

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la vida
con orientación en Microbiología celular y molecular**

**Análisis de la dinámica de los microtúbulos en el hongo
entomopatógeno *Metarhizium brunneum***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Alejandra Irene Hernández Saiz

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Alejandra Irene Hernández Saiz

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete
Directora de tesis

Miembros del comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dra. María del Carmen Maya Sánchez

Dra. Hortencia Silva Jiménez



Dra. Ana Denise Re Araujo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Alejandra Irene Hernández Saiz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular.

Análisis de la dinámica de los microtúbulos en el hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*

Resumen aprobado por:

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete
Directora de tesis

Metarhizium brunneum es un hongo entomopatógeno que se utiliza para el control biológico de plagas para la agricultura, además de que este género también se encuentra asociado en la rizosfera de las plantas beneficiando su crecimiento. En la interacción hongo-insectos y hongo-plantas, el hongo se enfrenta a barreras y compuestos tóxicos producidos por eucariotas superiores como mecanismo de defensa, obligándolo a desencadenar eventos de diferenciación y de transporte de organelos para lograr la homeostasis. La polaridad celular en hongos es un proceso esencial para un apropiado crecimiento y morfogénesis, donde el citoesqueleto microtubular juega un papel importante en el transporte intracelular de vesículas y organelos. En este trabajo, con el fin de analizar la organización intracelular de los microtúbulos (Mts) en *M. brunneum*, se realizó la expresión heteróloga de la β -Tubulina proveniente de *Neurospora crassa* fusionado en el carboxilo-terminal con la GFP. El análisis mediante microscopia confocal de las transformantes, reveló la presencia de pocos y largos haces de Mts que se arreglan longitudinalmente en toda la hifa, y que la cantidad de éstos está relacionado directamente con la velocidad de crecimiento del microorganismo. Por otra parte, mediante el uso de cepas marcadas con proteínas fluorescentes, colorantes vitales y la droga despolimerizadora de los Mts, Benomilo (BML), se determinó la participación de los Mts en la organización intracelular. Nuestros resultados mostraron que los peroxisomas marcados con GFP (Kat-eGFP) y los cuerpos lipídicos teñidos con BODIPY, fueron observados como puntos fluorescentes distribuidos a lo largo de la hifa, los peroxisomas más grandes comparados con los cuerpos lipídicos. Los análisis determinaron que algunos peroxisomas tienen movimientos sobre su propio eje, mientras que otros con movimientos a distintas direcciones y velocidades. Los cuerpos lipídicos con movimiento, era mucho menor su velocidad comparada con los peroxisomas. El tratamiento con BML, demostró que tanto los peroxisomas como los cuerpos lipídicos disminuían el número de partículas fluorescentes en movimiento además de tener una distribución anormal. El AVC marcado con FM4-64, mostró una localización en el domo apical, moviéndose con la direccionalidad del crecimiento; el tratamiento con BML mostró la disminución de esta estructura con desaparición ocasional. La pared celular teñida con blanco de calcoflúor fue más gruesa en la punta de la hifa en comparación con la región subapical y basal, pero al tratar a las células con BML disminuyó el grosor de la pared en el ápice. Las mitocondrias teñidas con MitoTracker Green, se observaron en forma de filamentos largos distribuidos en toda la hifa y que su localización fue alterada al despolimerizar los Mts. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron dilucidar que al no encontrarse organizados correctamente los Mts, los distintos organelos y elementos cargo no pueden desplazarse correctamente, provocando una inadecuada distribución intracelular.

Palabras clave: Mts, transporte intracelular, BML, *Metarhizium brunneum*.

Summary of the thesis presented by **Alejandra Irene Hernández Saiz** as a partial requirement to obtain the degree of Master of Science in Life Sciences with orientation in Cellular and Molecular Microbiology.

Analysis of microtubule dynamics in the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*

Summary approved by:

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete
Thesis Director

Metarhizium brunneum is an entomopathogenic fungus used for biological control of pests in agriculture, additionally, this genus is associated with the rhizosphere of plants, benefiting their growth. In the fungus-insect and fungus-plant interaction, the fungus faces barriers and toxic compounds produced by higher eukaryotes as a defense mechanism, forcing it to trigger differentiation events and organelle transport to achieve homeostasis. Cell polarity in fungi is an essential process for proper growth and morphogenesis, where the microtubular cytoskeleton plays an important role in the intracellular transport of vesicles and organelles. In this work, to analyze the intracellular organization of microtubules (Mts) in *M. brunneum*, we performed the heterologous expression of β -Tubulin from *Neurospora crassa* fused at the carboxyl-terminal tagged with GFP. Live-cell imaging of the transformants utilizing confocal microscopy, revealed the presence of few and long bundles of Mts that are arranged longitudinally throughout the hyphae, and that the amount and arrangement of these is directly related to the growth rate of the organism. On the other hand, using strains marked with fluorescent proteins, vital dyes and treatment with Benomyl (BML), a drug that depolymerizes Mts, it was determined the participation of Mts in intracellular organization. Our results showed GFP-labeled peroxisomes (Kat-eGFP) and BODIPY-stained lipid bodies as fluorescent dots distributed along the hyphae; peroxisomes were larger compared to lipid bodies. Some peroxisomes moved on their axis while others with moved in different directions and speeds. Lipid bodies speed was much lower compared to peroxisomes. BML treatment showed that both peroxisomes and lipid bodies decreased their number of moving fluorescent particles in addition to having an abnormal distribution. The AVC stained with FM4-64, showed localization in the apical dome, moving in the growth direction, the treatment with BML showed the decrease of this structure and occasional disappearance. The calcofluor white-stained cell wall was thicker at the hyphal tip compared to the subapical and basal regions, but BML treatment decreased wall thickness at the apex. Mitochondria stained with MitoTracker Green were observed as long filaments distributed throughout the hyphae, and their positioning was altered by depolymerizing the Mts. The results obtained in this work allowed us to elucidate that when the Mts are not correctly organized, the different organelles and cargo elements cannot move correctly, causing an inadequate intracellular distribution.

Keywords: Mts, intracellular transport, BML, *Metarhizium brunneum*.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos por su gran apoyo y cariño

A mi esposo por todo su amor y apoyo

A Dios por siempre estar

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca de posgrado otorgada. Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (**CICESE**) y al Departamento de Microbiología Celular y Molecular por contribuir en mi preparación profesional, así como el uso del equipo necesario para el desarrollo de este trabajo.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (**LNMA**) por proveer servicios de microscopía óptica de alta especialización a este trabajo.

Al proyecto **SEP-CONACyT No. 2016-01-28724** por ayudar a financiar el proyecto.

A mi directora de tesis, la **Dra. Olga Alicia Callejas Negrete**, por apoyarme durante todo el proceso de mi maestría, por todas las enseñanzas, su gran paciencia, por la oportunidad de aceptarme como estudiante y todo lo que ha conllevado culminar este proceso.

A mi comité de tesis, la **Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez, Dra. María del Carmen Maya Sánchez, Dra. Hortencia Silva Jiménez** por su gran apoyo, consejos, atención y formación.

Al **Dr. Diego Delgado**, por su apoyo en la microscopía y todas las enseñanzas.

A todos mis compañeros del laboratorio por su ayuda, también a los integrantes del laboratorio de la Dra. Rosa Mouriño, **Marisela, Diego, Nahum, Astrid, Gabriela, Abraham y Alejandro** por todo el apoyo de equipo, ha sido un placer trabajar con todos y cada uno de ustedes.

A mis amigos durante la maestría, **Marisela** quien siempre me ha dado palabras de aliento y su apoyo, a **Luis** quien me ha apoyado y escuchado cuando lo necesitaba, **Karlita** quien me ha ayudado, escuchado y apoyado, de verdad muchas gracias a todos ustedes por estar ahí.

A **Yahaira Catañeda** por estar siempre al pendiente de mí, por procurarme, por todo su cariño, por su enorme apoyo durante todo el transcurso de mi estancia en CICESE, no tengo palabras para agradecerle todo lo que me ha ayudado.

A mis hermanos **Moisés y Erubiel** por ser simplemente mis hermanos, por hacerme reír hasta en los peores momentos, por escucharme, los amo mucho, siempre serán mis pequeños hermanitos. A mis padres **Irene y Moisés**, estoy sumamente agradecida por todo el amor incondicional, por el enorme apoyo, por todas sus enseñanzas, por cuidarme tanto y estar siempre para mí, esto es por y para ustedes.

A mis hermosos angelitos que me han acompañado durante todas las desveladas, los momentos difíciles, **Nila, Mandy, Casim, Bolin, Mako, Dexter, Darwin, Newton y Petunia** gracias por todo su amor, son un gran soporte en mi vida.

A mi querido esposo **Fernando**, mi amor, no tengo palabras para expresar lo afortunada que soy por tenerte a mi lado, en verdad, has sido un pilar fundamental en todo este proceso y en mi vida, te amo y de todo corazón, GRACIAS.

A **Dios** por nunca abandonarme.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Antecedentes.....	2
1.1.1. Pesticidas y su impacto.....	2
1.1.2. Organismos entomopatógenos como biocontroladores.....	3
1.1.3. El género <i>Metarhizium</i>	5
1.1.4. <i>Metarhizium</i> como agente de control biológico.....	5
1.1.5. Mecanismo de patogenicidad de <i>M. brunneum</i>	6
1.1.6. <i>Metarhizium</i> y su asociación con plantas.	8
1.1.7. Crecimiento polarizado.....	9
1.1.8. Microtúbulos.....	10
1.1.9. Antecedentes directos.....	12
1.2. Justificación.....	13
1.3. Hipótesis.....	13
1.4. Objetivos.....	14
1.4.1. Objetivo general	14
1.4.2. Objetivos específicos.....	14
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Organismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>M. brunneum</i>	15
2.1.1 Cepas y vectores de clonación.....	15
2.1.2 Medios y condiciones de crecimiento para <i>M. brunneum</i>	15
2.1.3 Obtención de conidios.....	16
2.1.4 Obtención de micelio en medio líquido.....	16
2.1.5 Medios y condiciones de crecimiento para <i>E. coli</i>	16

