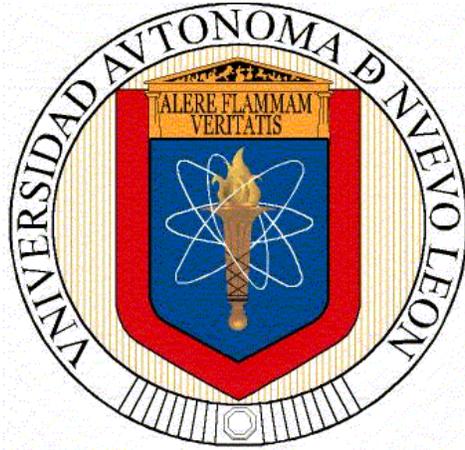


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS  
DE LA PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN DE CEPAS  
DE *BEAVERIA BASSIANA***

**POR**

**MANUEL OTHONIEL LÓPEZ TORRES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN  
MICROBIOLOGÍA**

**JUNIO 2015**

**EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE LA  
PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN DE CEPAS DE *Beauveria bassiana***

**Comité de Tesis**

---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**  
**Director de tesis**

---

**Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores**  
**Secretario**

---

**Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas**  
**Vocal**

---

**Dr. José Alberto Valadez Lira**  
**Vocal**

---

**Dra. María Julissa Ek Ramos**  
**Vocal**

---

**Dra. Gabriela Damas Buenrostro**  
**Asesor Externo**

¿Cómo fijar el momento exacto en el que empieza una historia? Todo ha empezado siempre ya antes, la primera línea de la primera página de toda novela remite a algo que ha sucedido fuera del libro... Hay tanta gente, tantos momentos clave en los que pudiera expresar mi gratitud que no habría espacio en esta tesis para hacerlo.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra por siempre estar atenta y dispuesta, por ser una persona digna de admirar. Trabajadora incansable, por dar todo y aun mas...

Al Doctor Ricardo A. Gómez Flores por ser parte inicial de esta historia, por su gran conocimiento y aporte a este trabajo.

A la Dra. María Magdalena Iracheta Cardenas y a la Dra. María Julissa Ek Ramos, por formar parte de este comité.

A los amigos que fueron maestros para mí, que aparte de brindar sus conocimientos me ofrecieron su Amistad. Por los momentos que pasamos, por enseñarme lo que es ciencia y por creer en mí.

Dr. Jose Alberto Valadez Lira

Dra. Gabriela Damas Buenrostro

Dr. Uziel Castillo Velasquez

Al Mate amargo por las largas jornadas de desvelo y aguante, al Café y su calido sabor, estimulante de reflexion y aprendizaje.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias Biologicas

A la

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Le dedico este trabajo a las personas mas importantes en mi vida, mi familia**

**A mi padre, Manuel López Cuellar**

**A mi madre, Esmeralda Mirtha Torres de la Peña**

A mis hermanos

**Daniel Alberto López Torres**

**Itzel Carolina López Torres**

A mis sobrinas

**Marcela Esmeralda López Lucio**

**Elisa Avigail López Lucio**

**Victoria Carolina López López**

A mis cuñados que son como mis hermanos

**Cecilia Lucio Vidal**

**Alfonso López Zamarripa**

## ÍNDICE GENERAL

|  |     |
|--|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS  | III |
| ÍNDICE DE TABLAS   | IV  |
| LISTA DE ABREVIATURAS                                    | V   |
| RESUMEN  | VI  |
| ABSTRACT   | VII |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                   | 13  |
| <b>2. ANTECEDENTES</b>                                   | 15  |
| <b>2.1 El control Biológico en México</b>                | 16  |
| <b>2.2 Hongos como agentes del control biológico</b>     | 16  |
| <b>2.3 <i>Beauveria bassiana</i></b>                     | 16  |
| <b>2.4 Proceso infeccioso por hongos entomopatógenos</b> | 17  |
| <b>2.5 Caracterización microbiológica</b>                | 18  |
| <b>2.6 Caracterización Molecular</b>                     | 18  |
| 2.6.1 PCR  | 19  |
| 2.6.2 RAPD   | 19  |
| 2.6.3 Oligonucleótidos SCAR                              | 20  |
| 2.6.4 Regiones ITS                                       | 20  |
| 2.6.5 Análisis de intrones                               | 20  |
| <b>3. HIPÓTESIS</b>                                      | 21  |
| <b>4. OBJETIVOS</b>                                      | 22  |
| <b>4.1 General</b>                                       | 22  |
| <b>4.2 Particulares</b>                                  | 22  |
| <b>5. METODOLOGÍA</b>                                    | 23  |

|   |    |
|---|----|
| <b>5.1 Análisis <i>in silico</i></b>  | 23 |
| 5.1.1 Diseño de oligonucleótidos  | 23 |
| 5.1.2 Análisis y comparación de secuencias  | 23 |
| 5.1.3 Secuenciación   | 25 |
| <b>5.2 Análisis <i>in vivo</i></b>  | 25 |
| 5.2.1 Procedencia y datos de las muestras   | 25 |
| 5.2.2 Cultivo del hongo y expresión de enzimas y toxinas  | 26 |
| <b>5.3 Análisis <i>in vitro</i></b>   | 26 |
| 5.3.1 Extracción y purificación de ácidos nucleicos (ADN) de hongos aislados de suelo                 | 26 |
| 5.3.2 Determinación de variabilidad entre cepas de <i>B. bassiana</i> mediante RAPD                   | 27 |
| 5.3.3 Geles de agarosa  | 27 |
| 5.3.4 Amplificación de las regiones ITS   | 27 |
| 5.3.5 Purificación de ADN de los productos de la amplificación de las regiones ITS                    | 28 |
| 5.3.6 Análisis y comparación de secuencias  | 28 |
| 5.3.7 Análisis de intrones  | 29 |
| 5.3.8 Amplificación de intrones por PCR   | 29 |
| 5.3.9 Cultivo de cepas de <i>B. bassiana</i> para la inducción de la expresión de genes de virulencia | 30 |
| 5.3.10 Extracción de ARN  | 31 |
| 5.3.11 RT-PCR   | 32 |
| 5.3.12 PCR para toxinas y enzimas de cepas de <i>B. bassiana</i>                                      | 32 |
| <b>6. RESULTADOS</b>  | 33 |
| 6.1 Determinación de variabilidad entre cepas de <i>B. bassiana</i> mediante RAPD                     | 33 |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.2 Amplificación de las regiones ITS                  | 34        |
| 6.3 Amplificación de transcritos de <i>B. bassiana</i> | 34        |
| 6.4 Secuenciación de las regiones ITS del ADN          | 35        |
| 6.5 Análisis bioinformático                            | 36        |
| 6.6 Análisis de intrones                               | 37        |
| <b>7. DISCUSIÓN</b>                                    | <b>40</b> |
| <b>8. CONCLUSIONES</b>                                 | <b>45</b> |
| <b>9. LITERATURA CITADA</b>                            | <b>46</b> |
| <b>10. RESUMEN BIOGRÁFICO</b>                          | <b>50</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

**Figura 1.** Proceso infeccioso de *Beauveria bassiana* sobre un insecto

**Figura 2.** Proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

**Figura 3.** Diseño general para la construcción de los oligonucleótidos SCAR

**Figura 4.** Representación de la región de búsqueda de intrones

**Figura 5.** Vista general del cultivo de hongos para extracción del material genético

**Figura 6.** Productos de amplificación del ADN por RAPD en cuatro cepas de *Beauveria bassiana* de laboratorio, donde las regiones de ITS se analizaron con las series OPA10, OPA13, OPB09 y OPAB18

**Figura 7.** Productos de amplificación de las regiones ITS de *B. bassiana*

**Figura 8.** Productos de amplificación de transcritos de enzimas y toxinas de *B. bassiana*

**Figura 9.** Árbol filogenético en base a las sustituciones nucleotídicas (x 100) a partir de las secuencias de las regiones ITS amplificadas de *B. bassiana*

**Figura 10.** Análisis de intrones evaluados de un total de 42 aislamientos de *Beauveria bassiana* comparado con la cepa BB38 (33 en la Tabla 5).

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*

**Tabla 2.** Oligonucleótidos de *Beauveria bassiana* seleccionados para la amplificación de intrones

**Tabla 3.** Oligonucleótidos de *Beauveria bassiana* seleccionados para detectar la expresión de transcritos

**Tabla 4.** Porcentaje de identidad de los ITSs entre cepas y aislamientos de *B. bassiana* en base a los datos obtenidos con el programa de análisis de secuencias ClustalW, usando el software DNASTAR

**Tabla 5.** Análisis de intrones

---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

|         |   |
|---------|---|
| ITS     | Espaciadores internos de transcritos  |
| PDA     | Papa Dextrosa Agar  |
| CESAVEG | Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato   |
| PCR     | Reacción en Cadena de la Polimerasa   |
| RAPD    | Amplificación aleatoria de ADN polimórfico<br>( <i>Random Amplificated of Polymorphic DNA</i> ) |
| cm      | Centímetro  |
| d       | Día   |
| °C      | Grado centígrado  |
| h       | Hora  |
| µL      | Microlitro  |
| mg      | Miligramo   |
| mL      | Mililitro   |
| min     | Minuto  |
| M       | Molar   |
| nm      | Nanómetro   |
| rpm     | Revoluciones por minuto   |
| seg     | Segundo   |

## RESUMEN

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se emplea en todo el mundo gracias a su comprobada virulencia y su amplio rango de hospederos. El objetivo de este estudio fue comparar diferentes técnicas clásicas y de biología molecular, con el fin de comparar las diferencias de metabolismo y su adaptación en cepas y aislados de suelos agrícolas de *B. bassiana*, y por otra parte analizar una cepa confirmada como su uso como bioinsecticida (BB38) y la comparación con 42 aislamientos. Con el fin de detectar su prevalencia y diseminación en suelo de campos agrícolas de Guanajuato previamente tratados con bioinsecticidas para control de plagas se desarrolló esta estrategia para asociar dichos marcadores con las cepas de liberación. El ADN extraído de cada aislamiento se amplificó mediante la técnica RAPD-PCR. Al realizar el análisis de las secuencias purificadas de regiones de los transcritos de espaciadores internos (ITS), en conjunto con el ADN amplificado, no se observaron diferencias que pudieran determinar un patrón distintivo. Los resultados de diferenciación usando oligonucleótidos partidores de las series OPA-A, OPA-B y OPA-AB, seleccionados para *B. bassiana*, mostraron que las cepas nativas BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4 y BBPTG6 tuvieron polimorfismos distintivos entre ellas, pero al compararlas contra los 42 aislamientos de suelo, tanto el aislamiento de estudio BB38 como la cepa de referencia GHA (Mycotech) mostraron el mismo patrón que el observado por el aislamiento BBPTG2. Al estudiar la producción de proteasas y de las toxinas beauvericina y basianólido por RT-PCR con oligonucleótidos seleccionados, las 4 cepas nativas amplificaron los transcritos, aunque con la cepa BBPTG6 se observó en general una reducción en la expresión.

