente se logró transformar a *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1, se procedió a usar protocolos de transformación mediada por ondas de choque para las cepas para las cuales aún no se había determinado un protocolo efectivo de transformación, es decir *C. tenuissimum* A2.PP.5, *C. tenuissimum* A3.I.1 y *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1. Se decidió probar este método con base en los reportes existentes donde se menciona que este método resulta efectivo para transformar una amplia variedad de hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei* entre muchos otros (Magaña-Ortíz, 2013). Sin embargo, a pesar de que se probaron tres condiciones para cada cepa, en ningún caso se logró obtener transformantes (Figura 20). Probablemente la concentración de conidias usada o la cantidad de ondas de choque empleadas en los ensayos pudo ser el parámetro que afectó los resultados obtenidos, pues se ha reportado que cada hongo tiene un intervalo en el que es susceptible a transformarse por ondas de choque, siendo algunos rangos muy limitados, fuera de los cuales la eficiencia de transformación declina de manera abrupta (Magaña-Ortíz, 2013). El intervalo de susceptibilidad a ondas de choque para cada hongo probablemente depende del grosor, estructura y/o composición química de la pared celular (Magaña-Ortíz, 2013). En todos los controles de crecimiento, hubo desarrollo fúngico demostrando que el tratamiento no afectó a las conidias expuestas a las ondas de choque. Respecto a los controles de antibiótico, en ninguno hubo presencia de crecimiento fúngico demostrando un correcto funcionamiento del antibiótico empleado.

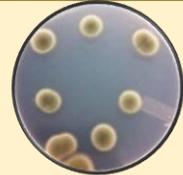
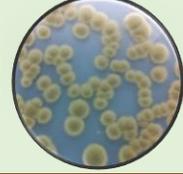
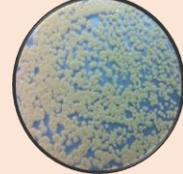
Cepa	Control de crecimiento	Control de antibiótico	Prueba
<i>C. tenuissimum</i> A3.I.1			
<i>C. tenuissimum</i> A2.PP.5			
<i>C. pseudocladosporioides</i> T1.PL.1			

Figura 20. Resultados representativos de los ensayos de transformación por ondas de choque. Las imágenes presentadas son de los resultados obtenidos empleando 350 ondas de choque. Control de crecimiento: Representa los resultados obtenidos al no agregar pBinGFPhp durante el tratamiento sembrando en medio mínimo glucosa (MM-G). Control de antibiótico: Representa los resultados obtenidos al no agregar pBinGFPhp durante el tratamiento sembrando en MM-G con HygB a la CMI correspondiente para cada hongo. Prueba: Representa los resultados obtenidos al agregar pBinGFPhp durante el tratamiento sembrando en MM-G HygB a la CMI correspondiente para cada hongo.

7.7 Resumen de resultados

De todos los protocolos probados, el único por el cual se logró obtener transformantes fue la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), la cual fue efectiva únicamente para *A. fumigatus* A2.PL.1 (Tabla 6). Respecto a los protocolos basados en métodos físicos de transformación no lograron obtener resultados positivos (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de los métodos de transformación probados. Método en donde se lograron obtener transformantes (Positivo); método en donde no se lograron obtener transformantes (Negativo) y método que no fue probado (N/P).

Cepa \ Método empleado	Electroporación de conidias germinadas	Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Transformación mediada por ondas de choque
<i>A. fumigatus</i> A2.PL.1	Negativo	Positivo	N/P
<i>C. pseudocladosporioides</i> A2.PP5	Negativo	Negativo	Negativo
<i>C. tenuissimum</i> A3.I.1	Negativo	Negativo	Negativo
<i>C. tenuissimum</i> T1.PL.1	Negativo	Negativo	Negativo

8. Conclusiones

- Se probaron protocolos de transformación genética empleando electroporación de conidias germinadas y transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) para *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1, *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5, *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 y *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1 en donde solo se logró transformar *A. fumigatus* A2.PL.1 empleando un método de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* GV2260.
- Para el caso de *C. tenuissimum* A2.PP.5, *C. tenuissimum* A3.I.1 y *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 se probó un protocolo de transformación genética mediada por ondas de choque, sin embargo ninguno de los hongos se lograron transformar bajo las condiciones probadas.