2.2	Análisis bioinformático.....	17
2.3	Extracción de DNA genómico de <i>M. brunneum</i>	17
2.4	Construcción de casetes para marcaje de la β -Tubulina.....	17
2.4.1	Diseño de oligonucleótidos para el marcaje de la β -Tubulina con la proteína verde fluorescente (eGFP).....	17
2.4.2	Amplificación por PCR del marco de lectura abierto (ORF) del gen β - <i>tubulina</i>	18
2.4.3	Amplificación del ORF de la <i>egfp</i>	19
2.4.4	PCR de doble unión para la construcción del casete β - <i>tubulina-egfp</i>	19
2.4.5	Purificación de los productos de restricción y PCR.....	19
2.4.6	Clonación del casete β - <i>tubulina-egfp</i> en el vector de almacenamiento pGEM (pOC02-AH01).....	20
2.4.7	Construcción del plásmido β - <i>tubulina-egfp</i> +pAGICA-113 (pOC03-AH03).....	20
2.5	Transformación de <i>M. brunneum</i> por electroporación.....	21
2.5.1	Obtención de protoplastos.....	21
2.5.2	Transformación por electroporación.....	22
2.6	Microscopia y análisis de imágenes.....	22
2.7	Ensayos con drogas despolimerizadoras de los Mts.....	23
2.8	Medición de los movimientos de peroxisomas y cuerpos lipídicos.....	24

Capítulo 3. Resultados

3.1.	Análisis bioinformático y construcción de casetes de transformación para marcaje con proteína fluorescente.....	25
3.1.1.	Amplificación de los ORFs de la β - <i>tubulina</i> de <i>M. brunneum</i> y <i>egfp</i>	26
3.1.2.	PCR de doble unión para la construcción del casete β - <i>tubulina-egfp</i>	27
3.1.3.	Construcción del plásmido pOC04-AH03 (β - <i>tubulina-egfp</i> +pGEM)	26
3.1.4.	Construcción del vector pOC05-AH04 (β - <i>tubulina-egfp</i> +pAGICA-113)	29
3.1.5.	Localización y dinámica de la β -Tubulina en hifas maduras de <i>M. brunneum</i> por expresión heteróloga.....	31
3.2.	Asociación del citoesqueleto microtubular en la distribución intracelular de diferentes elementos cargo.....	32
3.2.1.	Dinámica y distribución de peroxisomas en hifas maduras de <i>M. brunneum</i>	32
3.2.2.	Análisis de la dinámica de los peroxisomas en hifas maduras de <i>M. brunneum</i>	34
3.2.3.	Dinámica de cuerpos lipídicos en hifas maduras de <i>M. brunneum</i>	36

3.2.4. Dinámica del Spk y su relación con el citoesqueleto microtubular en <i>M. brunneum</i>	40
3.2.5. Análisis de la pared celular en hifas maduras de <i>M. brunneum</i>	42
3.2.6. Dinámica de mitocondrias en hifas maduras de <i>M. brunneum</i>	45
Capítulo 4. Discusión	
4.1. Organismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>M. brunneum</i>	48
4.2. Dinámica de diferentes componentes intracelulares y su relación con el cito esqueleto microtubular en <i>M. brunneum</i>	49
Capítulo 5. Conclusiones	53
Literatura citada	54
Anexos	60

Lista de figuras

Figura		Página
1	Representación esquemática de las etapas del proceso de infección de <i>M. brunneum</i> a su hospedero.....	7
2	Asociación de <i>M. robertsii</i> expresando GFP con la raíz de <i>P. vulgaris</i> y <i>P. virgatum</i> ..	9
3	Representación esquemática de los diferentes componentes de una hifa que participan en el crecimiento polarizado	10
4	Diagrama de la estructura y composición de los microtúbulos.....	11
5	Esquema de PCR de fusión para el marcaje fluorescente de la proteína β -Tubulina en el hongo entomopatógeno <i>M. brunneum</i>	20
6	Método del bloque de agar invertido.....	23
7	Dominios de la proteína β -Tubulina de <i>M. brunneum</i>	26
8	Amplificación por PCR de los ORFs del gen de la β -tubulina y <i>egfp</i>	27
9	Construcción del casete β -tubulina- <i>egfp</i>	28
10	Vector de clonación pGEM [®] -T Easy (PROMEGA).....	29
11	pAGICA113 es un vector binario que contiene el gen de resistencia al antibiótico nourseotricina (NatR) bajo el control del promotor (pGPDA) y terminador (trpC) de <i>A. nidulans</i>	30
12	Identificación y características de la construcción β -tubulina- <i>egfp</i> +pAGICA-113.....	30
13	Imágenes confocales de expresión de la β -Tubulina-sGFP de <i>N. crassa</i> en <i>M. brunneum</i>	31
14	Serie de tiempos de imágenes confocales de la dinámica de los peroxisomas (KAT-eGFP) en hifas maduras de <i>M. brunneum</i>	33
15	Imágenes confocales de KAT-eGFP tratadas con diferentes concentraciones de BML	34
16	Velocidades de desplazamiento de las partículas fluorescentes de la cepa 2NP4-eGFP tipo silvestre	35
17	Velocidades de desplazamiento de partículas de la cepa 2NP4-eGFP tratadas en BML	36
18	Serie de tiempos de imágenes confocales de hifas teñidas con BODIPY	37

19	Imágenes confocales de <i>M. brunneum</i> teñidas con BODIPY y tratadas con BML.....	38
20	Velocidades de desplazamiento de las partículas de los cuerpos lipídicos de la cepa WT.....	39
21	Velocidades de desplazamiento de partículas de los cuerpos lipídicos	39
22	Imágenes confocales de <i>M. brunneum</i> teñido con el colorante lipofílico FM4-64	40
23	Imágenes confocales de hifas teñidas con FM4-64 y tratadas con BML.....	41
24	Visualización de la pared celular de <i>M. brunneum</i>	43
25	Imágenes confocales de hifas de <i>M. brunneum</i> teñidas con blanco de calcoflúor y tratadas con BML.....	44
26	Serie de tiempos de imágenes confocales de hifas teñidas con MitoTracker Green para visualizar mitocondrias.....	45
27	Imágenes confocales de hifas teñidas con MitoTracker Green y tratadas con BML....	46
28	Serie de tiempos de imágenes en campo claro de <i>M. brunneum</i>	47

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Lista de cepas y vectores utilizados en este trabajo.....	15
2	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	18
3	Porcentaje de identidad de β -Tubulina con sus diferentes homólogos y ortólogos.....	25

Capítulo 1. Introducción

En la agricultura moderna se han logrado grandes niveles de producción gracias al establecimiento del monocultivo, el cual consiste en generar un número elevado de individuos idénticos compartiendo el mismo espacio. Esta práctica agrícola se realiza para suministrar alimentos a la población mundial en constante crecimiento; sin embargo, es antinatural e inestable, generando altas posibilidades de invasión de cosechas por plagas, malezas y enfermedades (Nava-Pérez et al., 2012). Los insecticidas químicos han permitido un control eficaz de las plagas, sin embargo, se ha descrito que estos compuestos son altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas, generando preocupación en el ámbito mundial. Actualmente se trabaja para limitar la aplicación de los insecticidas químicos y promover el manejo con otras formas de control menos contaminantes, como el control biológico (Torres et al., 2002). En relación con lo anterior, existen hongos entomopatógenos, los cuales son un grupo amplio de microorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos (Motta et al., 2011). La actividad más conocida de los hongos entomopatógenos es su capacidad de actuar como biocontroladores de insectos-plaga importantes para la agricultura. Los géneros *Metarhizium*, *Beauveria* y *Verticillium* son los más estudiados y han sido utilizados por su efectivo mecanismo de infección al insecto hospedero, invadiéndolos y causándoles la muerte (Clarkson y Charnley, 1996).

Se ha reportado que el género *Metarhizium* tiene la capacidad de infectar de manera natural a más de 200 especies de insectos, describiendo así, su amplio rango de hospedero, la mayoría siendo del orden Ortóptera, Díptera, Lepidóptera, Coleóptera entre otros (Brunner-Mendoza et al., 2019; González-Hernández et al., 2020). Además, ha sido ampliamente estudiado tanto a nivel molecular como bioquímico, y su patogenicidad no está determinada por un solo factor, sino que depende de una interacción coordinada de entre muchos determinantes de patogenicidad y factores del huésped (Roberts, DW. et al., 2004; Shah FA. et al., 2005; González-Hernández et al., 2020). La persistencia y la efectividad de la infección dada por *Metarhizium* es principalmente por medio de los conidios, los cuales son estructuras críticas para la aptitud ecológica de los hongos entomopatógenos (Meyling et al., 2007). El éxito de la infección depende de la densidad y el número de conidios que debe superar un nivel umbral crítico (Meyling et al., 2007). La actividad más conocida de *Metarhizium* sp., es su capacidad de actuar como controlador biológico, sin embargo, en recientes años, se ha reportado que *Metarhizium* no sólo tiene una asociación con el insecto, sino también se encuentra en la rizosfera de las plantas, beneficiando el crecimiento de ésta en raíces, hojas y tallos (Behie S. W et al. 2012, Liao X., et al., 2014).

En la interacción que se establece entre hongo-insectos u hongo-plantas, el hongo puede enfrentarse a diferentes tipos de barreras y compuestos tóxicos generados por los eucariotas superiores como mecanismo de defensa, obligando al hongo a desencadenar ciertos eventos de diferenciación y de transporte de organelos (para el crecimiento polarizado y/o desintoxicación) que permitan llegar a un equilibrio. La polaridad celular, es un proceso importante para el desarrollo de los organismos eucariotas, debido a que es crítico para el funcionamiento de diversos procesos biológicos, tales como la embriogénesis, organogénesis, morfogénesis y división celular asimétrica (Dent et al., 2011). Este tipo de crecimiento es un proceso multifactorial donde participan diferentes complejos proteicos, entre ellos el citoesqueleto, que es fundamental para el transporte intracelular. Como en todas las células eucariotas, el citoesqueleto (microtúbulos (Mts), microfilamentos de actina, septinas y filamentos intermedios) de los hongos es una estructura dinámica que mantiene la forma, organización y brinda soporte a los componentes citoplasmáticos; controla los movimientos de la célula, y juega un papel importante en el transporte intracelular de vesículas y organelos (Garvalov et al., 2006). Un componente importante del citoesqueleto son los Mts, estructuras tubulares conformados por subunidades heterodiméricas de α - β -tubulina y que tienen polaridad estructural con dos distintas terminaciones: un extremo positivo que es más dinámico, ya que ahí los Mts se polimerizan y despolimerizan rápidamente, mientras que el extremo menos dinámico es el negativo y se encuentra localizado en los Centros Organizadores de los Microtúbulos (MTOC) (Oakley y Morris, 1980; Derksen y Emons, 1990, Haimo, 1997; Nédélec et al., 2003; Oakley, 2000; Alberts et al., 2015).