Por otra parte, se analizaron los intrones presentes en la subunidad grande del ADN ribosomal (LSU) de los 42 aislamientos de campo frente a los del aislamiento BB38, cuyo patrón permitiera distinguir entre los aislamientos y así determinar prevalencia y diseminación en suelos agrícolas. Mientras que en otro análisis en base a las secuencias de las ITSs se realizó la construcción de un árbol filogenético y se determinó el porcentaje de identidad para evaluar la diferencia genética entre cepas, lo que ayudó a validar los resultados obtenidos previamente y así poder seleccionar marcadores que apoyen a la identidad de las cepas y aislados.

## ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is used worldwide thanks to its proven virulence and its wide host range. In recent years, new techniques using molecular markers have been developed in biology and that have allowed the identification among microorganism isolates from the same genera and specie. The aim of the study was to compare different standard and new molecular biology techniques, in order to determine molecular differences of *B. bassiana* strains, among a selected strain (BB38) and 42 soil isolates from Guanajuato fields, in order to detect the prevalence and spread of specific species.

DNA extracted from each isolate was amplified using the RAPD-PCR technique. When performing sequence analysis of purified transcribed regions of internal spacers (ITS), no differences among the amplified DNA which might establish a distinctive pattern among the isolates tested were observed. Differentiation results of BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4 and BBPTG6 native strains *B. bassiana* using OPA-A, OPA-OPA-B and AB series selected primers, showed distinct polymorphisms among them. When compared against the 42 isolates, BB38 isolate as well as the reference GHA strain (Mycotech) showed the same pattern as that observed by BBPTG2 strain.

By studying the production of proteases, and beauvericin and bassianolid toxins in native strains by PCR transcript amplification using selected primers, the 4 native strains amplified them, but amplification by BBPTG6 was lower. Introns of BB38 present in the large subunit of ribosomal DNA were analyzed. Were compared with the 42 field isolates seeking a pattern to determine its prevalence and spread in soil. Based on obtained ITS sequences, the construction of a phylogenetic tree was made and the percentage identity was determined to evaluate genetic drift between strains, which helped to validate the previously recorded results.

# 1. INTRODUCCIÓN

El control biológico se basa en el uso de organismos vivos para reducir poblaciones de plagas a umbrales económicos aceptables haciendo que estas sean menos abundantes, y por lo tanto menos dañinas. Las plagas de insectos son especies que interfieren con la actividad humana al causar un daño, pérdida o enfermedad a un cultivo, producto almacenado, animales o personas; y el papel del control biológico, es llevar a las poblaciones de insectos plaga a un punto de equilibrio tal que no afecte a la economía del producto (Rafikov *et al.* 2008). Se conoce que hasta el 80% de los agentes etiológicos involucrados en la muerte de insectos son hongos, con aproximadamente 90 géneros, y más de 700 especies. Es por esto, que se ha invertido mucho en investigación y desarrollo de estos agentes entomopatógenos para ser usados dentro del control biológico como bioplaguicidas (Destéfano *et al.* 2004).

*Beauveria bassiana* es un hongo cosmopolita ampliamente distribuido alrededor del mundo, además de ser un entomopatógeno por naturaleza usado en el control de plagas, siendo de los más importantes bioplaguicidas empleados en la actualidad para el combate de una amplia variedad de insectos plaga (Pathan *et al.* 2007). La producción de insecticidas a base de hongos entomopatógenos (micoinsecticidas) es prácticamente simple; sin embargo, su uso como agentes de control biológico depende críticamente de la estandarización de la producción y la estabilidad del bioinsecticida en campo, donde la formulación debe de permitir que los hongos mantengan su viabilidad y virulencia (Destéfano *et al.* 2004). Por ello es de gran importancia evaluar la prevalencia y actividad insecticida de estos agentes en condiciones naturales, para ampliar el conocimiento y establecer estrategias de control más efectivas.

Los métodos clásicos para la identificación de hongos entomopatógenos están basados principalmente en la morfología del conidio, así como de las características bioquímicas y características genéticas. De hecho, las técnicas moleculares son ampliamente utilizadas como herramientas para la identificación y análisis filogenéticos de muchas especies fúngicas, entre las cuales se encuentran la

técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación del ADN. Estas técnicas son particularmente valiosas en aquellos casos en el cual las especies de microorganismos son incapaces de crecer en condiciones de laboratorio (Bindslev *et al.* 2002). Dado que es casi imposible aislar ADN puro de muestras de suelo, es necesario emplear técnicas específicas que nos brinden una opción para resolver esta problemática.

Durante las últimas tres décadas, la biología molecular ha facilitado el estudio de las comunidades microbianas del medio ambiente, que abarca una amplia gama de enfoques para facilitar las investigaciones con la ayuda de la informática haciendo esta labor más rápida, precisa y sensible (Gao y Tao 2012). La variabilidad genética de los hongos entomopatógenos puede ser considerada una gran ventaja en el control microbiano de insectos (Fernandes *et al.* 2009). Para determinar dichas variabilidades pueden utilizarse diferentes marcadores moleculares, los cuales son de gran utilidad en la búsqueda de variaciones entre cepas. Estos son reconocidos como biomarcadores moleculares, los cuales son ampliamente utilizados para la caracterización de variaciones inter e intraespecífica de cepas de *Beauveria* (Fernandes *et al.* 2009). Algunos de los biomarcadores más ampliamente reconocidos se han obtenido a partir del estudio del ADN ribosomal, utilizando técnicas como la de la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPDs) (Pipe *et al.* 1995) y la amplificación de las secuencias ribosomales de diferente longitud (RFLP) y el análisis de los transcritos de espaciadores internos (ITSs: ITS-1, ITS2 y 5.8s) por medio de PCR-RFLP (Williams *et al.* 1990; Neuvéglise *et al.* 1994; Buscott *et al.*, 1996) así como el uso de las técnicas de secuencias simples repetitivas (ISSR) a partir de ADN mitocondrial (Tiago 2011).

En el presente estudio el objetivo principal fue establecer biomarcadores específicos que determinen la prevalencia y diseminación de cepas y aislamientos de entomopatógeno *B. bassiana* mediante el uso de las técnicas de biología molecular. Adicionalmente, hacer un aporte en el conocimiento del hongo y su estabilidad en suelos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El control biológico en México

México es un país con alta diversidad y forma parte de la región mesoamericana que conecta América del Norte y del Sur. Esta situación biogeográfica lo coloca como zona de riesgo a presentar plagas de insectos exóticos invasivos que entran del norte por los Estados Unidos, o del sur por América Central o el Caribe (Williams *et al.* 2013). Por eso, el uso de biopesticidas es de gran importancia para evitar el impacto de las pérdidas económicas derivadas de los insectos y evitar afectar la ecología por el uso indiscriminado de químicos.

### 2.2 Hongos como agentes del control biológico

Hasta el 80% de los agentes para el control biológico involucrados en la muerte de insectos son hongos, que abarcan 90 géneros y más de 700 especies (Destéfano *et al.* 2004; Pal y Gardener 2006).

La producción de micoinsecticidas es muy simple, pero su uso como agentes de control biológico depende de forma crítica de la estandarización de la producción y la estabilidad del bioinsecticida bajo condiciones de campo, donde la formulación debe de permitir que los hongos mantengan su virulencia (Destéfano *et al.* 2004). Por ello es de gran importancia evaluar la prevalencia y actividad de estos agentes en condiciones naturales, para ampliar el conocimiento y hacer un mejor uso de estos.

### 2.3 *Beauveria bassiana*

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* pertenece al Orden de los Hipocreales (Ascomiceta) (Tabla 1) y es un enemigo natural de una gran variedad de insectos y arácnidos de distribución cosmopolita (Meyling y Eilenberg 2007). *B. bassiana* está

registrado como biopesticida y se utiliza en todo el mundo para control biológico de diferentes plagas de insectos. Se sabe que tiene una muy amplia gama de hospederos (~700 especies) pertenecientes a casi todos los órdenes taxonómicos de la clase Insecta (de la Rosa *et al.* 2002; Destéfano *et al.* 2004; Pathan *et al.* 2007).

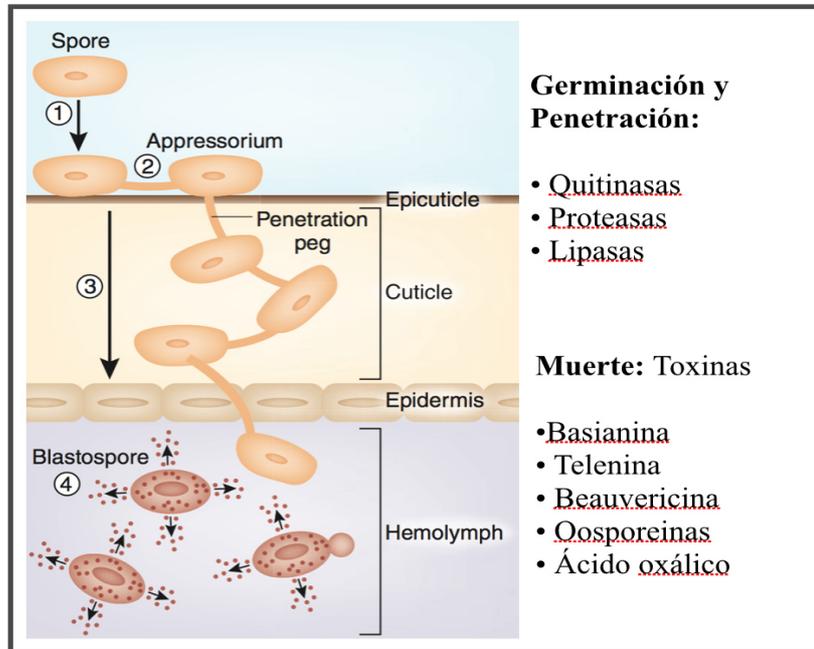
La infección por hongos entomopatógenos inicia por la liberación de una espora germinada generalmente un conidio; estas esporas se dispersan por el aire, la lluvia y otros insectos parasitados para adherirse en la cutícula del insecto para penetrarla y dar origen a una hifa invasora la cual crece en el integumento del insecto y produce esporas y conidios en la superficie del insecto (García-Gutiérrez y Ledezma-Gutiérrez 2009).

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana***

|         |                  |
|---------|------------------|
| Reino   | Fungi            |
| Filo    | Ascomycota       |
| Clase   | Sordariomycetes  |
| Orden   | Hypocreales      |
| Familia | Cordycipitaceae  |
| Género  | <i>Beauveria</i> |
| Especie | <i>bassiana</i>  |

#### 2.4 Proceso infeccioso por hongos entomopatógenos

Durante la invasión, estos hongos comienzan la producción de diferentes sustancias que facilitan su penetración en el insecto huésped (Fig. 1). De hecho, se han caracterizado enzimas y toxinas que están involucradas en los procesos de invasión y virulencia durante el proceso de infección (Pathan *et al.* 2007).