9. Perspectivas

- Probar otras condiciones para los protocolos de transformación empleados en este trabajo para ver si es posible transformar las cepas para las cuales no fue posible establecer un protocolo de transformación genética (*Cladosporium tenuissimum* A2.PP5, *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 y *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1).
 - Para el caso de los ensayos de transformación genética por electroporación de conidias germinadas se sugiere variar la cantidad de plásmido o la concentración de conidias que se emplea en los experimentos.
 - En cuanto a los ensayos de transformación mediada por *A. tumefaciens* se sugiere utilizar otra cepa de *A. tumefaciens* como LB4404.
 - Para los ensayos de transformación mediada por ondas de choque se sugiere probar ensayos usando 200 y 400 ondas de choque, o también disminuir la concentración de conidias a 1×10^4 conidias/mL.
- Clonar en *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1, genes que codifiquen enzimas involucradas con la capacidad de degradar PU, identificadas en nuestro laboratorio como la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1, para mejorar su capacidad degradadora.

10. Referencias

- Alavi-Nikje MM, Bagheri-Garmarudi A, Idris BA. 2011. Polyurethane waste reduction and recycling: from bench to pilot scales. *Des Monom Polym.* 14:395-421.
- Aldabe S, Aramendía P, Lacreu L. 1999. Química I. Fundamentos. Ediciones Colihue. Clasificación de compuestos químicos. pp. 254.
- Álvarez-Barragán J. 2013. Aislamiento e identificación de hongos capaces de degradar poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Álvarez-Barragán J. 2016. Caracterización de la biodegradación de poliuretano por hongos filamentosos e identificación de la enzima extracelular responsable. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Álvarez Barragán J, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, González-Hernández R, Aguilar-Osorio G, Loza-Tavera H. 2016. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *App Environ Microbiol.* 82:5225-5235.
- Amscope. 2015. <http://www.amscope.com/special-microscopes/epi-fluorescence-microscopes.html> . Consultado el 20 de abril del 2017.
- Anil K, Syed S, Sastre-Requena A. 2008. Handbook of membrane separations: Chemical, pharmaceutical, food and biotechnological applications. CRC Press. pp 746-751.
- Barnett HL, Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. APS Press. St. Paul Minnesota. USA. pp. 218.
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW. 2010. The genus *Cladosporium*. *Studies in mycology, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.* 72:1-407.
- Binns A. 2002. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. *Trends Plant Sci.* 7:231-233.
- Chakraborty BN, Patterson NA, Kapoor M. 1991. An electroporation-based system for high efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Can J Microbiol.* 37:858-863.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802-805.
- Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol.* 6:325-330.
- Chow-Pangtay S. 1987. Petroquímica y sociedad. Polímeros derivados del petróleo. Fondo de cultura económica. Capítulo X: Polímeros derivados del petróleo. pp 69.
- Christie P. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: A paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol.* 179:3085-3094.
- Chilton WS, Tempé J, Matzke M, Chilton M. 1984. Succinamopine: a new crown gall opine. *J Bacteriol.* 157:357-362.
- Cole J, Cox R. 1981. Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press Inc. pp. 25-26.
- Cormack P, Bertram G, Egerton M, Gow N, Falkow S, Brown A. 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP), a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology.* 143:303-311.