Debido a que hay poca información sobre la dinámica del citoesqueleto microtubular en hongos entomopatógenos, en este trabajo estamos interesados en determinar la organización y dinámica del citoesqueleto microtubular y su asociación con diferentes elementos cargo en *M. brunneum*, con el fin de entender el papel de los Mts en la distribución intracelular de este hongo.

1.1 Antecedentes

1.1.1. Pesticidas y su impacto

Los pesticidas son sustancias químicas tóxicas o mezcla de agentes biológicos que se liberan intencionalmente al medio ambiente para disuadir, controlar o matar poblaciones de insectos, malezas, hongos u otras plagas dañinas. Las plagas pueden definirse ampliamente como “las plantas, animales y

microorganismos que ponen en peligro nuestra alimentación, salud y/o bienestar". (Isra Mahmood et al., 2016). Los primeros pesticidas sintéticos estuvieron disponibles durante la década de 1940, generando grandes beneficios en el aumento de la producción de alimentos. La preocupación por los impactos adversos de los plaguicidas químicos en el medio ambiente y en la salud humana comenzó a expresarse a principios de la década de 1960. Desde entonces, el debate sobre los riesgos y beneficios de los plaguicidas no ha cesado y se ha realizado una gran cantidad de investigación sobre el impacto de los plaguicidas en el medio ambiente. Se calcula que cada año se aplican 2,5 millones de toneladas de plaguicidas a cultivos agrícolas en todo el mundo (van der Werf, 1996). La cantidad de plaguicida que entra en contacto directo o es consumida por las plagas objetivo es un porcentaje extremadamente pequeño de la cantidad aplicada. En la mayoría de los estudios, se ha encontrado que la proporción de plaguicidas químicos aplicados que alcanzan la plaga objetivo es inferior al 0.3%, por lo que el 99.7% se distribuye en otra parte del medio ambiente (Pimentel, 1995). Dado que el uso de plaguicidas en la agricultura conduce inevitablemente a la exposición de organismos no objetivo (incluidos los seres humanos), pueden producirse efectos secundarios indeseables en algunas especies, comunidades o ecosistemas en su conjunto. (Pimentel, 1995; Assessing the impact of pesticides on the environment, 1996).

1.1.2. Organismos entomopatógenos como biocontroladores

Los organismos entomopatógenos son agentes biocontroladores ambientalmente más adecuados que los pesticidas químicos y a pesar de que son más costosos, monetariamente hablando, a largo plazo son más amables en términos de efectos secundarios nocivos, como los peligros para la salud humana y la destrucción de organismos no objetivo (S.I. Ahamed y S.R. Leather., 2008). Desde hace años, se ha considerado el uso de agentes biocontroladores, entre los cuales se encuentran cuatro grandes grupos de microorganismos entomopatógenos: bacterias, virus, hongos y nemátodos (Huffaker, 1976).

Dentro de los microorganismos entomopatógenos, los virus son agentes importantes de control biológico con características muy distintivas, como son rango de hospedero estrecho, no tóxicos para los vertebrados y amigable con el medio ambiente. Entre este grupo de virus, los baculovirus han llamado una especial atención por su capacidad de entomopatógenos. Se ha descrito actualmente que se trabaja con construcciones de baculovirus recombinantes, mediante la inserción de genes exógenos de diferentes orígenes que codifican a sustancias bioactivas insecticidas como neurotóxicas, hormonas y enzimas, lo

anterior, con el fin de hacer más eficiente la capacidad de infección del baculovirus aumentando la velocidad de muerte del hospedero (Karabörklü et al., 2017).

Otro grupo de microorganismos que se ha utilizado para el control biológico es el de entomopatógenos bacterianos, siendo los géneros de *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* los más utilizados. Se ha descrito, que se utilizan técnicas de DNA recombinante para mejorar la eficacia de los insecticidas bacterianos, aumentando notablemente la síntesis de proteínas insecticidas y permitiendo nuevas combinaciones de endotoxinas. Un ejemplo claro de ello es lo reportado en *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), donde han manipulado la expresión de nuevas combinaciones de toxinas o sobreexpresión de genes de toxinas para una mayor actividad o un rango de hospedadores más amplio (Karabörklü et al., 2017).

Los nematodos entomopatógenos de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* son patógenos obligados por naturaleza y provocan la muerte a sus huéspedes con ayuda de bacterias específicas asociadas simbióticamente (*Xenorhabdus spp* para *Steinernematids* y *Photorhabdus luminescens* para *Heterorhabditids*). El juvenil de tercera instar infeccioso de vida libre del nematodo que no se alimenta del cadáver del hospedero, emerge de él, empobrecido al ambiente del suelo, donde puede persistir durante meses hasta que localiza e infecta a un nuevo hospedador. Los nematodos entomopatógenos se mantienen bajo control natural por factores abióticos y bióticos, pero se sabe muy poco acerca de los factores que permiten que los juveniles infecciosos naturales persistan en el suelo.

Los hongos son los patógenos más comunes de los insectos, con aproximadamente 1000 especies conocidas por causar enfermedades en los artrópodos. A diferencia de las bacterias y virus, que infectan a los insectos a través del intestino, la mayoría de los hongos entomopatógenos infectan a los insectos por penetración directa a través de la cutícula. La infección inicia con el establecimiento del conidio que se adhiere a la cutícula del insecto, el cual producen un tubo germinativo que serpentean a través de la cutícula hasta encontrar el lugar adecuado para la penetración. Varios hongos entomopatógenos, como *Metarhizium spp.* y *Beauveria spp.*, se han desarrollado como alternativas ecológicas a los insecticidas químicos en programas de biocontrol de plagas agrícolas y vectores de enfermedades (H. Zhao et al., 2016).

1.1.3. El género *Metarhizium*

Durante aproximadamente 130 años, los hongos entomopatógenos se han utilizado para el control biológico de insectos-plaga importantes para la agricultura, siendo los más usados en todo el mundo *M. anisopliae* (ahora *M. brunneum*) y *Beauveria bassiana*. La especie *M. anisopliae* fue descrita originalmente por Metschnikoff (1879) como *Entomophthora anisopliae* y luego transferida al nuevo género *Metarhizium* por Sorokin (1883). Los caracteres taxonómicos dominantes son la morfología de las estructuras esporulantes y se definió el género sobre la base de la disposición de los fialides, que llevan cadenas y columnas de conidios secos cilíndricos o ligeramente ovoides de color verde. Tulloch aceptó *M. anisopliae* y *M. flavoviride* como las dos únicas especies del género y distinguió dos formas en función del tamaño de los conidios. *M. flavoviride* fue descrito por primera vez por Gams y Rozsypal (1973) y la diferenciaron de *M. anisopliae* por sus conidios más anchos y de color gris a verde amarillento. Posteriormente, Rombach et al., (1986, 1987) presentó una clave sinóptica de las especies aceptadas de *Metarhizium*, incluidos los siguientes taxones: *M. album* Petch, *M. brunneum* Petch, *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin var. *anisopliae*, *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin var. *majus* (Johnston) Tulloch, *M. flavoviride* Gams y Rozsypal var. *flavoviride* y *M. flavoviride* Gams y Rozsypal var. *minus* Rombach, Humber y Roberts (Zimmermann et al., 2007).

1.1.4. *Metarhizium* como agente de control biológico

La historia de la descripción y primeras investigaciones científicas sobre el uso de *M. anisopliae* en el control biológico fueron realizadas por Steinhaus (1949) y más tarde por Muller-Kogler (1965). Su uso como agente biocontrolador contra insectos plaga se inició inmediatamente después de su detección. Entre 1880 y 1890, Metschnikoff y más tarde Krassiltschik llevaron a cabo varios estudios de control contra diversos insectos plaga en la antigua URSS. Incluso se produjeron grandes cantidades de esporas de *M. anisopliae* en un laboratorio cerca de Kiew (55 kg / 4 meses) que se utilizaron con éxito para el control de *Cleonus punctiventris*. Posteriormente, el hongo se utilizó contra el saltamontes, *Tomaspis varia*, en Trinidad y Tobago, y se reportaron excelentes resultados contra el escarabajo rinoceronte, *Oryctes rhinoceros*, en cocos en el Pacífico. Además, Muller-Kogler en 1965 comprobó la efectividad de este hongo contra otros insectos plagas como: *Scotinophara lurida*, *Aeneolamia flavilatera*, *Agriotes obscurus*, *Cleonus punctiventris*, *Oryctes rhinoceros*, *Popillia japonica*, *Alissonotum impresionicolle*, *Ostroais nubilagetum* y *Agrotoais Spp.* *M. anisopliae* es un organismo cosmopolita con uso real contra

muchos insectos plaga y con una distribución desde el ártico hasta los trópicos en insectos y suelos. Este hongo se ha aislado en muchos países de Europa, Asia, África, Centroamérica y Sudamérica, encontrándose en una amplia gama de insectos hospedadores, con un registro de 204 especies infectadas naturalmente de siete órdenes pertenecientes a los coleópteros y especialmente a los insectos plaga que viven en el suelo. Las plagas objetivo-actuales son las termitas, langostas, saltamontes, cucarachas, escarabajos, plagas de invernadero como moscas blancas, e incluso garrapata (Veen, 1968).

1.1.5. Mecanismo de patogenicidad de *M. brunneum*

Los hongos entomopatógenos juegan un papel esencial en el control de poblaciones de insectos en medios ambientes naturales y artificiales (Wang, C. y Wang, S. 2016; González-Hernández et al., 2019), lo que ha conducido un especial interés en estudiar el mecanismo de invasión de estos hongos hacia su hospedero. El proceso de infección de *M. anisopliae* es similar al de otros hongos entomopatógenos, donde, la vía de infección, de forma general, consta de los siguientes pasos: 1) fijación de la espora a la cutícula, 2) germinación y formación de apresorios, 3) penetración a través de la cutícula, 4) superación de la respuesta del huésped y reacciones de defensa inmunológica del huésped, 5) propagación dentro del huésped mediante la formación de cuerpos hifales o blastosporas (células similares a levaduras), y finalmente 6) superación del huésped muerto y producción de nuevos conidios (**Figura 1**) (Clarkson y Charnley, 1996; Gisbert Zimmermann., 2007; González-Hernández et al., 2020).