**Figura 1.** Proceso infeccioso de *Beauveria bassiana* sobre un insecto. 1) Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero. 2) Formación del apresorio. 3) Penetración a través de la cutícula. 4) Fase invasiva y liberación de toxinas (tomado de Thomas y Read 2007).

## 2.5 Caracterización microbiológica

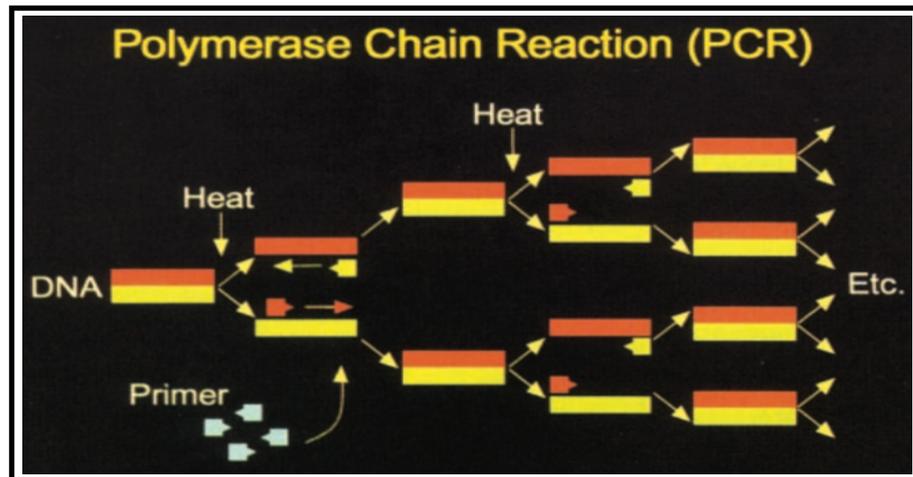
Los métodos clásicos para la identificación de hongos entomopatógenos se basan principalmente en la morfología del conidio, así como de las características bioquímicas y características genéticas.

## 2.6 Caracterización Molecular

Durante los últimos 30 años, las técnicas de biología molecular exploradas por la comunidad microbiana del medio ambiente han abarcado una amplia gama de enfoques para facilitar las investigaciones con la ayuda de la informática, haciendo esta labor más rápida, precisa y sensible (Gao y Tao 2012; Leal-Bertioli *et al.* 2000).

### 2.6.1 PCR

La técnica PCR es ampliamente usada para la detección de secuencias de ADN y ADNc específicas y una de las técnicas más usadas en biología molecular, y se basa en la amplificación enzimática de fragmentos de ADN de manera específica.



**Figura 2.** Proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mark y Joyce 2005).

### 2.6.2 RAPD

La técnica de amplificación al azar de regiones polimórficas de ADN (RAPD) se ha usado durante años para evaluar la variabilidad genética entre organismos. Que han ayudado a la caracterización de cultivos de *B. bassiana*, pudiendo así evaluar los índices de similitud entre hongos de una misma especie (Urtz y Rice 1997). En otros trabajos se han evaluado aspectos de ecología molecular a base de estos marcadores moleculares considerándose una poderosa herramienta para conocer la biología de las poblaciones (Hadrys *et al.* 1992).

### **2.6.3 Oligonucleótidos SCAR.**

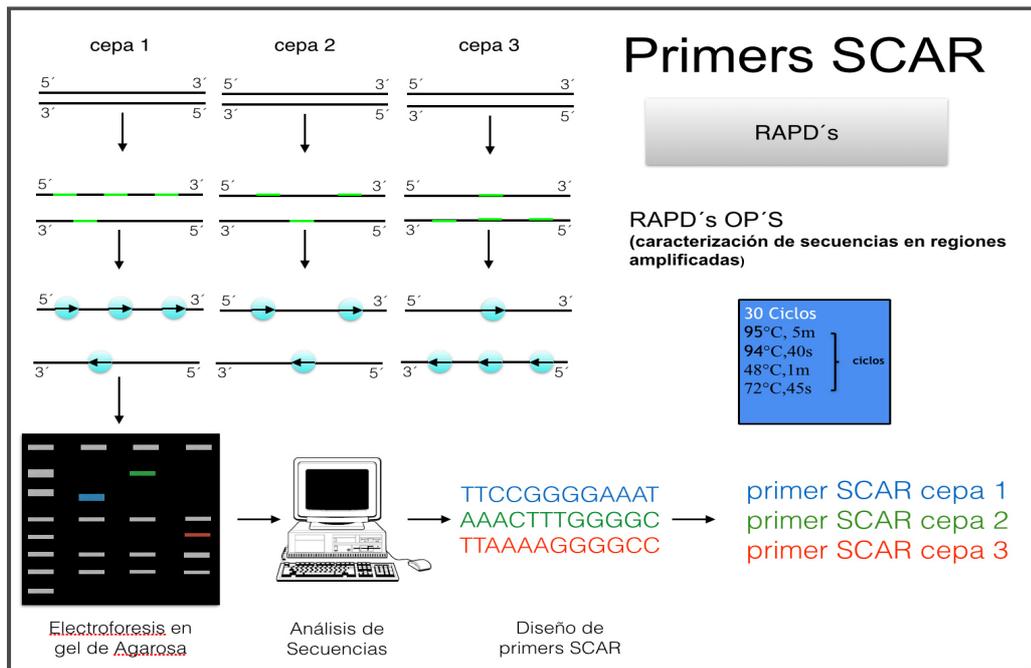
En años recientes, se ha logrado la detección específica de hongos entomopatógenos por medio de marcadores moleculares, tal es el caso de los oligonucleótidos que amplifican regiones con una secuencia característica, conocidos como SCAR por sus siglas en inglés (*sequence-characterized amplified regions*) (Fig. 3). Mediante el empleo de oligonucleótidos SCAR se logró identificar cepas de *B. bassiana* de manera específica (Castrillo *et al.* 2003).

### **2.6.4 Regiones ITSs**

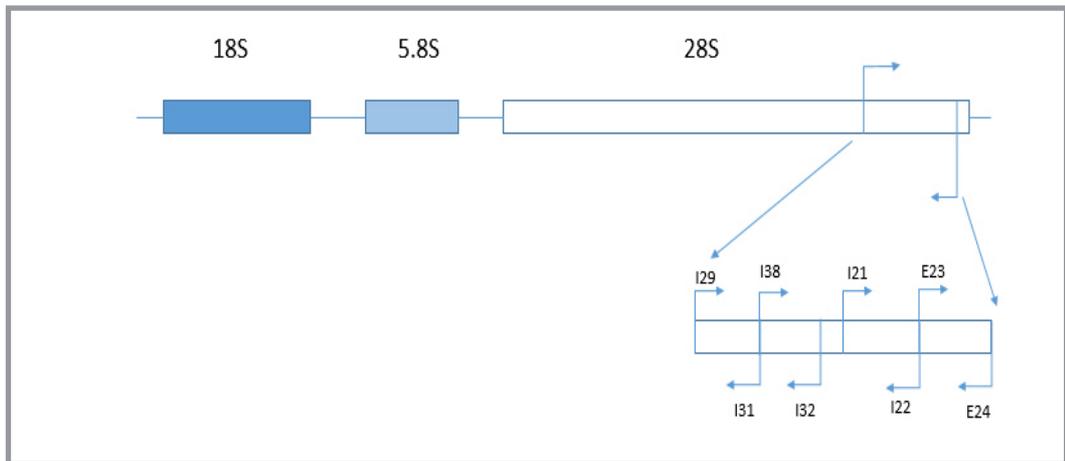
El estudio molecular a base el análisis de los espaciadores internos de transcritos (ITSs: ITS-1, ITS2 y 5.8s) (Fig. 4) por medio secuenciación y PCR-RFLP, se ha usado ampliamente como un marcador para diferenciar entre especies fúngicas (Williams *et al.* 1990; Neuvéglise *et al.* 1994; Buscott *et al.* 1996).

### **2.6.5 Análisis de Intrones**

El ADN ribosómico (ADNr) es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico. Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación y contienen segmentos espaciadores transcribibles y no transcribibles (intrón). El nivel bajo de polimorfismo en la unidad de transcripción de ADNr permite la caracterización de cada especie usando sólo unos pocos ejemplares y hace que este ADN sea útil para la comparación inter específica. Además, las repeticiones de las diferentes regiones de codificación del ADNr muestran distintas tasas de evolución. Como resultado de ello, este ADN puede proporcionar información sobre casi cualquier nivel sistemático. Por lo que en este estudio se llevó a cabo el análisis de los intrones presentes en la subunidad grande del ADN ribosomal (Wang *et al.* 2003) con el fin de demostrar el uso de esta técnica y aplicación como una herramienta molecular que nos ayude a conocer la diseminación de las poblaciones de hongos del género *Beauveria*.



**Figura 3.** Diseño general para la construcción de oligonucleótidos SCAR



**Figura 4.** Representación de la región de búsqueda de intrones

### 3. HIPÓTESIS

Es posible detectar de manera específica la prevalencia de aislamientos y cepas de *Beauveria bassiana* y diferencias de expresión en los genes relacionados a su virulencia por medio de herramientas moleculares.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Evaluar técnicas convencionales y de biología molecular para establecer marcadores moleculares específicos para la detección de la prevalencia y diseminación de un aislamiento de campo de *Beauveria bassiana*.

### 4.2 Objetivos Particulares

- a) Amplificar y secuenciar regiones polimórficas del ADN genómico con la técnica RAPD que marquen diferencias entre regiones ITS de aislamientos de *B. bassiana* por el método de capilaridad de Sanger.
- b) Analizar de los intrones presentes en la subunidad grande del ADN ribosomal y emplearla como marcador específico entre aislamientos y cepas de *B. bassiana*.
- c) Amplificar los transcritos de *beauvericina*, *basianólidos* y *proteasas* de 4 cepas de *B. bassiana* y comprobar su expresión durante su cultivo en medio líquido
- d) Determinar diferencias genéticas entre los aislamientos de *B. bassiana* mediante las secuencias de las regiones ITS obtenidas del ADN ribosomal, y la construcción de un árbol filogenético para evaluar el patrón genético específico entre cepas.

## 5. METODOLOGÍA

En este estudio se evaluaron las técnicas clásicas y nuevas de biología molecular, con el fin de establecer marcadores moleculares específicos de cepas y aislamientos de *B. bassiana* y los análisis se presentan a continuación.

### 5.1 Análisis *in silico*

#### 5.1.1 Diseño de oligonucleótidos

Con la ayuda de las bases de datos genómicos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) se buscaron las secuencias para las regiones de las secuencias internas de transcritos (ITS) de hongos como de los genes que codifican para los transcritos y a partir de ellas hacer un oligonucleótidos de aproximadamente de 19 a 21 nucleótidos, que flanquean una zona de aproximadamente 100 a 120 pb, que fuera altamente específica de la cepa correspondiente, con la ayuda del servidor *Primer Quest* de IDT® (Castrillo *et al.* 2003) lo cual nos ayudó a la construcción de un marcador específico.