- Cortés-Espinosa D, Absalón Á, Sánchez N, Loera O, Rodríguez-Vázquez R, Fernández F. 2011. Heterologous expression of manganese peroxidase in *Aspergillus niger* and its effect on phenanthrene removal from soil. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 21:120-129.
- Crabbe JR, Campbell JR, Thompson L, Walz SL, Shultz WW. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int Biodeterior Biodegrad*. 33:103-113.
- Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *App Environ Microbiol*. 16:900-905.
- Davenport D y Nicol J. 1955. Luminescence in hydromedusae. *Proc R Soc London Ser B*. 144:399-411.
- Du W, Huang Z, Flaherty J, Wells K, Payne G. 1999. Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*. 65:834-836.
- Fallon K, Juvvadi P, Richards A, Vargas-Muñoz J, Renshaw H, Steinbach W. 2015. Characterization of the FKBP12-encoding genes in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*. 10:9.
- Graf B, Göbel U, Adam T. 1998. Qualitative and quantitative studies of autofluorescence in fungi. *Mycoses*. 41:39-46.
- Gómez-Lim M, Magaña-Ortiz D, Fernández F, Loske A. 2015. Transformation of fungi using shock waves. *Fung Biol*. 1:209-219.
- Grant S, Jessee J, Bloom F, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:4645-4649.
- Guo M, Zhu X, Li H, Tan L, Pan Y. 2016. Development of a novel strategy for fungal transformation based on a mutant locus conferring carboxin-resistance in *Magnaporthe oryzae*. *AMB Express*. 6:57.
- Haas J, Park E, Seed B. 1996. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol*. 6:315-324.
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H. 2000. Technical focus: A guide to *Agrobacterium* binary vectors. *Trends Plant Sci*. 5:446-451.
- Hinrikson HP, Hurst SF, De Aguirre L, Morrison CJ. 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. *Med Mycol*. 43:S129-37.
- De Cleene M, De Ley J. 1976. The host range of crown gall. *Bot Rev*. 42:389-466.
- Howard GT. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 40: 245-252.
- Ismail A, Riaz M, Levin R, Akhatar S, Gong YY, Hameed A. 2016. Seasonal prevalence level of aflatoxin M1 and its estimated daily intake in Pakistan. *Food Control*. 60:461-465.
- Lee LY, Gelvin S. T-DNA vectors and systems. *Plant Physiol*. 146:325-332.
- Lorang J, Tuori R, Martinez J, Sawyer T, Redman R, Rollins J, Wolpert T, Johnson K, Rodriguez R, Dickman M, Ciuffetti L. 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *App Environ Microbiol*. 67:1987-1994.

- Kain S. 1999. Enhanced variants of the green fluorescent protein for greater sensitivity, different colours and detection of apoptosis. In: Mason W. Fluorescent and luminescent probes for biological activity. Academic Press. 2da edición. pp. 289.
- Kaminskyj S. 2001. Fundamentals of growth, storage, genetics and microscopy of *Aspergillus nidulans*. Fung Genet Newsl. 48:25-31.
- Kay M, Morton L, Prince E. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. Inter Biodet. 27:205-222.
- Kothe, G.O. and Free, S.J. 1996. Protocol for the electroporation of *Neurospora spheroplasts*. Fungal Genet Newsl 43:31-33.
- Krishnamohan A, Balaji L, Veluthambi K. 2001. Efficient *vir* gene induction in *Agrobacterium tumefaciens* requires *virA*, *virG* and *vir* box from the same Ti plasmid. J Bacteriol. 183:4079-4089.
- Magaña-Ortíz D. 2010. Desarrollo de un nuevo método de transformación genética en el reino fungi. Tesis de maestría. CINVESTAV. IPN.
- Magaña-Ortíz D, Coconi-Linares N, Ortíz Vázquez E, Fernández F, Loske A, Gómez-Lim M. 2013. A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. Fung Genet Biol. 56:9-16.
- McClelland C, Wickes B. 2009. *Agrobacterium tumefaciens* as molecular tool for the study of fungal pathogens. In: Rai M, Bridge P. Applied Mycology. CAB International. pp. 244-246.
- McKenna S, Hull T. 2016. The fire toxicity of polyurethane foams. Fire Sci Rev 5: 3:1-27.
- Meier-Westhues U. 2007. Polyurethanes: Coatings, adhesives, and sealants. Vincentz Network. pp. 47-49.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS Microbiol Lett. 129:39-42.
- Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethane. Appl Microbiol Biotechnol. 51:134-140.
- Nakamura M, Kuwahara H, Onoyama K, Iwai H. 2012. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for investigating pathogenicity genes of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum sansevieria*. Curr Microbiol. 65:176-182.
- Oceguera C, Carrillo G, López N, Bolaños N, Cruz G, Wachter C, Loza, T. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. Appl Environ Microbiol. 73:6214-6223.
- Ozeki K, Kyoya F, Hizume K, Kanda A, Hamachi M, Nunokawa Y. 1994. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. Biosci Biotech Biochem. 58:2224-2227.
- Pepeljnjak S, Slobodnjak Z, Segvic M, Peraica M, Pavlovic M. 2004. The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins. Hum Exp Toxicol. 23:15-19.
- Pitzschke A, Hirt H. 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. EMBO J. 29:1021-1032.