Generalmente, el hongo penetra a los insectos hospedadores a través del tegumento externo, específicamente los pliegues intersegmentarios y la unión se debe en gran medida a la hidrofobicidad de los conidios, así como a la superficie cuticular. La germinación y la infección exitosa dependen de varios factores, por ejemplo, la susceptibilidad del hospedero, las etapas del hospedador y factores ambientales como la temperatura y humedad. La germinación también puede verse influenciada por ciertos lípidos cuticulares de los insectos, tales como ácidos grasos de cadena corta, aldehídos, ésteres de cera, cetonas y alcoholes que pueden poseer actividad antimicrobiana. La cutícula también puede estar recubierta con sustancias que son importantes para el reconocimiento del hongo, como aminoácidos libres o péptidos, que pueden desencadenar la unión y la germinación. Antes de la penetración, los conidios de *M. anisopliae*, se diferencian en una estructura de adhesión denominada apresorio del cual emerge una hifa de infección y una placa de penetración. El proceso de penetración es mecánico, ayudado por la producción de varias enzimas, incluidas proteasas, quitinasas y lipasas. Como la quitina cuticular del

insecto está cubierta de proteínas y lípidos, las proteasas y estererasas son las que se liberan primero por el hongo y al final las quitinasas. La penetración de las capas de la cutícula y el comienzo de la invasión del huésped por el hongo se acompaña de varias actividades de respuesta del huésped, como la producción de fenoloxidasas, la formación de hemocitos y un proceso de melanización. Después de la penetración exitosa al insecto huésped, el hongo produce blastosporas o cuerpos hifales, que se distribuyen pasivamente en la hemolinfa del insecto, lo que permite que el hongo invada otros tejidos del huésped mediante un crecimiento vegetativo extenso. En esta etapa el hongo debe superar los mecanismos de defensa del insecto mediante la síntesis de proteasas que degradan elementos del sistema inmune humoral de este, así como de destruxinas y otras toxinas que causan parálisis al insecto dificultando su capacidad para alimentarse y moverse (Pal et al., 2007). Durante la invasión de todo el cuerpo del insecto, se agotan los nutrientes de la hemolinfa y el cuerpo graso, lo que conlleva al final del proceso de patogenicidad. Por último, el micelio emerge atravesando la cutícula del cadáver del hospedero para producir conidios, que luego se dispersan para infectar otros insectos y e iniciar otro ciclo de infección

Figura 1 (Clarkson y Charnley, 1996; Small y Bidochka, 2005; González-Hernández et al., 2020).

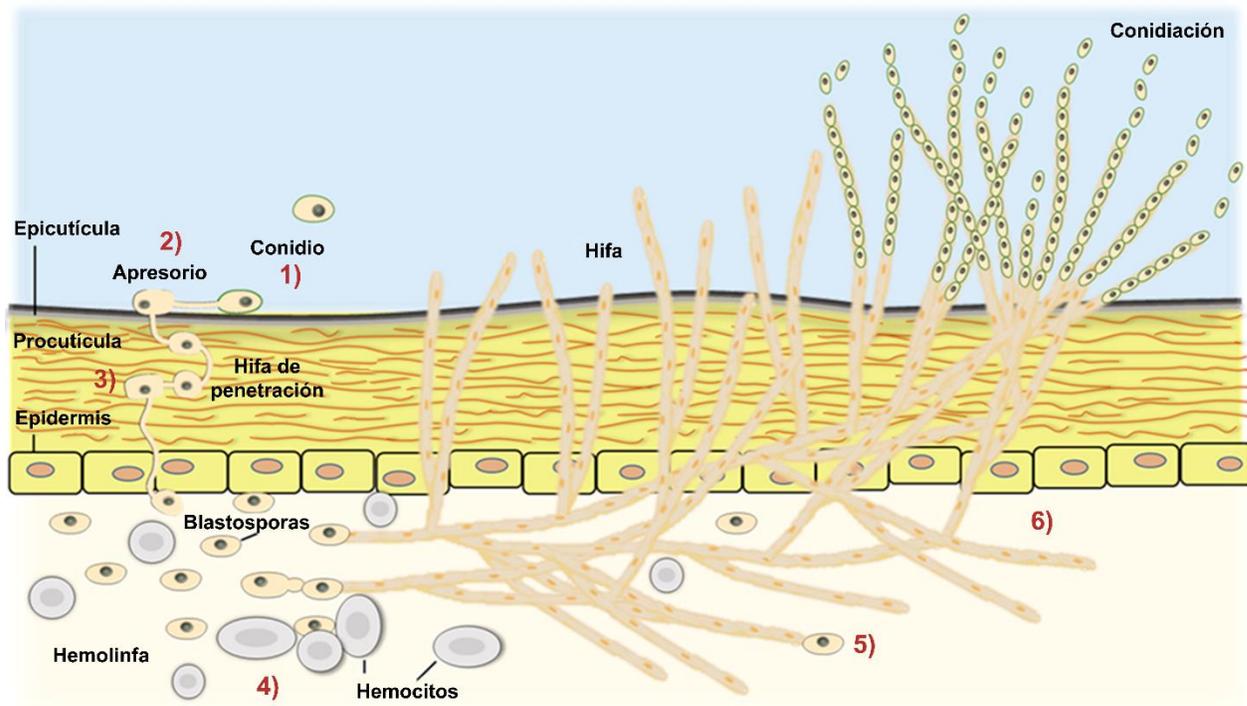


Figura 1. Representación esquemática de las etapas del proceso de infección de *M. brunneum* a su hospedero. (Ramanpreet K., et al., 2012; González-Hernández et al., 2020).

1.1.6. *Metarhizium* y su asociación con plantas

La rizosfera es una región del suelo, influenciada directamente por las secreciones radiculares de las plantas y es un sitio de interacciones complejas entre plantas y diferentes tipos de microorganismos como virus, bacterias y hongos. Dichas asociaciones son importantes para el ciclo de nutrientes y el funcionamiento del ecosistema (Bais et al., 2006; Yves Dessaux et al., 2016; Caroline Brunel et al., 2020).

Metarhizium robertsii es un habitante común de suelos en todo el mundo, el cual, ha sido estudiado y utilizado como un patógeno de insectos para el control biológico; sin embargo, también se ha observado que esta especie coloniza fácilmente la rizosfera de las plantas. Su estilo de vida bifuncional se ha descrito claramente por la expresión diferencial de genes tanto en presencia del insecto como en exudado de raíces de plantas (Wang et al., 2005; Pava-Ripoll et al., 2011). Un ejemplo, es la expresión diferencial de dos genes de adhesina MAD1 y MAD2; MAD1 es utilizado por el hongo para la adhesión a la cutícula del insecto mientras que MAD2 contribuye para la adhesión a las plantas (Barelli L. et al., 2011; Wyrebek y Bidochka, 2013). Además, se ha demostrado que *M. robertsii* produce una invertasa intracelular (MrINV), la cual juega un papel fundamental en la capacidad de este hongo para colonizar las raíces de las plantas mediante la hidrólisis de sacarosa a monosacárido (Liao et al., 2013).

Por otra parte, mediante el uso de la proteína verde fluorescente (GFP) y microscopía confocal, se estableció la capacidad de asociación de *Metarhizium*-GFP a la superficie de las raíces de las plantas *Phaseolus vulgaris* (frijol) y *Panicum virgatum* (pasto varilla), así como colonización endófitas (**Figura 2**). Adicionalmente, se observó una estimulación del desarrollo del vello de la raíz y mayor emergencia de pelos radiculares laterales en ambas plantas tratadas con *M. robertsii* en comparación con el control (sin tratamiento) (Ramanpreet K. et al., 2012).

Finalmente, en los últimos años se ha observado, que al colonizar *M. robertsii* de manera endófitas, este organismo tiene la capacidad de translocar nitrógeno marcado radioactivamente (^{15}N), previamente inyectado al insecto, a las raíces de plantas *P. vulgaris* y *P. virgatum*, y que este nitrógeno marcado era posteriormente incorporado a los aminoácidos de las plantas. Todo esto mostró una evidencia de la interacción que ocurre entre *Metarhizium*, insectos y plantas, donde las hifas y su crecimiento polarizado desempeñan un papel fundamental en la intercomunicación y transporte de nutrientes entre los miembros de esta interacción. (Behie et al., 2012; Barelli et al., 2019).

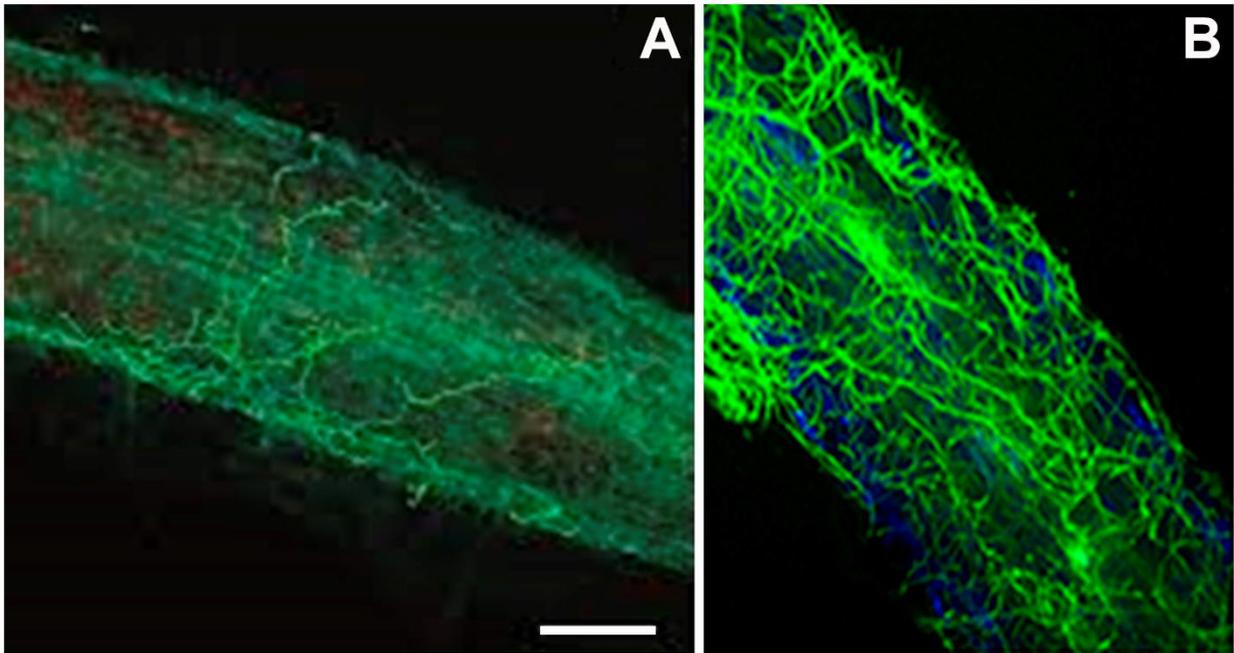


Figura 2. Asociación de *M. robertsii* expresando GFP con la raíz de **A)** *P. vulgaris* y **B)** *P. virgatum*. (Imágenes tomadas de Wyrebek et al., 2011 y Ramanpreet et al., 2012).