#### 5.1.2 Análisis y comparación de secuencias

Dentro de las técnicas utilizadas para observar la diversidad genética entre cepas de hongos entomopatógenos, se encuentra el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y el análisis de los espaciadores internos transcritos (ITS: ITS-1, ITS2 y 5.8s) por medio de PCR. Inicialmente, para la tipificación molecular se seleccionaron cuatro cepas de *B. bassiana* (BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4, BBPTG6) (Genbank accession: KC759728) empleando la técnica de longitud de los fragmentos polimórficos obtenidos con diferentes enzimas de restricción (RFLP) (Aquino de Muro *et al.* 2003).

Posteriormente se sumaron al análisis la cepa BB38 para ser evaluadas por la técnica de RAPD's combinado con espaciadores internos de transcritos (ITSs). Para lograrlo, se cultivaron en placas Petri a 27°C por 5 d en medio PDA. Una vez obtenidos los cultivos, las cepas se inocularon en caldo dextrosa Sabouraud suplementado con extracto de levadura al 1%, a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL. Se incubaron por 72 h a 27°C y 150 rpm para inducir la producción de micelio. Posteriormente, el micelio se maceró con un buffer de suspensión compuesto por: 100 mM Tris; 1,4 M NaCl<sub>2</sub>; 20 mM EDTA; 1% polivinilpirrolidona y 2% del surfactante catiónico bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB) para ayudar a la dispersión homogénea de la muestra, ajustado a un pH= 8,0; a cada muestra se le agregaron 8 µL de proteinasa K. La mezcla se incubó a 65°C durante 60 min y se homogeneizó a intervalos de 10 min. Después las muestras se enfriaron en hielo y se mezclaron con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugaron a 5,000 rpm por 15 min, para la separación de fases; esta etapa se realizó dos veces. Se recuperó el sobrenadante acuoso y se le agregó isopropanol a igual volumen del sobrenadante recuperado, y se incubaron a -20°C por toda la noche para precipitar el ADN. El pellet de ADN se colectó mediante centrifugación, se lavó con alcohol 70% y alcohol absoluto 90% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se diluyó en buffer Tris-EDTA (TE) pH 8,0 al 1x compuesto por: 10 mM Tris Cl (pH 7.4) y 10.6 g de EDTA 1 mM (pH 7.4) para preparar 1-L a 10x. El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría (ADN A<sub>260</sub>), usando un nano-espectrofotómetro Nanolytik® NanoSpec Cube Micro Biophotometer.

El ADN de las cepas se amplificó mediante la técnica RAPD-PCR (Williams *et al.*, 1990). Para esta prueba se utilizaron los oligonucleótidos de las series OPA-A, OPA-B y OPA-AB (Operon Technologies, CA, USA). Las condiciones de amplificación de los RAPDs fueron de 45 ciclos de 1-min a 94°C, 1-min a 45°C y 2 min a 72°C, con un ciclo final de 5 min a 72°C (Termociclador Techne, Touchgene Gradient). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µL que contenían 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 mM del oligonucleótido, 1x de buffer de amplificación de PCR, 1-mM de MgCl<sub>2</sub>, 1-U *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Life Tech.©) y 100 µg de ADN molde en agua ultrapura. Las reacciones se realizaron por triplicado para determinar la consistencia de los patrones. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa (1.5 %) en el buffer 1-x TAE (40

mM Tris acetato, 0.5 mM EDTA, pH =8,0) a 100 V (fuente de poder Thermo Fisher Scientific Inc.). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y posteriormente se visualizaron bajo la luz ultravioleta [fotodocumentador UVP (luz UV)] para su posterior evaluación.

### 5.1.3 Secuenciación.

Por otra parte los amplicones productos del PCR del gen ITS fueron purificados con un kit Wizard® SV Gel and *PCR Clean-Up System*, y secuenciados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, MX.

Las secuencias nucleotídicas secuenciadas se compararon con secuencias reportadas en el Genbank, mediante el programa NBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), generando homología con cepas de *B. bassiana* hasta en un 99%.

## 5.2 Análisis *in vivo*

### 5.2.1 Procedencia de aislamientos de *Beauveria bassiana*

Los aislamientos de *B. bassiana* que se analizaron en este trabajo fueron aislados de suelo de campos agrícolas recolectados en San Lorenzo, municipio de Jerécuaro, Guanajuato (N 20° 1' 47.99" W 100° 29' 32.48") y donados amablemente por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG). Una vez en nuestro laboratorio, los hongos se reactivaron en agar de papa y dextrosa y se comprobó la pureza de los mismos por crecimiento uniforme en placa (Fig. 5) y por observación con un microscopio óptico.



**Figura 5.** Vista general del cultivo de hongos para extracción del material genético.

### 5.2.2 Cultivo del hongo expresión de enzimas y toxinas

A partir del cultivo de las cepas BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4 y BBPTG6 en placas Petri con agar de dextrosa Sabouraud (Dibco) (Tamez-Guerra *et al.* 2013), se tomaron conidios mediante raspado superficial para ser mezclados en agua con 0.5% de Tween 20, para ajustar la cantidad de conidios al  $1 \times 10^7$  conidios /mL.

Los matraces se pusieron a crecer en incubación con agitación a 200 rpm a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ ) en un agitador orbital (Orbit, 2000). Del cultivo se tomaron 5 mL de muestra a los 3, 7, 9 y 13 d de incubación para seguir su proceso. Los aislamientos fueron resembrados en agar dextrosa y papa (PDA), Bioxon® (Becton, Dickinson and Co, México, D.F.) para su almacenamiento y su posterior análisis (Castrejón-Antonio, 2012).

## 5.3 Análisis *in vitro*

### 5.3.1 Extracción y purificación de ácidos nucleicos (ADN) de hongos aislados de suelo

La extracción del ADN se llevó a cabo con ayuda del kit comercial FastDNA® SPIN kit de la marca MP®, usando el equipo FastPrep® 24 Instrument y conforme al protocolo del fabricante. Todas las muestras se prepararon de la misma manera y cada experimento se realizó por triplicado para comprobar que se obtenían datos replicables.

### 5.3.2 Determinación de variabilidad entre cepas de *B. bassiana* mediante RAPD

El ADN se amplificó mediante la técnica RAPD-PCR en las cepas BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4, BBPTG6 y BB38 (Williams *et al.* 1990). Para esta prueba se utilizaron los partidores de las series OPA-A, OPA-B y OPA-AB (Operon Technologies, CA, USA). Las condiciones de amplificación de los RAPDs fueron de 45 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C y 2 min a 72°C, con un ciclo final de 5 min a 72°C (Termociclador Techne, Touchgene Gradient, Palm Beach, FL, USA). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µL que contenían 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 mM del oligonucleótido, 1x de buffer de amplificación de PCR, 1-mM de MgCl<sub>2</sub>, 1-U *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, *Life Science and Research Products*, Accesorios para Laboratorios S.A. De C.V., México D.F.) y 100 µg de ADN molde en agua ultra-pura. Las reacciones se realizaron por triplicado para determinar la consistencia de los patrones. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa (1.5 %) en el buffer 1X TAE (40 mM Tris acetato, 0.5 mM EDTA, pH 8,0) a 120 V (fuente de poder Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA).

### 5.3.3 Geles de Agarosa

Los productos resultados de RAPD y PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.5 y 1 % respectivamente de 30 a 35 min para obtener un gradiente por electroforesis a 120V. Posteriormente, cada gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas de los fragmentos amplificados de ADN. Para la obtención de datos y su posterior análisis.

### 5.3.4 Amplificación de las regiones ITS

Se evaluaron las cepas BBPTG2, BB38, GHA y 4 aislamientos de *B. bassiana* mediante los marcadores moleculares de espaciadores internos de transcritos (ITS) del ADN ribosomal (ADNr). Con una mezcla de buffer (10mM Tris-HCl, 50mM KCl pH 8.3) con MgCl<sub>2</sub> 1.5mM (Promega) 200 mM de dATP,

dCTP, dGTP y dTTP (Promega); empleando 0.5 mM de cada oligonucleótido (*forward y reverse*); 20 µg de ADN fúngico y 2.6 U de Taq polimerasa (Promega) para obtener un volumen final de 50µL.

### 5.3.5 Purificación de ADN de los productos de la amplificación de las regiones ITS

La purificación de ADN proveniente de los productos de PCR se realizó de acuerdo al protocolo de Wizard®. Este sistema se eligió pues puede purificar fragmentos de ADN de 100 hasta 10,000 pares de bases directamente del producto de la amplificación de PCR con un 95% de confianza. Posteriormente, las muestras de ADN purificado se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación, del Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos, México.

### 5.3.6 Análisis y comparación de secuencias

Se realizó un análisis comparativo entre las diferentes secuencias producto de PCR de la región ITS de las cepas con la ayuda del servidor Análisis de Genética y Evolución Molecular MEGA5.2 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>), para evaluar en las bases de datos y obtener información de ellas. Dado a que los resultados son expresados con variables dicotómicas, los productos de la PCR se reportaron tomando las bandas más intensas como presentes (1), o como ausentes (0), en cada genotipo. Los datos fueron registrados en matrices binarias. Se construyó una matriz de similitud generada mediante el modelo matemático o índice de Jacaré ( $I_J$ ) que mide la similitud, disimilitud o distancias que existen entre muestras de dos sitios con la siguiente fórmula:  $I_J: c/(a+b+c)$

Dónde:

**a:** es el número de especies presentes en el sitio A (campo agrícola donde se aplicó anteriormente *B. bassiana*).

**b:** es el número de especies presentes en el sitio B (campo agrícola donde NO se aplicó anteriormente *B. bassiana*).

**c:** es el número de especies presentes en ambos sitios (A+B).

Además se utilizó un análisis de agrupamiento con el método de *Unweighted Pair Group Method Average* (UPGMA) que se empleó para la construcción de un dendograma. En todos los casos se usó el programa estadístico computacional para Windows, SPSS Statistics 17.0 (2007).

A partir de su crecimiento en placas Petri con agar de dextrosa Sabouroud (Dibco), se tomaron conidios mediante raspado superficial para ser mezclados en agua con 0.5% de Tween 20, para ajustar la cantidad de conidios a  $1 \times 10^7$  conidios/mL. De esta suspensión se pasó 1 mL en caldo dextrosa Sabouraud suplementado con extracto de levadura al 1%. Los hongos se dejaron a crecer en incubación en matraces con agitación a 200 rpm a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) en un agitador orbital (Orbit, 2000, Labnet International Inc., Edison, NJ, USA). Del cultivo se tomaron 5 mL de muestra a los 13 d de incubación para seguir su proceso.