- Prasher D, Eckenrode V, Ward W, Prendergast F, Cormier M. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111:229-233.
- Rasmus J, Normand F. 2015. *Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformation. In: van den Berg M, Marutachalam K. Genetic transformation systems in fungi. Springer. pp 143-162.
- Relić B, Andjelković M, Rossi L, Nagamine Y, Hohn B. 1998. Interaction of the DNA modifying proteins virD1 and virD2 of *Agrobacterium tumefaciens*. Analysis of subcellular localization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:9105-9110.
- Rivera A, Magaña-Ortíz D, Gómez Lim M, Fernández F, Loske A. 2014. Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Phys Life Rev*. 11:184-203.
- Robinson M, Sharon A. 1999. Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* by electroporation of germinated conidia. *Curr Genet*. 36:98-104.
- Rowe L, Howard G. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodeterior Biodeg*. 50:33-40.
- Ruiz-Díez B. 2002. Strategies for the transformation of fungi of filamentous fungi. *J Appl Microbiol*. 92:189-195.
- Ruiz-Herrera J, Ortíz Castellanos L. 2010. Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res*. 10:225-243.
- Rusell JR, Huang J, Anand P, Kaucera J, Sandoval AG, Dantzler KW, Hickman D, Jee J, Kimovec FM, Koppstein D, Marks DH, Mittermiller PA, Strobel SA. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol*. 77:6076-6084.
- Sánchez O, Aguirre J. 1996. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genetics Newsletter* 43:48-51.
- Shimomura O, Johnson F, Saiga Y. 1962. Extraction purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. 59:223-239.
- Soltani J, van Heusden P, Hooykaas P. 2008. *Agrobacterium* mediated transformation of non plant organisms. In: Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium: From biology to biotechnology*. Springer. pp. 657.
- Sosa M. 1998. Uso de materias primas vegetales para la producción de materiales de construcción. *Inf Tecnol*. 9:380.
- Spellig T, Bottin A, Kahmann R. 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*. 252:503-509.
- Spiess E, Bestvater F, Heckel-Pompey A, Toth K, Hacker M, Stobrawa G, Feurer T, Wotzlaw C, Berchner-Pfannschmidt U, Porwol T, Acker H. 2005. Two-photon excitation and emission spectra of the green fluorescent protein variants ECFP, EGFP and EYFP. *J Microsc*. 217:200-204.
- Subramoni S, Nathoo N, Klimov E, Yuan Z. 2014. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front Plant Sci*. 5:1-9.
- Sugui J, Chang Y, Kwon-Chung K. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Appl Environ Microbiol*. 71:1798-1802.