1.1.7. Crecimiento polarizado

El crecimiento celular polarizado consiste en la elongación de la membrana plasmática en uno o varios puntos definidos de la célula y este tipo de crecimiento está presente en algas, musgos, rizomas, células neuronales, tubos de polen y hongos filamentosos (Wessels, 1986; Heath, 1990).

La unidad vegetativa de crecimiento en los hongos filamentosos son las hifas, esta estructura consiste en una célula cilíndrica con una punta característica, cuya forma se aproxima a la de un hemielipsoide, pero que puede definirse matemáticamente con mayor precisión mediante la ecuación hifoidea. Esta descripción precisa de la forma permite entender cómo se genera la morfología en la región donde se concentra el crecimiento. Las hifas fúngicas se extienden por crecimiento de la punta, en un proceso que abarca el transporte polarizado de vesículas a los sitios de crecimiento, donde se fusionan para asegurar la deposición localizada de nuevo material de la pared celular y la membrana plasmática. En la región de la hifa donde se lleva a cabo el crecimiento polarizado se le denomina ápice, y en este lugar se establece el Spitzenkörper (Spk) o Centro Suministrador de Vesículas (VSC) (R. W. Roberson., 2020). El Spk es un cuerpo apical complejo compuesto de vesículas secretoras de diferentes tamaños, componentes del citoesqueleto y proteínas de señalización, los cuales están relacionados directamente con la direccionalidad y crecimiento de la célula (Bracker y Murphy., 1992; Riquelme et al., 1998; R. W.

Roberson., 2020). Se conoce que las vesículas y proteínas que son residentes en el ápice de la hifa son producidas en regiones distales de la misma y que el transporte a larga distancia de estos elementos cargo hacia el Spk, está dado a través del citoesqueleto microtubular, mientras que el transporte a corta distancia del Spk hacia la membrana plasmática apical se realiza por medio de los filamentos de actina

Figura 3.

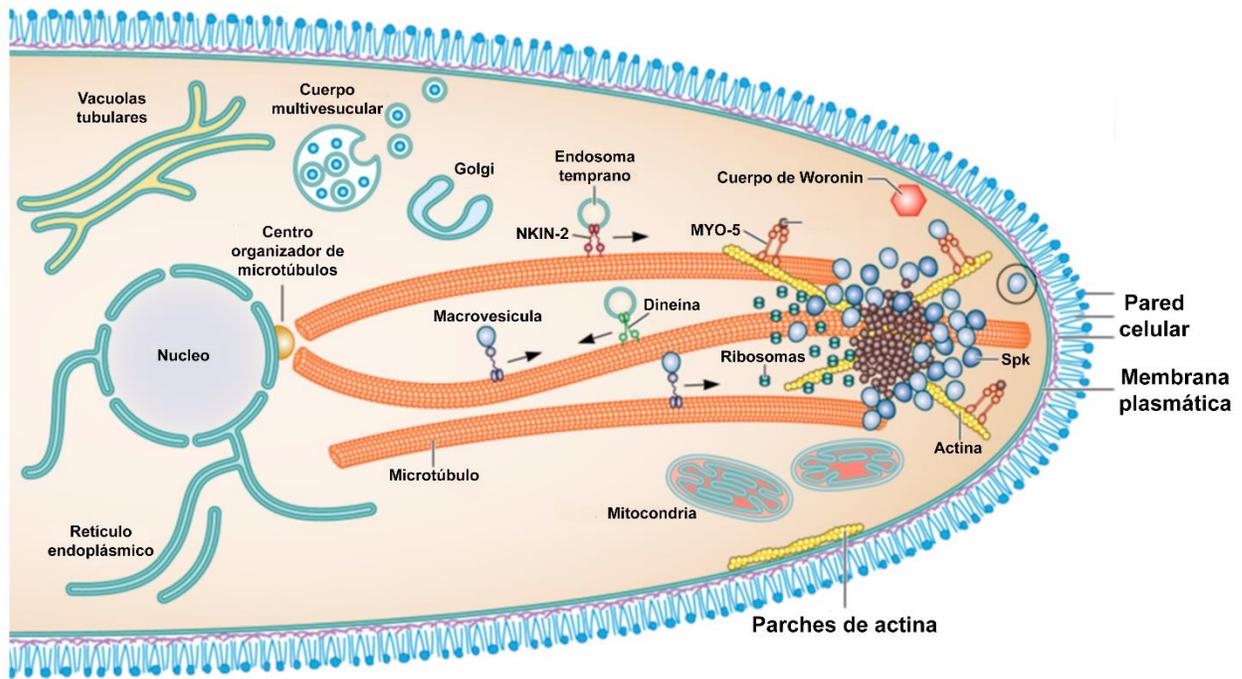


Figura 3. Representación esquemática de los diferentes componentes de una hifa que participan en el crecimiento polarizado (Esquema tomado y modificado de Riquelme et al., 2018).

1.1.8. Microtúbulos

Cómo en todas las células eucariotas, el citoesqueleto (microtúbulos [Mts], microfilamentos de actina, septinas y filamentos intermedios) de los hongos es una estructura dinámica que mantiene la forma, organización y brinda soporte a los componentes citoplasmáticos; controla los movimientos de la célula, y juega un papel importante en el transporte intracelular de vesículas y organelos. Un componente importante del citoesqueleto son los Mts, que son estructuras tubulares de ~25 nm de diámetro conformados por subunidades heterodiméricas de α - y β -Tubulina (Garvalov et al., 2006). Estas proteínas globulares se ensamblan alternamente para formar un protofilamento lineal. Los heterodímeros están

alineados cabeza a cola para formar polímeros lineales de 13 protofilamentos que corren longitudinalmente a lo largo del microtúbulo (Mt) y se asocian lateralmente para formar la pared de este **Figura 4** (Oakley y Morris, 1980; Derksen y Emons, 1990, Haimo, 1997; Nédélec et al., 2003). Los Mts poseen polaridad estructural con dos distintas terminaciones: un extremo positivo que es más dinámico, ya que ahí los Mts se polimerizan y despolimerizan rápidamente, mientras que el extremo menos dinámico es el negativo y se encuentra localizado en los Centros de Organizadores de los Microtúbulos (MTOC) (Oakley y Morris, 1980; Derksen y Emons, 1990, Haimo, 1997; Nédélec et al., 2003; Oakley, 2000; Alberts et al., 2015). La mayoría de los Mts se establecen paralelos al eje longitudinal de las células, pero perpendiculares a las mitocondrias, núcleos y vesículas secretoras (Howard y Aist, 1980; Haimo, 1997; Mouriño-Pérez et al., 2006; Callejas-Negrete et al., 2015).

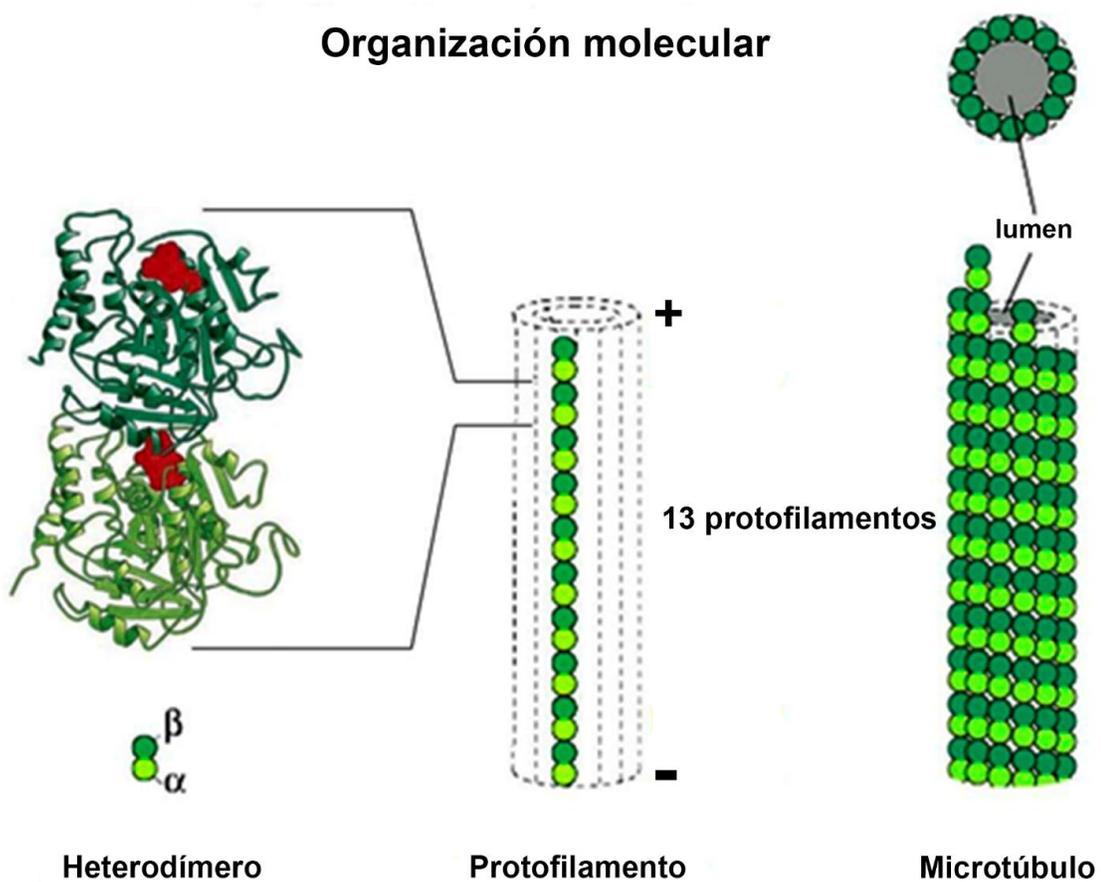


Figura 4. Diagrama de la estructura y composición de los microtúbulos. Mts son estructuras tubulares de ~ 25 nm de diámetro conformados por subunidades de α - y β -tubulina ensambladas alternadamente para formar un protofilamento. Trece protofilamentos alineados cabeza y cola forman un microtúbulo con polaridad estructural (Imagen adaptada de Alberts et al., 2014).