### 5.3.7 Análisis de Intrones

Para este análisis se usó la cepa del estudio (BB38) y se comparó con los 42 aislamientos del hongo entomopatógeno *B. bassiana* para determinar la presencia o ausencia de los intrones en la subunidad grande del ADN y evaluar su uso como marcadores moleculares específicos de cepas y aislamientos de *B. bassiana*.

### 5.3.8 Amplificación de Intrones por PCR

Los oligonucleótidos usados para la amplificación específica fueron previamente reportados (Neueglise y Brygoo 1994; Wang *et al.* 2003). Para la determinación de la distribución de intrones en aislados de *B. bassiana* fueron localizados por las combinaciones de los oligonucleótidos (Tabla 2). Para observar la presencia y ausencia de intrones en las muestras se llevó a cabo una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de la siguiente manera. En un

volumen final de 20  $\mu$ l, buffer 1X (Tris-HCl 200 a pH 8.4, 500 mM KCl), 2  $\mu$ L de molde (ADN), 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 1  $\mu$ L de 100 mM de dNTP, y 10 pmol de cada oligonucleótido (Tabla 2) se mezclaron con 1 U de Taq ADN polimerasa (Bioline).

Los parámetros de los ciclos fueron programados por gradientes de temperatura en el equipo *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems) como sigue: 4 min de desnaturalización inicial a 94°C por 1 ciclo, 35 ciclos de: desnaturalización, 45 seg a 94°C; alineación, 1 min a 59°C; extensión por 1 min a 72°C seguido por una extensión final a 72°C por 4 min.

### 5.3.9 Cultivo de cepas *B. bassiana* para la inducción de la expresión de genes de virulencia

Las cepas BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4 y BBPTG6 (CESAVEG) se seleccionaron para este estudio en base a su actividad contra la cucaracha urbana *Periplaneta americana* L. (Tamez-Guerra *et al.* 2013). A partir de su crecimiento en placas Petri con agar de dextrosa Sabouraud, se tomaron conidios mediante raspado superficial y se mezclaron en agua con 0.5% de Tween 20, para ajustar la cantidad de conidios a  $1 \times 10^7$  conidios/mL.

**Tabla 2. Oligonucleótidos de *Beauveria bassiana* seleccionados para la detección de Intrones.**

| Oligonucleótido            | Secuencia  | Tamaño esperado      |
|----------------------------|--|----------------------|
| <b>Dominios D9-D11 LSU</b> | I29 F (5'-CTGCCCAGTGCTCTGAATGTC-3')<br>M1 R (5'-GGTAAACTAACCTGTCTCACG-3')  | 2489pb               |
| <b>Bb4 (In1)</b>           | I29 F (5'-CTGCCCAGTGCTCTGAATGTC-3')<br>I31 R (5'-CGCTGATTCTGCCAAGCCCAT-3') | P= 620pb<br>A= 207pb |
| <b>Bb3 (In2)</b>           | I38 F (5'-ATGGGCTTGGCAGAATCAGCG-3')<br>I32 R (5'-CAGCCAACTCCCCCCTG-3')     | P=606pb<br>A=244pb   |
| <b>Bb2 (In3)</b>           | I21 F (5'-CGATCCTTTAGTCCCTCGAC-3')<br>I22 R (5'-CGCTTACCGAATTCCTTCGG-3')   | P=656pb<br>A=157pb   |
| <b>Bb1 (In4)</b>           | E23 F (5'-CCGAAGGAATTCGGTAAGCG-3')<br>M1 R (5'-GGTAAACTAACCTGTCTCACG-3')   | P=501pb<br>A=84pb    |

De esta suspensión se tomó un mililitro para inocular en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo dextrosa Sabouraud suplementado con extracto de levadura al 1% peso/vol. Los matraces se pusieron a crecer en incubación con agitación a 200 rpm a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) en un agitador orbital (Orbit 2000). Del cultivo se tomaron 5 mL de muestra a los 13 d de incubación para su procesado.

Como lo que se analizó fue el micelio, de los 5 mL de muestra se realizó una centrifugación a 5000 rpm para separar el sobrenadante del paquete con micelio. Posteriormente el producto del sobrenadante se filtró con una gasa estéril y de ésta se raspó el micelio y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 5.3.10 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN de las muestras, bajo el siguiente protocolo. Para la extracción y purificación de ARN, se tomaron las cepas de *B. bassiana* y se colocaron por separado en tubos Eppendorf de 1.5 mL, y se les agregó 1 mL de TRIzol® para homogeneizar el tejido con la ayuda de un micro-pistilo. Las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente, después se les agregó 0.2 mL de cloroformo y fue mezclado vigorosamente por 15 seg y se incubaron a temperatura ambiente de 2-5 min. Las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 8 min a  $2-8^{\circ}\text{C}$ , después se desechó el pellet. El sobrenadante resultado del proceso con cloroformo se tomó cuidadosamente y se pasó a tubos nuevos, a los cuales se les añadieron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezclaron por agitación e incubaron de 5-10 min a temperatura ambiente para ser centrifugados a 12,000g a  $2-8^{\circ}\text{C}$  por 8 min. Después se desechó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en etanol 75% en H<sub>2</sub>O DEPC (agua milliQ® mezclada y puesta en agitación con 0.1% de dietil-pirocarbonato por toda la noche y esterilizado). Se centrifugaron los tubos a 7,500 g por 5 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar por 30min a temperatura ambiente. Por último se resuspendieron las muestras en 50  $\mu\text{L}$  de agua DEPC y se incubaron de  $55-60^{\circ}\text{C}$  por 10 min, para su almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### 5.3.11 Análisis de RT-PCR

La obtención del ADNc se llevó a cabo mediante la técnica de retro-transcripción del ARN extraído y purificado previamente, técnica conocida como RT-PCR. Para lograrlo, se añadieron 5µL de buffer Tris-HCl, KCl 50mM pH, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 2 µL de una mezcla de nucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP (dNTPs), 1 µL de cada oligonucleótido seleccionado (Tabla 3), 0.5 de inhibidor de ARNsas, y 1-µL de retro-transcriptasa inversa (RT) a 10 µg de ARN de cada muestra y por último se aforó a 50 µL con H<sub>2</sub>O DEPC. Una vez listas, las muestras se sometieron a los siguientes ciclos de temperatura: 15 min a 37 °C, 60 min a 42 °C y 10 min a 65 °C.

### 5.3.12 PCR de toxinas y enzimas de cepas de *B. bassiana*

Para estimar la producción de factores relacionados a la virulencia de *B. bassiana* durante su crecimiento *in vitro*, se seleccionaron dos toxinas y una enzima para amplificar sus transcritos por medio de PCR y usar las secuencias de estos genes para su análisis y posibles blancos de marcadores moleculares específicos. Se usó la proteína constitutiva actina (proteína ribosomal) como control positivo y las secuencias para amplificar los genes de la enzima *proteasa*, y de las toxinas *beauvericina* y *basianólido*. Se utilizaron cebadores específicos de genes para su amplificación empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Tabla 3. Oligonucleótidos seleccionados para la amplificación de transcritos de toxinas y enzimas de *Beauveria bassiana*.**

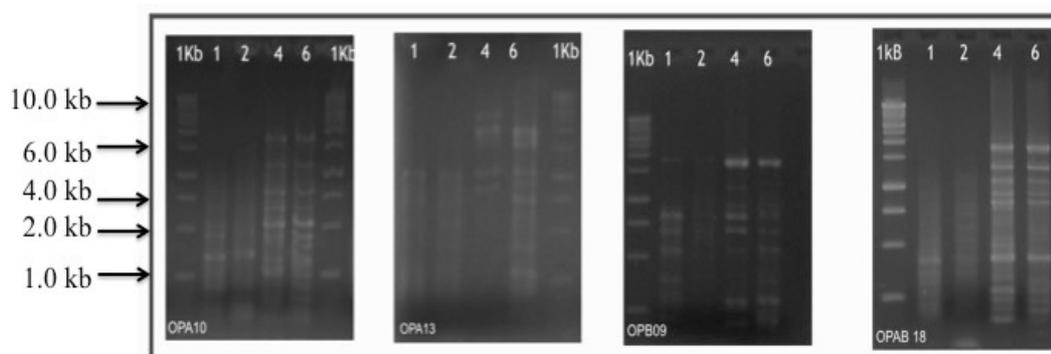
| Oligonucleótidos | Secuencias   | Tamaño |
|------------------|--|--------|
| Actina           | <i>F</i> (5'-CCGAATTCCACCGATCCAGACAGAGTACTTTCGC-3')<br><i>R</i> (5'-CCGAATTCGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTC) | 400 pb |
| Beauvericina     | <i>F</i> : 5'-TCATGATTGAGCATCAAGCG-3'<br><i>R</i> : 5'-CTTGCCAATGAAACAGATGG-3'                           | 401 pb |
| Basianólidos     | <i>F</i> - 5' AGCAGGATGCCATTGTTAGC 3'<br><i>R</i> - 5'CTGAAGGAACGCCAGTAAGG 3'                            | 506 pb |
| Proteasas        | EA1042 <i>f</i> : 5-CTTCTGTTGTCAAGTTTGCAAGG-3;<br>EA1042 <i>r</i> : 5-GCTTTCTATGAGTAGCTCGCCAAT-3         | 831 pb |

## 6. RESULTADOS

Como el objetivo general de este trabajo era poder identificar técnicas clásicas y modernas de biología molecular, con el fin de evaluarlas para su uso como biomarcadores de uso específico en cepas y aislamientos de *B. bassiana*, inicialmente para la tipificación molecular, se seleccionaron diferentes técnicas como RAPD, análisis de intrones, análisis de transcritos y análisis de secuencias conservadas ITS y se muestran los resultados obtenidos.

### 6.1 Determinación de variabilidad entre cepas de *B. bassiana* mediante RAPD

El ADN de las cepas BBPTG2, BB38, GHA y 42 aislamientos se amplificó mediante la técnica RAPD-PCR. Para esta prueba se utilizaron los oligonucleótidos de la serie OPA-A, OPA-B y OPA-AB y se llevó a cabo en cuatro aislamientos de laboratorio, con el objetivo de estandarizar la técnica y las condiciones de la misma como: concentración de ADN, temperatura y tiempo de alineamiento, y duración de la corrida, considerados los parámetros más importantes. Con esta técnica si se observaron diferentes bandas entre las cepas evaluadas, como se muestra en la Fig.6.