- Song-Jan L, Hsin-Yuan T, Chien-Jui K, Ruei-Jr W, Wei-Liang C, Shiou-Hwa J, Cheng-Yuan D. 2009. Multiphoton autofluorescence spectral analysis for fungus imaging and identification. *Appl Phys Lett*. 95:043703-1 - 043703-3.
- Tsuji G, Fujii S, Fujihara N, Hirose C, Tsuge S, Shiraishi T, Kubo Y. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *J Gen Plant Pathol*. 69:230-239.
- Zhang X, Xia L. 2017. Expression of *Talaromyces thermophiles* lipase gene in *Trichoderma reesei* by homologous recombination at the *cbh1* locus. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 44:377-385.
- Zhang P, Liu T, Zhou P, Li S, Yu L. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr Microbiol*. 62:1315-1320.
- Zhong Y, Wang X, Wang T, Jiang Q. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 73:1348-1354.
- Zhou G, Whong W, Ong T, Chen B. 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low level fungi in an indoor environment. *Mol Cell Probes* .14:6:339-348.

11. Anexos

11.1 Formulación de medios de cultivo

Medio papa dextrosa agar (PDA)

Para preparar 1 L

Papa de cáscara blanca	250 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa.
2. Hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 min.
3. Filtrar por 5 capas de gasa.
4. Reponer el agua perdida para obtener 1 L, dividir en alícuotas de 250 mL.
5. Agregar 5 g de agar y 5 g de dextrosa por cada 250 mL, después de haber aforado.
6. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Para preparar placas de PDA el medio se debe verter ya estéril y tibio sobre las cajas de Petri estériles desechables, evitando la presencia de grumos. Se deja enfriar y solidificar por aproximadamente 20 minutos, se tapan y se invierten. Este procedimiento se realiza en condiciones de asepsia.

Medio Luria Bertani (LB)

Para preparar 1 L

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

1. Disolver todos los componentes en el orden que se indica en 700 mL de agua desionizada.
2. Cuando la solución esté totalmente homogénea aforar a 1 L con agua desionizada estéril.
3. Dividir en alícuotas de 250 mL. Para realizar medio sólido agregar 4 g de agar por alícuota.
4. Ajustar a pH 7.0 con HCl concentrado.
5. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Para preparar placas de M-LB sólido el medio se debe verter ya estéril y tibio sobre cajas de Petri estériles desechables, evitando la presencia de grumos. Se deja enfriar y solidificar por aproximadamente 20 minutos, se tapan y se invierten. Este procedimiento se realiza en condiciones de asepsia.

Medio YPG

(Basado en el medio preparado por Cortés-Espinoza *et al.*, 2012)

Para preparar 100 mL

Extracto de levadura	0.3 g
Peptona	1.0 g
Glucosa	2.0 g

1. Disolver todos los componentes en el orden que se indica en 70 mL de agua desionizada.
2. Cuando la solución esté totalmente homogénea aforar a 100 mL con agua desionizada.
3. Ajustar a pH 4.5 con HCl concentrado.
4. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Solución Tris 100 mM

(Basado en el medio preparado por Cortés-Espinoza *et al.*, 2012)

Para preparar 100 mL

Tris-HCl	1.57 g
----------	--------

1. Disolver en 70 mL de agua desionizada.
2. Cuando la solución esté totalmente homogénea aforar a 100 mL con agua desionizada.
3. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Amortiguador YED-H

(Basado en el medio preparado por Cortés-Espinoza *et al.*, 2012)

Para preparar 100 mL

Glucosa	1.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
HEPES	0.5 g

1. Disolver todos los componentes en el orden que se indica en 70 mL de agua desionizada.
2. Cuando la solución esté totalmente homogénea aforar a 100 mL con agua desionizada.
3. Ajustar a pH 8.0 con una solución Tris 100 mM.
4. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Amortiguador de electroporación

(Basado en el medio preparado por Cortés-Espinoza *et al.*, 2012)

Para preparar 100 mL

Tris	0.15 g
Sacarosa	9.23 g
Acetato de Litio	1.51 g

1. Disolver todos los componentes en el orden que se indica en 70 mL de agua desionizada.
2. Cuando la solución esté totalmente homogénea aforar a 100 mL con agua desionizada.
3. Ajustar a pH 7.5 con una solución HCl concentrado.
4. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Medio YED-S