1.1.9. Antecedentes directos

Se han estudiado los microtúbulos en distintos hongos filamentosos, siendo uno de ellos *N. crassa*, donde se ha examinado el comportamiento de éstos durante la expansión celular y la ramificación. Los Mts citoplasmáticos son largos y se arreglan longitudinalmente en toda la hifa principal; en el caso de hifas ramificadas rara vez se observan Mts rectos, mostrando una curvatura helicoidal y una tendencia a entrelazarse, formando una red dispersa en todo el citoplasma. A medida que la rama crece, el número de Mts aumenta significativamente por la migración y polimerización de los Mts de la hifa principal y nucleación *de novo*. (Freitag et al., 2004; Mouriño-Pérez et al., 2006). Por otra parte, se ha descrito que la cantidad de Mts en *A. nidulans* es menor en comparación con *N. crassa*. Usando microscopía confocal, se monitoreó la dinámica de Mts en una cepa de *A. nidulans* que expresa α -Tubulina-GFP. Se demostró que los Mts son paralelos al eje de la hifa, se extienden hasta la punta y a menudo inicia su polimerización y crecimiento cerca de la corteza celular. Los MT de las puntas de las hifas son muy dinámicos y se alargan predominantemente hacia los ápices. También se observó que los movimientos dominantes hacia la punta de los Mts y su rápida despolimerización predicen un gradiente alto de subunidades de tubulina (Sampson y Heath, 2005; Riquelme et al., 2018). En ambos organismos, los Mts, juegan un papel importante en brindar soporte a los componentes citoplasmáticos y en el transporte intracelular de vesículas y organelos (núcleos, mitocondrias, peroxisomas, entre otros) (Ramos-García SL. et al., 2009; Callejas-Negrete et al., 2015; Neuhaus et al., 2016; Salogiannis et al., 2016). En el caso de hongos entomopatógenos, la descripción de la dinámica del citoesqueleto microtubular y sus proteínas motoras ha sido muy poca o nula. En este sentido, solo se ha reportado que la delección del gen de la β -tubulina en *M. acridum* causa alteración en el crecimiento del hongo, así como en la producción de conidios y su patogenicidad (Zhang et al., 2017)

En estudios previos se encontraron seis genes tipo 2-nitropropano dioxigenasa (2np) dentro del genoma de *M. brunneum*, de los cuales dos son inducidos en presencia de nitroalcanos y otros dos en presencia de la cutícula del insecto hospedero (Ramírez-Cuellar, 2014). Las proteínas codificadas por estos genes pueden metabolizar nitroalcanos (compuestos producidos por plantas e insectos) para generar fuentes de carbono y nitrógeno (Padilla-Guerrero, 2010; Villa-Martínez, 2012). En la secuencia de aminoácidos de las proteínas 2NP se encuentra la secuencia PTS1, que es una señal de localización peroxisomal, indicando que estas enzimas se encuentran compartimentalizadas en este organelo que, además de tener un papel esencial en el metabolismo lipídico, también participa en la desintoxicación celular. Se tiene una cepa transformante que contiene 2NP4 etiquetada con la proteína verde fluorescente (GFP) y una segunda cepa que contiene una proteína integral de membrana de los peroxisomas KAT con eGFP. Como se ha reportado

en *A. nidulans*, que los peroxisomas utilizan al citoesqueleto microtubular para su transporte mediado por el complejo dineína/dinactina (Neuhaus et al., 2016; Salogiannis et al., 2016), en este trabajo estamos interesados en estudiar la dinámica y organización del citoesqueleto microtubular en el hongo *M. brunneum*, para conocer su asociación con diferentes elementos cargo como los peroxisomas, además de cuerpos lipídicos, mitocondrias y vesículas, esto con la finalidad de entender el papel y los mecanismos de distribución intracelular de *M. brunneum* en la fisiología, en su actividad biopesticida y como estimulador del crecimiento de plantas, contribuyendo a encontrar nuevas herramientas genéticas que conduzcan a cepas de *Metarhizium* más eficientes para llevar a cabo estas funciones. Esto impactará en fomentar e incrementar el uso de tecnología amable con el ambiente como biopesticida y mejorador del crecimiento de plantas, disminuyendo con ambas actividades los costos de la producción agrícola relativos al control de plagas y fertilización de suelos.

1.2. Justificación

Debido a que existe poca información acerca del citoesqueleto del hongo entomopatógeno *M. brunneum*, estamos interesados en estudiar la dinámica y organización del citoesqueleto microtubular, para conocer su asociación con diferentes elementos cargo como los peroxisomas, cuerpos lipídicos, mitocondrias y vesículas, esto con la fin de entender el papel y los mecanismos de distribución intracelular de *M. brunneum* en la fisiología, en su actividad biopesticida y como estimulador del crecimiento de plantas.

1.3. Hipótesis

Los Mts participan en la distribución de organelos, como peroxisomas, cuerpos lipídicos y mitocondrias, hacia regiones específicas para mantener el crecimiento y desarrollo del hongo *M. brunneum*.

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Describir la dinámica y organización del citoesqueleto microtubular en relación con el transporte intracelular en el hongo entomopatógeno *M. brunneum*.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Describir la localización y dinámica de los Mts en diferentes estadios de *M. brunneum*.
- Determinar la asociación que existe entre los Mts con los peroxisomas y otros elementos cargo como vesículas, cuerpos lipídicos y mitocondrias.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Organismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento de *M. brunneum*

2.1.1. Cepas y vectores de clonación

Las cepas de *M. brunneum* y *E. coli* así como los vectores de clonación utilizados en este trabajo se enlistan en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Lista de cepas (*M. brunneum* y *E. coli*) y vectores utilizados en este trabajo.

Organismo/plásmido	Genotipo	Origen
<i>Metarhizium brunneum</i> Caro19	Silvestre	Centro Nacional de Referencia, Colima, México.
<i>M. brunneum</i> Caro19 KAT-eGFP	Transformante	Universidad de Guanajuato
<i>M. brunneum</i> Caro19 2np4-eGFP	Transformante	Universidad de Guanajuato
<i>Escherichia coli</i> JM109	recA1 endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-,mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15	Promega
pAGICA-113	Vector binario para <i>Agrobacterium</i> . Promotor TrpC controlando al gen de resistencia a nourseotricina, promotor TEF para subclonar bajo su control ORFs de interés dentro de los bordes izquierdo y derecho T-DNA.	Universidad de Guanajuato
pMF309	<i>Pccg-1-Bml⁺-sgfp⁺</i>	Freitag et al., 21004

2.1.2. Medios y condiciones de crecimiento para *M. brunneum*

Para el mantenimiento y crecimiento de *M. brunneum* se utilizó, medio mínimo (MM) descrito por Bartnicki-García y Nickerson (1962), que contiene por cada litro, 20 g de glucosa, 3 g de KH₂PO₄, 1.8 g de (NH₄NO₃), y 20 mL de concentrado de sales 50X (MgSO₄ 2.5%, ZnSO₄ 0.009%, FeSO₄ 0.005%, MnSO₄ 0.001% y CuSO₄ 0.002%) y en el caso del medio sólido se le adicionaron 20 g de agar por cada litro de medio. También se usó medio Dextrosa-Sabouraud, este medio contiene peptona de carne 0.5%, peptona de

caseína 0.5% y dextrosa al 2%. En el caso del medio sólido se le adicionaron 20 g de agar por litro de medio. Las condiciones de crecimiento para la esporulación de *M. brunneum*, se inocularon 500 esporas por caja Petri en medio mínimo y se incubó a 28°C de 6 a 10 días. Para la selección de transformantes, se le adicionó al medio higromicina a una concentración final de 300 µg/mL. Para obtener micelio se inocularon 5×10^5 esporas en 200 mL de medio líquido Dextrosa-Sabouraud y se incubó a 28°C durante 4 días en agitación constante de 150 rpm en un agitador orbital marca LAB-LINE.

2.1.3. Obtención de conidios

Para cosechar conidios de placas Petri previamente inoculadas, se agregaron 4 mL de agua destilada estéril con Tritón X-100 al 0.1%, los conidios se removieron de la superficie haciendo pasar suavemente una espátula de vidrio previamente esterilizada. Utilizando una micropipeta de 1000 µl se colectó la suspensión de esporas separando los restos celulares mediante filtración, en un tubo Falcón estéril con un embudo con tela (Corporacion Magitel, C.A). Dicha suspensión se lavó dos veces con agua destilada estéril con Tritón X-100 al 0.01% centrifugándose 10 min a 4000 rpm en cada lavado.

2.1.4. Obtención de micelio en medio líquido

El micelio ya crecido después de 4 días de incubación se colectó por filtración con un embudo Buchner con papel filtro de poro grueso, en un sistema de vacío en condiciones de esterilidad. El micelio colectado se lavó con abundante agua destilada estéril. Finalmente, el micelio se distribuyó en papel aluminio y se almacenó a -70°C.

2.1.5. Medios y condiciones de crecimiento para *E. coli*

El medio Luria-Bertani (LB) contiene por litro; 10 g Bacto-Triptona, 5 g Extracto de Levadura y 10 g de Cloruro de Sodio (NaCl). Cuando se requirió medio sólido se agregaron 20 g de agar y finalmente la preparación se esteriliza por autoclave. Para la identificación de colonias recombinantes posterior a la transformación en *E. coli* (Sambrook y Russell, 2001), al medio LB se suplementó con IPTG (100 mM) y 2.5

mL de X-Gal 2% en formamida (SIGMA). Para la selección de clonas por resistencia a antibiótico, se agregó al medio ampicilina (100 g/mL) o kanamicina (50 g/mL) según fue el caso. Los inóculos se sembraron utilizando palillos estériles incubándose a 37°C durante 18 h. Los cultivos de bacterias para la obtención de plásmidos se realizaron en medio LB líquido con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C toda la noche en un agitador orbital (LAB-LINE) a 150-200 r.p.m.

2.2. Análisis bioinformático

Las secuencias nucleotídicas y proteicas se analizaron utilizando el programa Lasergene 12.0, y las comparaciones se realizaron en las bases de NCBI genoma database (www.ncbi.nlm.nih.gov) y www.ebi.ac.uk.

2.3. Extracción de DNA genómico de *M. brunneum*

La extracción de DNA genómico de las cepas de interés se llevó a cabo utilizando micelio previamente cultivado en MM líquido o Dextrosa-Saboraud a 30°C durante 4 días. El micelio se filtró y se lavó con agua destilada estéril para su almacenamiento a -80°C. Posteriormente el micelio congelado se transfirió a un mortero frío y estéril, donde se agregó nitrógeno líquido para su trituración hasta obtener un polvo fino. El polvo fino se procesó con el Kit DNeasy® plant (QUIAGEN, Cat. No. 69104) siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante.