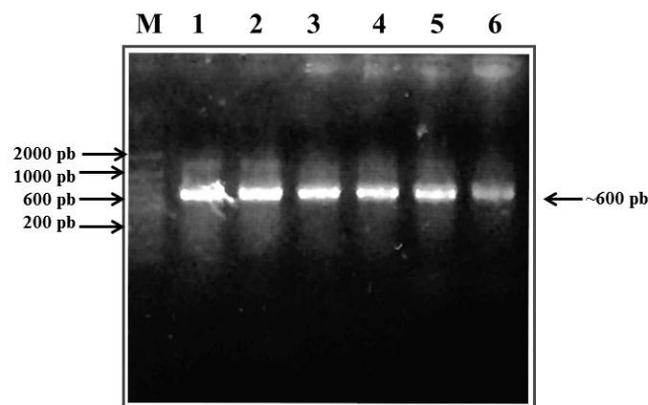


**Figura 6.** Productos de amplificación del ADN por RAPD en cuatro cepas de *Beauveria bassiana* de laboratorio: BBPTG1(1), BBPTG2 (2), BBPTG4 (3), BBPTG6 (4) donde las regiones ITS se analizaron con las series OPA10 (gel-1) , OPA13 (gel-2), OPB09 (gel-3) y OPAB18(gel-4). Se usó el marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (1Kb).

Al evaluar la cepa BB38 empleando la técnica de PCR-RAPD con los oligonucleótidos OPA10, OPA13 y OPB09, se observó un patrón de polimorfismo mayor, pero no se encontraron polimorfismos entre el aislamiento BB38 y las cepas a comparar (no se muestran los datos).

## 6.2 Amplificación de las regiones ITS

A partir del ADN total se amplificaron las regiones ITSs (ITS1-5.8S-ITS2) de los genes rARN con los iniciadores universales ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990). La amplificación de las regiones ITS de las cepas y aislamientos de *B. bassiana* reveló bandas con productos de aproximadamente 600 pb (Fig. 7).



**Figura 7.** Productos de amplificación de las regiones ITS de *B. bassiana* por PCR. Los carriles corresponden a: M = marcador de peso molecular de 2000 pares de bases (pb); y los carriles 1 al 6 corresponden a los amplicones de las regiones ITS de las cepas BB38, BBPTG2 y de los aislamientos 10, 20, 30 y 40 de *B. bassiana*.

## 6.3 Amplificación de transcritos de *B. bassiana*

Se llevó a cabo la amplificación de 3 genes involucrados en el proceso de infección de *B. bassiana* con el fin de establecer marcadores a partir de posibles diferencias en sus secuencias producto de PCR, los transcritos amplificados fueron *beauvericina*, *basianólidos* y *proteasas*, además del transcrito para *actina*, el cual se empleó como control (Fig. 8). Mientras que no se observaron diferencias en la

amplificación del transcrito para *actina* en los diferentes tiempos de toma de muestra, para la cepa BBPTG6 se observó una amplificación similar a las otras cepas hasta después de los 13 d de cultivo. Con respecto a *basianólidos*, la cepa BBPTG1 fue la única que mostró expresión durante todo el tiempo del cultivo, mientras que la BBPTG2 y BBPTG4 sólo a los 3 y 13 d y la BBPTG6, al igual que para el transcrito de *beauvericina*, la expresión se observó hasta el día 13. Para el caso de *proteasas*, con las cepas BBPTG1 y BBPTG2 no se observó la expresión en la muestra del día 9 de cultivo, mientras que para BBPTG4 se observó a los 3 d, y una amplificación disminuida a los 9 y 13 d de cultivo. La cepa BBPTG6 amplificó muy débilmente el transcrito de *proteasas* y sólo en la muestra del día 3 de cultivo.



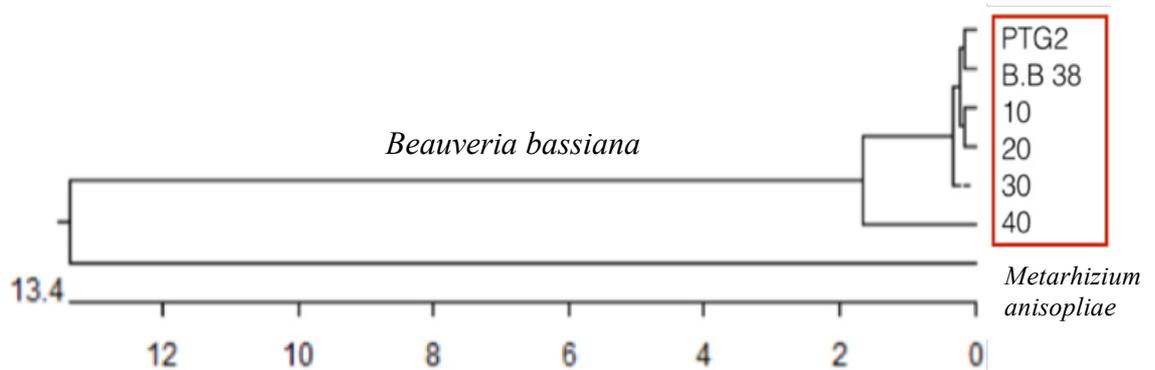
**Figura 8.** Productos de amplificación de transcritos de *B. bassiana* después de 3, 7, 9 y 13 d de cultivo, los cuales corresponden a 4 cepas del laboratorio (BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4 y BBPTG6) amplificadas con oligonucleótidos seleccionados (Tabla 3). El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 1000 pares de bases, los carriles del 1 al 4 se muestran los productos de la cepa BBPTG1, del carril 5 al 8 los de la cepa BBPTG2, del 9 al 12 la cepa BBPTG4 y del 13 al 16 la cepa BBPTG6, en el orden correspondiente al día de la toma de muestra en los cuatro geles.

#### 6.4 Secuenciación de las regiones ITS del ADN

Se realizó la secuenciación de las regiones ITS de aproximadamente 600 pb (Fig. 9), de las cepas BB38, BBPTG2 y los aislamientos 10, 20, 30 y 40 de *B. bassiana* por el método de secuenciación Sanger. Los resultados de la secuenciación de la región ITS fueron posteriormente analizados por métodos bioinformáticos.

## 6.5 Análisis bioinformático

Las secuencias nucleotídicas secuenciadas se compararon con las reportadas en el Genbank, mediante el programa NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), generando homología con cepas de *B. bassiana* hasta en un 99%. Se llevó a cabo la alineación de las secuencias mediante el método de ClustalW, usando el software DNASTAR y confirmándolo con el software BioEdit, para después hacer los árboles filogenéticos (Fig. 8).



**Figura 9.** Árbol filogenético en base a las sustituciones nucleotídicas (x 100) a partir de las secuencias de las regiones ITS, donde se muestra la divergencia genética en sustitución de nucleótidos, donde se puede observar la estrecha relación entre la cepa a estudiar (BB38) con la cepa BBPTG2 y los aislamientos 10, 20, 30 y 40 (nombres en la tabla 5) con una sustitución mucho menor a 1 (x100). Se agregó la secuencia de una cepa de *Metarhizium anisopliae* para bifurcar el árbol filogenético y mostrar la divergencia genética.

Se llevó a cabo un análisis para ver el porcentaje de identidad de las secuencias ITSs de las cepas y aislamientos de *B. bassiana*, donde se observó el porcentaje de divergencia en el eje de las ordenadas y el porcentaje de identidad en el eje de las abscisas para las cepas BB38, BBPTG2 y los aislamientos 10, 20, 30 y 40 de *B. bassiana* (Tabla 4).

**Tabla 4. Porcentaje de identidad entre cepas y aislamientos de *B. bassiana* en base a los datos obtenidos con el programa de análisis de secuencias ClustalW, usando el software DNASTAR.**

| PORCENTAJE DE IDENTIDAD |     |      |      |      |      |      |   |        |
|-------------------------|-----|------|------|------|------|------|---|--------|
|                         | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |   |        |
| 1                       | ■   | 98.4 | 94.4 | 99.3 | 98.9 | 99.1 | 1 | BBPTG2 |
| 2                       | 0.7 | ■    | 93.5 | 98.9 | 98.9 | 98.7 | 2 | BB38   |
| 3                       | 3.3 | 3.3  | ■    | 93.8 | 93.8 | 94.2 | 3 | 10     |
| 4                       | 0.0 | 0.0  | 3.1  | ■    | 99.3 | 98.4 | 4 | 20     |
| 5                       | 0.0 | 0.0  | 3.1  | 0.0  | ■    | 98.2 | 5 | 30     |
| 6                       | 0.2 | 0.2  | 3.1  | 0.2  | 0.2  | ■    | 6 | 40     |
|                         | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |   |        |

### 6.6 Análisis de intrones

Se realizó la búsqueda de los intrones de la subunidad grande del ADN mediante PCR donde se compararon la cepa a estudiar BB38 (33 en la Tabla 5) contra los 42 aislamientos, para buscar el patrón de la cepa y la función de estos intrones como marcadores específicos de la prevalencia y diseminación. En la tabla 5 se muestran los intrones presentes y ausentes, además de la información de cada aislamiento. En general, el intrón 1 fue el que mostró mayor variabilidad entre los aislamientos analizados.

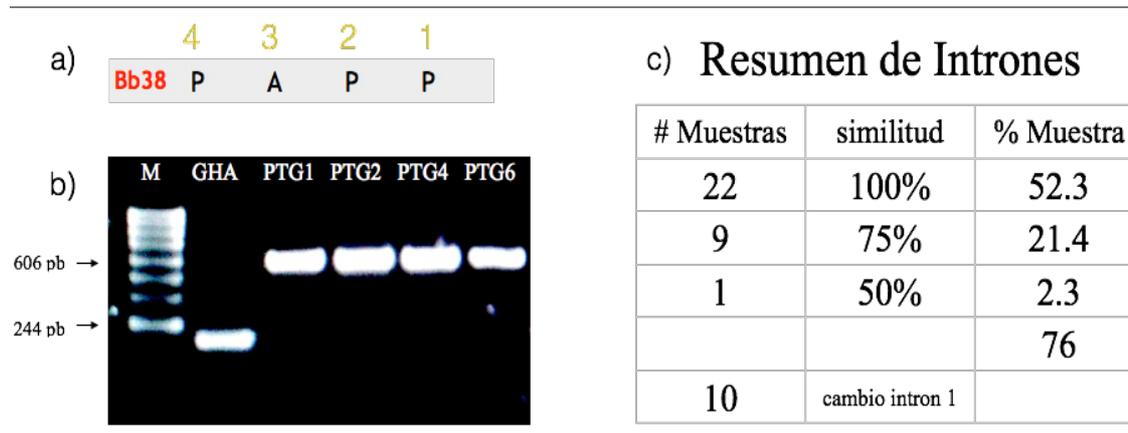
**Tabla 5. Patrones de intrones en la sub-unidad grande del ADN de aislamientos de *Beauveria bassiana*.<sup>1</sup>**

| No | Aislamiento | BB1(IN4) | BB2(IN3) | BB3(IN2) | BB4(IN1) |
|----|-------------|----------|----------|----------|----------|
| 1  | PBT-8       | P        | A        | P        | P        |
| 2  | PBT-5       | P        | A        | P        | P        |
| 3  | PB3         | P        | A        | P        | P        |
| 4  | PB70        | P        | A        | P        | P        |
| 5  | PB4         | P        | A        | ND       | P        |
| 6  | SLB6        | P        | A        | P        | P        |
| 7  | PBT-10      | P        | ND       | P        | A        |
| 8  | PB7         | P        | A        | P        | A        |
| 9  | PBT-9       | P        | A        | P        | P        |
| 10 | SLBT2       | P        | A        | P        | P        |
| 11 | PBT2        | P        | A        | P        | A        |