(Basado en el medio preparado por Cortés-Espinoza *et al.*, 2012)

Para preparar 100 mL

Glucosa	1 g
Extracto de levadura	1 g

1. Disolver todos los componentes en el orden que se indica en 70 mL de agua desionizada.
2. Cuando la solución esté totalmente homogénea aforar a 100 mL con agua desionizada.
3. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Solución de elementos traza (1000X)

(Basado en el medio preparado por Kaminskyj, 2001)

Para preparar 100 mL

ZnSO ₄ •7H ₂ O	2.2 g
H ₃ BO ₃	1.1 g
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.17 g
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.16 g
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.15 g
Na ₄ EDTA	5 g

1. En 60 mL de agua desionizada agregar todos los componentes en orden en agitación constante.
2. Hervir y posteriormente dejar enfriar hasta alcanzar una temperatura igual a 60 °C.

3. Ajustar a pH 6.5 con KOH concentrado y dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Aforar a 100 mL empleando agua desionizada estéril.
5. Esterilizar por filtración empleando membranas con un diámetro de poro de 0.45 μm .
6. Almacenar a 4 °C.

Solución de sales (20X)

(Basado en el medio preparado por Kaminskyj, 2001)

Para preparar 1 L

NaNO ₃	120 g
KCl	10.4 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	10.4 g
KH ₂ PO ₄	30.4 g

1. Agregar todos los componentes en 800 mL y aforar a 1 L con agua desionizada.
2. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Solución de tiamina 1%

Para preparar 100 mL

Tiamina	1 g
---------	-----

1. En 50 mL de agua desionizada estéril agregar la tiamina.
2. Una vez disuelta aforar a 100 mL con agua desionizada.
3. Esterilizar por filtración empleando membranas con un diámetro de poro de 0.45 μm .
4. Almacenar a 4 °C.

Medio mínimo glucosa (MM-G)

(Basado en el medio preparado por Kaminskyj, 2001)

Para preparar 1 L

Glucosa	10 g
Solución de elementos traza (1000X)	1 mL
Solución sales de Nitrato (20X)	50 mL
Solución de tiamina 1%	1 mL

1. Disolver la glucosa en 950 mL de agua desionizada.
2. Agregar el resto de los componentes en zona séptica.
3. Ajustar a pH 6.5 con NaOH 1 M.

4. Aforara a 1 L y dividir en alícuotas de 250 mL. Para realizar medio sólido agregar 4.5 g de agar por alícuota.
5. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.

Para preparar cajas de MM-G sólido el medio se debe verter en las cajas Petri cuando aún este tibio, evitando la presencia de grumos, se deja solidificar por aproximadamente 20 minutos y se invierten. Todo debe hacerse en zona aséptica.

11.2 Soluciones y reactivos

Antibióticos

Los antibióticos empleados en este trabajo fueron higromicina B (HygB), kanamicina (Kan), rifampicina (Rif) y gentamicina (Gm). Las soluciones stock para cada antibiótico fueron 50 mg/mL para HygB; 30 mg/mL para Kan; 100 mg/mL para Rif y 20 mg/mL para Gm en agua desionizada. Todas fueron esterilizadas por filtración.

Solución amortiguadora Tris-ácido acético-EDTA (TAE) (1X)

Para preparar 1 L

Tris-HCl	4.84 g
Ácido acético	1.14 mL
Solución EDTA 0.5 M	2 mL

1. Después de agregar todos los reactivos llevar a un volumen final de 1 L.
2. Ajustar a pH 8.0 con HCl concentrado.

Solución amortiguadora de carga para DNA para geles de agarosa (6X)

Para preparar 100 mL

Azul de bromofenol	0.25 g
Xilencianol	0.25 g
Glicerol	30 mL

1. Mezclar el glicerol con 70 mL de agua desionizada.
2. Disolver los colorantes en la solución anterior hasta obtener una solución homogénea.
3. Almacenar en refrigeración a 4 °C.