2.4. Construcción de casetes para marcaje de la β -Tubulina

2.4.1. Diseño de oligonucleótidos para el marcaje de la β -Tubulina con la proteína verde fluorescente (eGFP)

Para realizar el marcaje de la proteína β -Tubulina, se realizó el análisis bioinformático de la secuencia del marco de lectura abierto (ORF) del gen *β -tubulina* de *M. brunneum*. Una vez analizada la secuencia se diseñó un par de oligonucleótidos; el primer oligonucleótido denominado oligo sentido (β -Tub-SpeI-F)

contiene los primeros 28 pb de la región 5' del gen incluyendo la secuencia que codifica para la metionina, adicionándole en el extremo 5' secuencias de reconocimiento para la enzima de restricción SpeI. El segundo oligonucleótido anti-sentido (β -Tub-eGFP-R), contiene 20 pb, de la región terminal del ORF de la *β -tubulina* excluyendo el codón de paro y a esta secuencia se le adicionó 30 pb correspondiente al extremo 5' del ORF de la *egfp*. A su vez se diseñó otro par de oligonucleótidos sentido y anti-sentido para amplificar el ORF de la *egfp*; el oligo sentido contiene 29 pb de la región 5' de la *egfp*, y el anti-sentido 19 pb de la región terminal del ORF de la *egfp* incluyendo el codón de paro más la adición de secuencias de reconocimiento para la enzima de restricción SpeI. En la **Tabla 2** se enlistan los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo.

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
β -Tub-SpeI-F	5'-ggactagtagcgtgagattgtgagtc-3'
β -Tub-eGFP-R	5'-ggtgaacagctcctcgcccttgctcacatctctaaaggttcaacag- 3'
eGFP-F	5'-atggtgagcaagggcgaggagctgttcac- 3'
eGFP-SpeI-R	5'-ggactagtttactgttacagctcgtccatgc- 3'

2.4.2. Amplificación por PCR del marco de lectura abierto (ORF) del gen *β -tubulina*

Para la amplificación del ORF de la *β -tubulina*, se realizó una mezcla de reacción que contenía 29.75 μ L de H₂O HPLC, 5 μ L de 10X PCR Buffer LA Tak, 4 μ L de MgCl₂ 25 mM, 4 μ L dNTPs 2.5 mM, 2.5 μ L del oligonucleótido sentido β -Tub-SpeI-F 10 μ M, 2.5 μ L del oligonucleótido antisentido β -Tub-eGFP-R 10 μ M, 2 μ L de DNA genómico (200 ng), 0.25 μ L de polimerasa LA Takara™ (5 units/ μ L), en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler- Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94°C más 30 ciclos de 30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 55°C de alineamiento y 2 min a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final. (Figura 5a).

2.4.3. Amplificación del ORF de la *egfp*

Para la amplificación del ORF de la *egfp*, se realizó la siguiente mezcla de reacción: 30.75 μL de H_2O HPLC, 5 μL de 10X PCR Buffer LA Tak, 4 μL de MgCl_2 25 mM, 4 μL dNTPs 2.5 mM, 2.5 μL del oligonucleótido sentido eGFP-F 10 μM , 2.5 μL del oligonucleótido antisentido eGFP-SpeI-R 10 μM , 0.5 μL del plásmido pOC-01 (100 ng) como template y 0.25 μL de polimerasa LA Takara™ (5 units/ μl), en un volumen final de 50 μL . La mezcla de reacción se colocó en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler- Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94°C más 30 ciclos de 30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 60°C de alineamiento y 1 min a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 5 min a 72°C de extensión final (Figura 5b).

2.4.4. PCR de doble unión para la construcción del casete β -*tubulina-egfp*

Para la amplificación de la fusión β -*tubulina-egfp* se agregaron 28.3 μL de H_2O HPLC, 5 μL 10X PCR Buffer LA Tak, 4 μL de MgCl_2 25 mM, 4 μL dNTPs 2.5 mM, 2.5 μL del oligonucleótido sentido β -Tub-SpeI-F 10 μM , 2.5 μL del oligonucleótido antisentido eGFP-SpeI-R 10 μM , 2.45 μL de DNA template del ORF β -*tubulina* (100 ng) y 1 μL del ORF *egfp* (100 ng) y 0.25 μL de polimerasa LA Takara™ (5 units/ μl), en un volumen final de 50 μL . La mezcla de reacción se colocó en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler- Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94°C más 30 ciclos de 30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 58°C de alineamiento y 3 min a 72°C de extensión, terminando con un ciclo de 7 min a 72°C de extensión final (Figura 5c).

2.4.5. Purificación de los productos de restricción y PCR

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (bromuro de etidio al 0.1%) a 80V durante 45 min. Las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados y cassettes se purificaron mediante el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®), siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante.

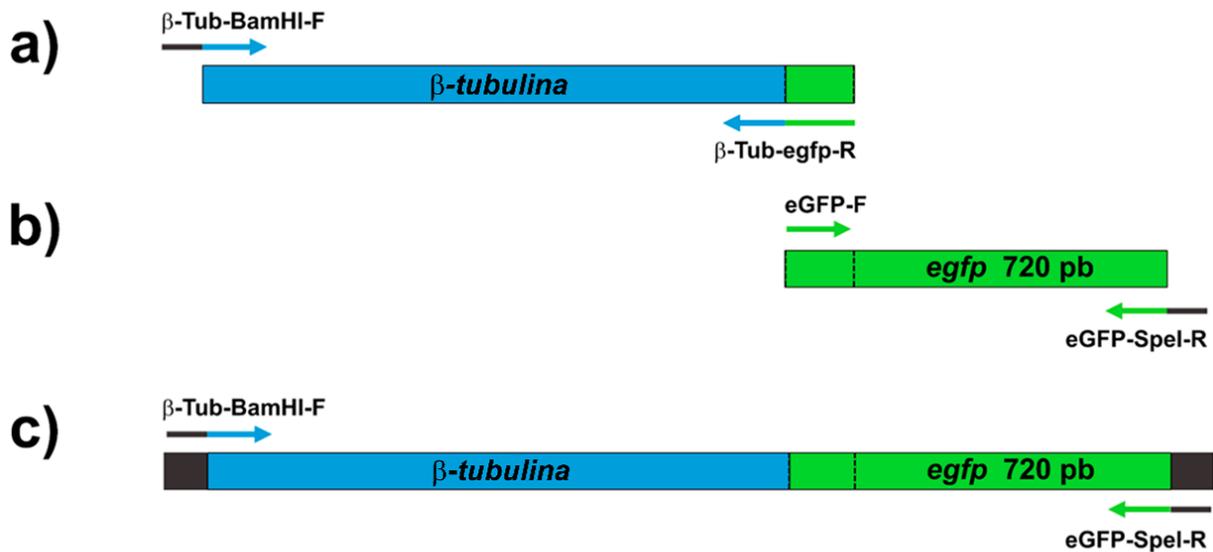


Figura 5. Esquema de PCR de fusión para el marcaje fluorescente de la proteína β -Tubulina en el hongo entomopatógeno *M. brunneum*. **a)** Barra en azul representa la amplificación del marco de lectura abierto del ORF β -*tubulina* al cual se le adicionó un fragmento de aproximadamente 30 nucleótidos de la *egfp* que está representado en barra color verde. **b)** Amplificación del ORF del gen que codifica a la proteína verde fluorescente. **c)** PCR de doble unión del ORF β -*tubulina* con el ORF de la *egfp*.

2.4.6. Clonación del casete β -*tubulina-egfp* en el vector de almacenamiento pGEM (pOC02-AH01)

Con la finalidad de mantener almacenado el casete β -*tubulina-egfp* se procedió a clonar en el vector de almacenamiento pGEM[®]-T Easy Vector Systems (PROMEGA), siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante.

2.4.7. Construcción del plásmido β -*tubulina-egfp*+pAGICA-113 (pOC03-AH03)

Para la construcción del vector de expresión que contenga los Mts etiquetados con la eGFP se realizó una restricción de los vectores pAGICA-113 (vector de expresión para *M. brunneum*) y pOC03-AH03 (β -*tubulina-egfp*-pGEM). Para lo anterior, la mezcla de reacción contenía; 19 μL de H₂O HPLC, 5 μL CutSmart, 1 μL de la enzima de restricción Spel (20,000 u/mL) y 25 μL del vector, esto se realizó para ambos vectores, incubándose toda la noche a 37°C. Pasada la incubación se agregó 1 μL fosfatasa alcalina (5 unidades) al vector pAGICA-113 y se incubó 1 h más. Finalmente, ambos vectores se sometieron a una electroforesis y

posterior purificación de los fragmentos correspondientes bajo las condiciones descritas anteriormente. La ligación de pAGICA-113 con el casete de *β-tubulina-egfp*, se realizó utilizando 400 unidades de T4 DNA Ligasa® de New Englan Biolabs y se realizaron a una proporción de 1:3 y 1:5 (Vector/Inserto), dejando incubar toda la noche a 16°C. Los productos de la reacción se transformaron por choque térmico (protocolo estándar descrito por Sambrook y Russell, 2001) en células competentes JM109 de *E. coli*, utilizando como medio de selección LB-Kanamicina. Las colonias obtenidas se transfirieron a medio LB líquido con Kanamicina y se incubaron toda la noche a 37 °C a 150 rpm. Finalmente, se realizó la extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001), lo anterior con el fin de comprobar la inserción del fragmento *β-tubulina-egfp* en el vector pAGICA-113 por restricción con las endonucleasas *SpeI* y *XhoI*.

2.5. Transformación de *M. brunneum* por electroporación

2.5.1. Obtención de protoplastos

Para la obtención de protoplastos se siguió el protocolo descrito por Goettel y col. (1990) con modificaciones realizadas por Morales-Hernández (2006). Se inocularon 5×10^5 esporas/mL en 100 mL de medio líquido Dextrosa-Sabouraud en un matraz Erlen Meyer de 500 mL, se incubó por 40 horas a 28°C a 160 rpm en un agitador orbital (LAB-LINE). El micelio se colectó por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min en condiciones de esterilidad; éste se lavó dos veces con agua destilada estéril y una vez con medio de digestión MD (sorbitol 1.2 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.0); el micelio se resuspendió en una mezcla enzimática de β -glucanasas [Yeast lytic enzyme 0.05% (SIGMA); Lysin Enzyme *Trichoderma harzianum* 0.05 % (SIGMA)] disuelto en MD; se incubó por 3 horas a 28°C, en agitación a 60 rpm.