|    |        |   |    |    |    |
|----|--------|---|----|----|----|
| 12 | SLB10  | P | A  | P  | P  |
| 13 | PB7    | P | A  | P  | P  |
| 14 | SLBT9  | P | A  | P  | P  |
| 15 | SLBT8  | P | A  | ND | P  |
| 16 | SLBT7  | P | A  | ND | P  |
| 17 | SLB2   | P | A  | P  | ND |
| 18 | SLB1   | P | A  | P  | P  |
| 19 | SLB4   | P | A  | ND | P  |
| 20 | SLB9   | P | A  | P  | P  |
| 21 | SLBT4  | P | A  | ND | P  |
| 22 | PBT-9  | P | ND | ND | A  |
| 23 | PB6    | P | A  | P  | P  |
| 24 | PBT-3  | P | P  | P  | A  |
| 25 | PB8    | P | A  | P  | P  |
| 26 | PBT-7  | P | ND | P  | A  |
| 27 | SLBT5  | P | A  | P  | P  |
| 28 | SLB3   | P | A  | P  | ¿  |
| 29 | PBT1   | P | ND | P  | A  |
| 30 | PBT-4  | P | A  | P  | A  |
| 31 | PBT-6  | P | A  | P  | A  |
| 32 | PBT-6  | P | ND | P  | A  |
| 33 | Bb38   | P | A  | P  | P  |
| 34 | SLBT3  | P | A  | P  | P  |
| 35 | PB9    | P | A  | P  | P  |
| 36 | SLB8   | P | A  | P  | P  |
| 37 | SLBT10 | P | A  | P  | ND |
| 38 | SLBT6  | P | A  | P  | P  |
| 39 | SLBT2  | P | A  | P  | P  |
| 40 | PB2    | P | A  | P  | P  |
| 41 | SLB7   | P | A  | P  | ND |
| 42 | SLB5   | P | A  | P  | ND |
| 43 | PB5    | P | ND | P  | A  |

<sup>1</sup>En las columnas 1 y 2 se presenta el número y nombre asignado a cada aislamiento; en la columna 3 se observan los resultados del intrón 4 (IN4), en la columna 4 los resultados del intrón 3 (IN3), en la columna 5 los resultados del intrón 2 (IN2) y en la columna 6 los resultados del intrón 1 (IN1). P = presencia del intrón; A = ausencia de intrón; ND = no determinado. El análisis de cada aislamiento se realizó por triplicado

Con los resultados del análisis de intrones se calcularon los porcentajes de similitud entre los aislamientos y la cepa de estudio BB38, para mostrar los resultados de esta prueba de forma más gráfica (Fig. 10).



**Figura 10.** Análisis de intrones evaluados de un total de 42 aislamientos de *Beauveria bassiana* comparado con la cepa BB38 (33 en la tabla 5). a) Patrón correspondiente a la presencia-ausencia de intrones del aislamiento BB38, b) productos de la amplificación de intrón 1 donde se muestra la ausencia del intrón 1 (606 pb) en la cepa GHA, c) porcentaje de similitud entre los aislamientos analizados y BB38, ya sea del 100, 75, ó 50%; en la columna 3 se muestra el porcentaje del total de aislamientos contra el porcentaje de similitud, donde el 52.3% de los aislamientos mostraron una similitud del 100% , el 21.4% una similitud del 75%, el 2.3% de los aislamientos mostraron una similitud del 50% que corresponden al 76% del total de los aislamientos.

## 7. DISCUSIÓN

El uso de microorganismos para el control de plagas ha tenido un gran avance en los últimos años, lo cual se ve reflejado en un creciente interés no solo por la producción de más y mejores agentes, si no en conocer a fondo la ecología de estos microorganismos y como estos se comportan en condiciones naturales, y de esta manera también hacer un mejor uso de estos agentes en el control de plagas (Fierer *et al.* 2005). Si se planea aplicar hongos entomopatógenos dentro del género *Beauveria* como agente de biocontrol con éxito, se requiere tener un mejor conocimiento de su ecología y la composición de las poblaciones indígenas. A este respecto, se ha demostrado que un hábitat particular puede albergar diferentes especies, así como diferentes grupos genéticos dentro de las especies (Maurer *et al.* 1997; Meyling *et al.* 2009; Ormond *et al.* 2010). Si se pueden reconocer las cepas presentes de forma nativa, entonces es posible definir si el resultado del control por el hongo se debe a la aplicación de un producto en particular o al efecto sinérgico entre el agente activo del producto y las cepas nativas (Meyling y Eilenberg 2007).

Por tal razón varios grupos de investigación han hecho grandes esfuerzos en la búsqueda de estrategias en base en tecnologías del ADN y construcción de marcadores moleculares específicos de especies en un mismo género para poder realizar la identificación de las mismas a nivel de cepa (Castrillo *et al.* 2003; García-Pereyra *et al.* 2014)

*B. bassiana* es un entomopatógeno por excelencia y uno de los hongos más utilizados en el control de plagas, siendo uno de los biopesticidas más importantes para el control biológico. Este es capaz de estar presente en suelos alrededor del mundo y tiene una excepcional gama de hospederos, todo esto lo convierte en un buen candidato su estudio (de la Rosa *et al.* 2002; Destéfano *et al.* 2004; Pathan *et al.* 2007). Por tal razón, en el presente estudio se analizaron diferentes estrategias de biología molecular con el objetivo de evaluarlas como posibles marcadores para seguir la prevalencia y diseminación de cepas y aislamientos *B. bassiana*.

Para este estudio se trabajó con 42 aislamientos de suelo agrícola de Guanajuato (Pérez-González *et al.* 2014), y seis cepas de *B. bassiana* (BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4, BBPTG6, BB38, GHA), todo el estudio se llevó a cabo con ADN genómico de estas. Se analizaron técnicas de biología molecular como RAPD, diseño de oligonucleótidos SCAR, análisis de intrones, análisis de transcritos y análisis de secuencias conservadas ITS.

Los primeros experimentos se basaron en el análisis de las secuencias ITS que corresponden a los espaciadores internos transcritos, que son intrones dentro de los genes que codifican para las sub-unidades ribosomales, que son secuencias altamente conservadas y son de gran ayuda para el análisis de variabilidad genética (Rehner y Buckley., 2005; Rehner *et al.* 2011). Donde se muestra la divergencia genética en sustitución de nucleótidos, donde se puede observar la estrecha relación entre la cepas a estudiar [(BB38, BBPTG2 con los aislamientos 10, 20, 30 y 40 (nombres en la tabla 5)] con una sustitución mucho menor a 1 (x100).

La técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR) es comúnmente usada para examinar la variabilidad genética entre especies fúngicas (Urtz y Rice 1997) por esa razón fue seleccionada para el análisis de polimorfismos en la búsqueda de secuencias que nos ayudaran a la construcción de los oligonucleótidos SCAR.

Se llevó a cabo la técnica RAPD en tres cepas BB38 (cepa de estudio), PTG2 (aislamiento de laboratorio) y GHA (control) del ADN genómico, además de los productos de PCR de los genes de virulencia que codifican para: beauvericina, quitinasa y proteasa, con el fin de buscar polimorfismos y en base a ellos construir marcadores moleculares específicos de aislamientos y cepas de un mismo género y especie del hongo (Castrillo *et al.* 2003). Lamentablemente, los resultados de este experimento no fueron satisfactorios ya que no se observaron polimorfismos que permitieran discriminar entre cada aislamiento y por tal razón se realizó un análisis de intrones.

Se realizó el análisis de los intrones de *B. bassiana* procedentes del grupo 1 presentes en los genes de la subunidad mayor de rADN (Neueglise *et al.* 1994)

para diferenciar entre aislamientos de hongos del género *Beauveria* lo cual nos permitió buscar patrones en cuanto a la presencia o ausencia de estos en las 42 muestras a estudiar y compararlo con la cepa de estudio (BB38) para buscar un patrón que nos ayude a seguir la prevalencia y diseminación del hongos del género *Beauveria*.

Si bien es difícil determinar qué factores ocasionan las diferencias en la abundancia y distribución de cepas nativas de *B. bassiana*, es probable que los factores ambientales determinen la distribución de los mismos hongos (Vega *et al.*, 2012). Se han mencionado que las propiedades del suelo afectan la abundancia y distribución de hongos entomopatógenos (Quesada-Moraga *et al.* 2007); sin embargo, su prevalencia depende en gran manera del sustrato disponible, es decir, de las especies de insectos que pueda infectar. En este sentido, muy probablemente la similitud que se observó en este trabajo entre los aislamientos esté relacionada a la virulencia de los mismos a las especies de los insectos que se encuentran dentro en ese ecosistema.

En un estudio de la diversidad y distribución de hongos entomopatógenos realizado por (Pérez-González *et al.* 2014) ellos concluyeron que los aislamientos de *B. bassiana*, *B. pseudobassiana* y *Metarhizium robertsii* se encuentran presentes en suelos del estado de Guanajuato, México, siendo *B. bassiana* el hongo más abundante.

Como se mencionó anteriormente, productos bioinsecticidas a base de *B. bassiana* se comercializan internacionalmente gracias a su efectividad y amplio espectro. A este respecto, el genoma de *B. bassiana* codifica significativamente más tripsinas ( $P < 0.005$ ) comparado con patógenos de planta (23 vs. 2), al igual que subtilisinas (43 vs. 17), proteasas del aspártico (21 vs. 18) y carboxipeptidasas (52 vs. 32). La gran cantidad de proteasas en *B. bassiana* sugiere que es una adaptación que le permite tener ese amplio espectro de huéspedes. Incluso en general tiene más subtilisinas y tripsinas comparado con otros hongos entomopatógenos (Xiao *et al.* 2012). Durante su crecimiento produce una serie de metabolitos secundarios incluyendo los ciclopéptidos beauvericina, basianólidos y beauverolidos, las piridinas de pigmentación amarilla tenellina y bassiatina y la oosporina

dibenzoquinona. De éstos, sólo se han verificado funcionalmente los genes implicados en la biosíntesis de beauvericina, basianólido y tenellina (Xiao *et al.* 2012).

Debido a esto, en este trabajo se amplificaron transcritos de las toxinas beauvericina y basianólidos, y de la enzima proteasa, de 16 muestras analizadas 10 amplificaron con cebadores para dichos transcritos, pero las cepas analizadas mostraron diferencias en la expresión durante su cultivo de 3 a 13 d en medio de caldo dextrosa Sabouraud. La importancia de esto es la relación de dichos aislamientos con la virulencia a insectos y su capacidad antagonista en suelo. En la revisión de Wang y Xu (2012) ellos mencionan que la beauvericina tiene una fuerte actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas patógenas de humanos, animales y vegetales (Wang & Xu. 2012). Semejante a la producción de otros antibióticos, su producción depende de la regulación genética de cada aislamiento y las condiciones de crecimiento del mismo (Xu *et al.* 2009). A pesar de que la actividad antibacteriana de la beauvericina ha demostrado un amplio espectro, muy probablemente su actividad antifúngica depende de otros metabolitos, como la toxina basianólido y de enzimas como proteasas y quitinasas (Ortíz-Urquiza *et al.* 2010).

De los 42 aislamientos de campo analizados, se encontró un 100% de identidad en el 52.3% de los aislamientos en base a la presencia de intrones, un 21% con una identidad del 75% y el 2.3% obtuvo una identidad del 50% siendo todos estos el 76% de las muestras, el 24% de las muestras restantes tubo un cambio en el intrón 4 de la subunidad grande del ADN ribosomal. De esta manera se logró hacer un seguimiento en cuanto a la presencia de la cepa de estudio en muestras procedentes de suelos agrícolas con el uso de marcadores moleculares. En un estudio similar, Reineke *et al.* (2014) emplearon cinco marcadores de microsatélites conocidos como secuencias simples repetidas (SSR) para determinar la presencia de dos aislamientos presentes en productos comerciales a base de *B. bassiana* en diferentes ambientes. Ellos pudieron discriminar entre estos dos aislamientos y de otros 16 reportados internacionalmente usando tres de los cinco marcadores SSR, usando ADN genómico puro como plantilla para los ensayos de PCR, pero los niveles del umbral para poder discriminar entre los aislamientos dependió del medio

ambiente analizado (suelo o planta). Estos resultados indican que los marcadores moleculares como SSR específicos también son herramientas importantes para monitorear una cepa fúngica determinada en muestras de suelo e incluso del ADN de la planta (Reineke *et al.* 2014).

## 8. CONCLUSIONES

- Se demostró la prevalencia del aislamiento BB38 de *Beauveria bassiana* de manera específica por medio del análisis de intrones, y se propone esta técnica de marcaje molecular para la identificación de aislamientos de este hongo en suelo.
- La técnica RAPD no permitió diferenciar entre los aislamientos de *B. bassiana* seleccionados en este estudio al realizar el análisis de regiones polimórficas, pero dichas regiones se emplearon para la construcción de los oligonucleótidos SCAR.
- Se amplificaron los transcritos de *proteasa*, *beauvericina* y *basianólido* en cuatro cepas de *B. bassiana*, donde se observó una expresión variable durante el tiempo del cultivo.
- Se demostró que el intrón 1 de la subunidad grande del ADN es el que tiene la mayor tasa de variabilidad, y se propone como pieza clave en el análisis de polimorfismos en el uso de esta técnica.

## 9. LITERATURA CITADA

- Aquino de Muro, M., Mehta, S., Moore, D.** 2003. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 249-257.
- Bindslev, L.; Oliver, R.P. & Johansen, B.** 2002. In situ PCR for detection and identification of fungal species. *Mycol. Res.* 106 (3): 277–279. DOI: 10.1017150953756202005646.
- Buscott, F., Wipf, Di Battista, Munch, Botton, Martin.** 1996. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed-PCR. *Mycol. Res.* 100: 63-71.
- Castrejón-Antonio, J. E.** 2012. Potenciación de la producción de enzimas degradadoras de cutícula a partir de dos aislamientos monospóricos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin: para mejorar el biocontrol de la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* (Mulsant). Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Castrillo, L. A., Vandenberg, J. D., & Wraight, S. P.** 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 75-83. DOI: 10.1016/S0022-2011(02)00190-8.
- Destéfano, R. H. R., Destéfano, S. A. L., & Messias, C. L.** 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific oligonucleóticos. *Gen. Mol. Biol.* 27(2): 245-252. DOI:10.1590/S1599-69842011000100014.
- de la Rosa, W., López, F. L., & Liedo, P.** 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* 95(1): 3643.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, B. J.** 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 4117–4120
- Fernandes, Eguiarte, É., Moraes, Á., Pacheco, R.S., Rangel, D.E.N., Miller, M.P., Bittencourt, V.R.E.P., & Roberts, D.W.** 2009. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. *J. Appl. Microbiol.* 107(3): 760-774.
- García-Pereyra, J. Aviña-Marinez G.N., Orozco-Flores, A. A., Alvarado-Gómez, O G., Garcia. Montelongo, M., Uribe-Soto, J. N., & Medrano-Roldan, H.** 2014. Variabilidad de cepas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en base a polimorfismos de ADN amplificados al azar. *FYTON* 83: 37-43.

- Gao, D., & Tao, Y.** 2012. Current molecular biologic techniques for characterizing environmental microbial community. *Front. Environ. Sci. Eng.* 6: 82-97. DOI: 10.1007/s11783-011-0306-6.
- García-Gutiérrez, C., & Ledezma-Gutiérrez, R.** 2009. Manual de técnica para el aislamiento, identificación de Hongos y Nematodos entomopatógenos. IPN. México. ISBN: 978-607-414128-3.
- Hadrys, H., Balick, M., & Schierwater, B.** 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1(1): 55-63. DOI:10.1111/j.1365-294X.1992.tb00155.x.
- Joshi, L., St Leger, R. J., & Bidochka, M. J.** 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 211-217. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb0736.x.
- Leal-Bertioli, S., Butt, T. M., Peberdy, J. F., & Bertioli, D. J.** 2000. Genetic exchange in *Metarhizium anisopliae* strains coinfecting *Phaedon cochleariae* is revealed by molecular markers. *Mycol. Res.* 104: 409-414.
- Mark A. Valasek and Joyce J. Repa.** 2005. The power of real-time PCR. *Advan Physiol Edu*, 29 (3): 151-159. DOI: 10.1152/advan.00019.2005.
- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P. A., Bridge, & P. D., & Riba, G.** 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol. Res.* 101: 159-164.
- Meyling, N. V., & Eilenberg, J.** 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation. *Biol. Control.* 43: 145-155. DOI: 10.1016/j.biocontrol.200707.007.
- Neueglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B., & Riba, G.** 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brogniartii* isolated from insects. *Mycol. Res.* 98: 322-328.
- Neueglise, C., & Brygoo, Y.** 1994. Identification of group-I introns in the 28S rDNA of the entomopathogenic fungus *Beauveria brogniartii*. *Curr. Gene*, 27: 38-45. DOI:10.1007/BF00326577.
- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C., & Quesada-Moraga, E.** 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 105(3): 270-278. DOI:10.1016/j.jip.2010.07.003
- Pal, K. K., & Gardener, B. M.** 2006. Biological control of plant pathogens. *Pla. Heal. Inst.* 2: 1117-1142. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Pathan, A. A. K., Uma Devi, K., Vogel, H., & Reineke, A.** 2007. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. *Fungal Gen. Biol.* 44: 1231-1241. DOI: 10.1016/j.fgb.2007.07.002.
- Pipe, N. D., Chandler, D., Bainbridge, B. W., & Heale, J. B.** 1995. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of

- isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. 99: 485-491.
- Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G., & Baverstock, J.** 2014. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. J. Invertebr. Pathol. 119: 54-61. DOI:10.1016/j.jip.2104.04.004.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J.A., Maranhao, E.A.A., Ortiz-Urquiza, A., & Santiago-Álvarez, C.** 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. Mycol. Res. 111: 947-966. DOI:10.1128/AEM.01954-12.
- Rafikov, M., Balthazar, J. M., & von Bremen, H. F.** 2008. Mathematical modeling and control of population systems: applications in biological pest control. Appl. Mat. Comp. 200: 557-573.
- Rehner, S. A., & Buckley, E.** 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\beta$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycol. 97(1): 84–98.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A.** 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycol. 103 (5): 1055–1073. DOI: 10.3852/10-302
- Reineke, A., Bischoff-Schaefer, M., Rondot, Y., Galidevara, S., Hirsch, J., & Devi, K. U.** 2014. Microsatellite markers to monitor a commercialized isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in different environments: Technical validation and first applications. Biol. Control. 70: 1-8. DOI:10.1016/j.biocontrol.2013.11.012
- Thomas, M.B., & Read, A. F.** 2007. Fungal bioinsecticide with a sting. Nature Biotech. 25(12): 1367-1368.
- Tiago, P. V., Carneiro-Leão, M. P., Lima, M. L. A., Oliveira, N. T., & Lima, E. L. A.** 2011. Polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) based on internal transcribed spacer-RFLP, ISSR and intron markers. Gen. Mol. Res. 10: 1565-1575.
- Tamez-Guerra, P., Damas-Buenrostro, G., López-Torres, M.O., Valadez-Lira, J.A. & Gómez-Flores, R. A.** 2013. *Beauveria bassiana* biological control of *P. Americana*. Definition: *Beauveria bassiana* isolate BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4, BBPTG6, and BBPTG7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession: KC759728; VERSION: KC759728.1, GI:480360075.
- Urtz, B. E., & Rice, W. C.** 1997. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptus oryzophilus*. Lett. App. Microbiol, 25: 405-409. DOI:10.1111/J.1472-765X.1997.4600006.X.
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., & Blackwell, M.** 2012. Fungal entomopathogens. In: Vega, F.E., Kaya, H.K. (Eds.), Insect Pathology, second

- ed. Academic Press, London, UK, pp. 171–219.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. & White, T.J., Eds Academic Press, Inc., New York. pp. 315-322.
- Wang, C., Li, Z., Typas, M. A., & Butt, T. M.** 2003. Nuclear large subunit rDNA group I intron distribution in a population of *Beauveria bassiana* strains: phylogenetic implications. *Mycol. Res*, 107(10): 1189–1200. DOI:10.1017/S0953756203008505
- Wang, Q., & Xu, L.** 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*. 17(3): 2367-2377. DOI: 10.3390/MOLECULES17032367.
- Williams, T., Arredondo-Bernal, H. C., & Rodríguez-del-Bosque, L. A.** 2013. Biological pest control in Mexico. *Annu. Rev. Entomol.* 58:119-140.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary oligonucleotides are useful as genetic markers. *Nuc. Aci. Res*, 18 (22): 6531–6535.
- Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., ... & Feng, M. G.** 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific reports*. 2:483. DOI: 10.1038/srep00483
- Xu, L. J., Liu, Y. S., Zhou, L. G., & Wu, J. Y.** 2009. Enhanced beauvericin production with *in situ* adsorption in mycelial liquid culture of *Fusarium redolens* Dzf2. *Process Biochemistry*. 44(10): 1063-1067. DOI: 10.2225/Vol 16-Issue 6-fulltext-10.

## 10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Manuel Othoniel López Torres

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología

Tesis: EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE LA PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN DE CEPAS DE *Beauveria bassiana*

Campo de Estudio: Ciencias de la Vida

Datos personales: Nacido en San Pedro Coahuila el 25 de Septiembre de 1988, soltero.

Educación: Carrera como Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Centro de Estudios Universitarios. Guadalupe N.L.