Los protoplastos se separaron por filtración a través de una malla de fibra de poliéster en la boca de un tubo Falcón de plástico estéril de 50 mL; los protoplastos se colectaron por centrifugación a 1250 rpm durante 10 min; se lavaron una vez con MD y una vez con medio de transformación TM (Sorbitol 1M; Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; CaCl_2 20 mM). Finalmente, se resuspendieron en 400 μl de TM.

2.5.2. Transformación por electroporación

Para realizar la transformación por electroporación de *M. brunneum* se utilizaron conidios y protoplastos, los cuales fueron cuantificados previamente por medio de una cámara de Neubauer para obtener una concentración final de 2×10^7 conidios o protoplastos en 200 μL de medio de transformación y 2 μg del vector a transformar (pOC03-AH03 o pMF357). Posteriormente se mezcló suavemente por pipeteo, se pasaron a una celda de electroporación del No. 2 y se dejó incubar 10 min en hielo. Posteriormente la muestra se sometió a un choque eléctrico en un electroporador Bio-Rad Gene Pulser bajo las siguientes condiciones: 1.5 kV, 25 μF de capacitancia y 800 Ω de resistencia interna. Inmediatamente después de haber dado el choque eléctrico se adicionó 1 mL de medio de regeneración y se incubó en hielo durante 10 min. El contenido de la celda se colocó en un tubo Falcon de 50 mL adicionando 9 mL de medio de regeneración para un volumen final de 10 mL, se incubó a 28°C durante 2h. Una vez finalizada la incubación, se adicionaron 10 mL de MD sólido adicionado con el marcador de selección nourseotricina o higromicina mezclando por inversión. Primero se colocó la solución de esporas en el centro de la placa Petri y el medio de regeneración sólido sobre la solución previamente añadida. La placa Petri se agitó suavemente hasta obtener una mezcla homogénea y se incubó por 24h a 28 °C, al finalizar la incubación se adicionaron 100 μL de Tritón X-100 a una concentración del 0.01%, nuevamente se incubaron las placas Petri por 12 días o hasta que se observaron colonias.

2.6. Microscopia y análisis de imágenes

Para las observaciones de las cepas con las proteínas de interés etiquetadas con GFP, se realizó microscopia confocal de barrido láser, con el equipo Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan), por medio de la técnica de agar invertido para la manipulación y visualización de las células **Figura 6** (Hickey et al., 2005). Se tomaron imágenes y videos utilizando dos canales simultáneamente: uno de luz fluorescente usando el láser de argón/2 con filtros eGFP (excitación a 488 nm; emisión a 520 nm) y otro de luz transmitida para obtener imágenes en contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés Differential Interference Contrast). Se usó el objetivo 60X Plan-Apocromático de inmersión en aceite (1.42 A.N.).

Se tomaron imágenes y videos de la expresión individual de la β -Tubulina-GFP y de las proteínas KAT-eGFP y 2NP4 (proteínas de membrana y residentes de los peroxisomas, respectivamente). Por otra parte, se

analizaron imágenes y videos de cepas teñidas con fluoróforos de interés como BODIPY (0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (colorante de cuerpos lipídicos) utilizando el filtro de excitación a 488 nm y de emisión a 510 nm, el colorante lipofílico que tiñe membranas FM4-64 (7 μM) utilizando el filtro Texas Red (excitación 543 nm; emisión 519 nm), blanco de calcoflúor (0.01%) para teñir la pared celular utilizando el filtro de 405nm de excitación, y Mitotracker green (30 μM) para observar mitocondrias (excitación 488 nm; emisión 510 nm) con la finalidad de determinar las asociaciones existentes entre los microtúbulos y elementos cargo.

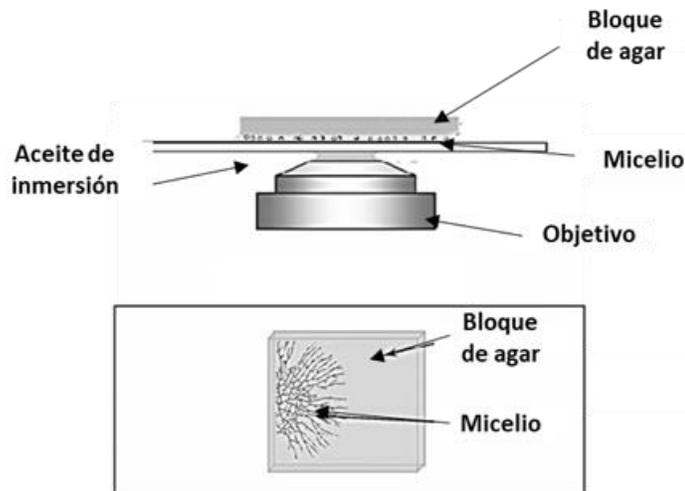


Figura 6. Método del bloque de agar invertido consiste en cortar un fragmento del medio agar con micelio y colocarlo de manera invertida sobre el cubreobjetos (Modificada de Hickey et al., 2004).

2.7. Ensayos con drogas despolimerizadoras de los Mts

Para establecer la asociación entre la integridad del citoesqueleto microtubular con los elementos cargo como cuerpos lipídicos, peroxisomas y mitocondrias, se utilizó el benomilo, que es una droga que despolimeriza los Mts. La cepa con la proteína marcada con GFP, se expuso a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de benomilo (concentraciones en las que el crecimiento de la hifa se reduce el 50%), así como hifas de *M. brunneum* teñidas con diferentes colorantes vitales y se observaron por microscopía confocal para describir el efecto de esta droga en la localización y dinámica de los diferentes elementos cargo. Se realizaron observaciones, antes, durante y después de la exposición, para establecer la comparación.

2.8. Medición de los movimientos de peroxisomas y cuerpos lipídicos

Con la finalidad de determinar los movimientos de peroxisomas y cuerpos lipídicos se analizaron distintos videos (previamente grabados en el microscopio confocal) de 6 a 10 hifas independientes de ~65 μm de longitud mediante el programa ImageJ FIJI. El cual es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health (Collins, 2007). En los videos se cuantificó la velocidad de desplazamiento de las partículas en presencia y ausencia de BML, posteriormente se realizaron análisis utilizando gráficas de barras de cada uno de los movimientos.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Análisis bioinformático y construcción de casetes de transformación para marcaje con proteína fluorescente

Con la finalidad de analizar y estudiar el gen de la β -tubulina de *M. brunneum*, se llevó a cabo un BLAST en la base de datos NCBI-BLAST®, utilizando como base la secuencia nucleotídica de la β -tubulina de *N. crassa* (NCU04054) y de *Saccharomyces cerevisiae* (YFL037W). El resultado de esta búsqueda estableció una secuencia de 1,768 pb que codifica para una proteína de 448 aa (MAN_04224; ARSEF 549), y el análisis comparativo con sus ortólogos mostró que el porcentaje de identidad que comparte la β -Tubulina de *M. brunneum* con la β -Tubulina de *N. crassa* fue del 96%, mientras que con *S. cerevisiae* y *Magnaporthe oryzae* fue del 78% y 97% respectivamente, como se puede ver en la **tabla 3**.

Tabla 3: Porcentaje de identidad de β -Tubulina con sus diferentes homólogos y ortólogos.

Organismo	Código	Nombre	Tamaño (No. de aminoácidos)	% de identidad
<i>M. brunneum</i>	MAN_04224; ARSEF 549	Cadena β -Tubulina	448 aa	--
<i>N. crassa</i>	NCU04054	Cadena β -Tubulina	447 aa	96.40%
<i>S. cerevisiae</i>	YFL037W	Cadena β -Tubulina	457 aa	78.48%
<i>M. oryzae</i>	KU953074	Cadena β -Tubulina	143 aa	97.20%

El análisis de dominios utilizando las herramientas en línea InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), UniProt (<https://www.uniprot.org>) y Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), reveló que la proteína β -Tubulina presenta un dominio conservado Tubulina (posición 3-212). Este dominio se encuentra en todas las cadenas de tubulina, así como en la familia de proteínas bacterianas FtsZ. Estas proteínas están involucradas en la formación de polímeros. Como se sabe, la tubulina es el componente principal de los microtúbulos, mientras que FtsZ es la proteína formadora de polímeros de la división celular bacteriana. Además, posee un dominio Tubulina C (posición 246 – 383) estableciéndose este dominio en el C-terminal (**Figura 7**).

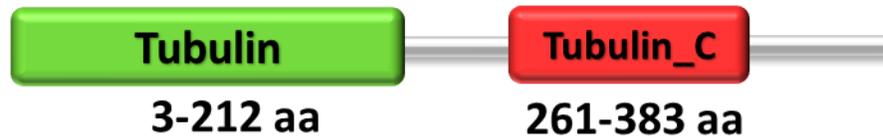


Figura 7. Dominios de la proteína β -Tubulina de *M. brunneum* (Tubulina y Tubulina_C). Esquema extraído de Pfam (<http://pfam.xfam.org/protein/A0A0B4FP38>).

3.1.1. Amplificación de los ORFs de la β -tubulina de *M. brunneum* y *egfp*

Para iniciar con la construcción del casete para el marcaje fluorescente de la β -tubulina, se realizó la amplificación del ORF de este gen. El DNA extraído previamente de *M. brunneum* se utilizó como cadena patrón para la reacción, usando como cebadores los oligonucleótidos β -Tub-SpeI-F y β -Tub-eGFP-R, y la reacción de PCR se sometió a las condiciones descritas en materiales y métodos.

El producto de la reacción se le realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y como podemos ver en la **figura 8A** se observó una banda de amplificación del tamaño esperado de aproximadamente 1768 pb correspondiente β -tubulina más 30 nucleótidos de la secuencia de la región 5' de la *egfp*, la cual servirá como fragmento homólogo para la recombinación con la región de la secuencia de la *egfp*.

Por otra parte, para la amplificación de la *egfp*, se utilizó como cadena patrón el vector pOC-01, el cual fue previamente construido a partir del ORF de *egfp* clonado en el vector de almacenamiento pGEM T Easy de PROMEGA. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR fueron eGFP-F y eGFP-SpeI-R bajo las condiciones descritas en materiales y métodos.

Como se muestra en la **Figura 8B**, después de someter a electroforesis el producto de la reacción, se observó una banda de amplificación del tamaño esperado de 720 pb. Posteriormente los fragmentos amplificados se purificaron mediante el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®), para ser utilizados para la reacción de PCR de fusión.

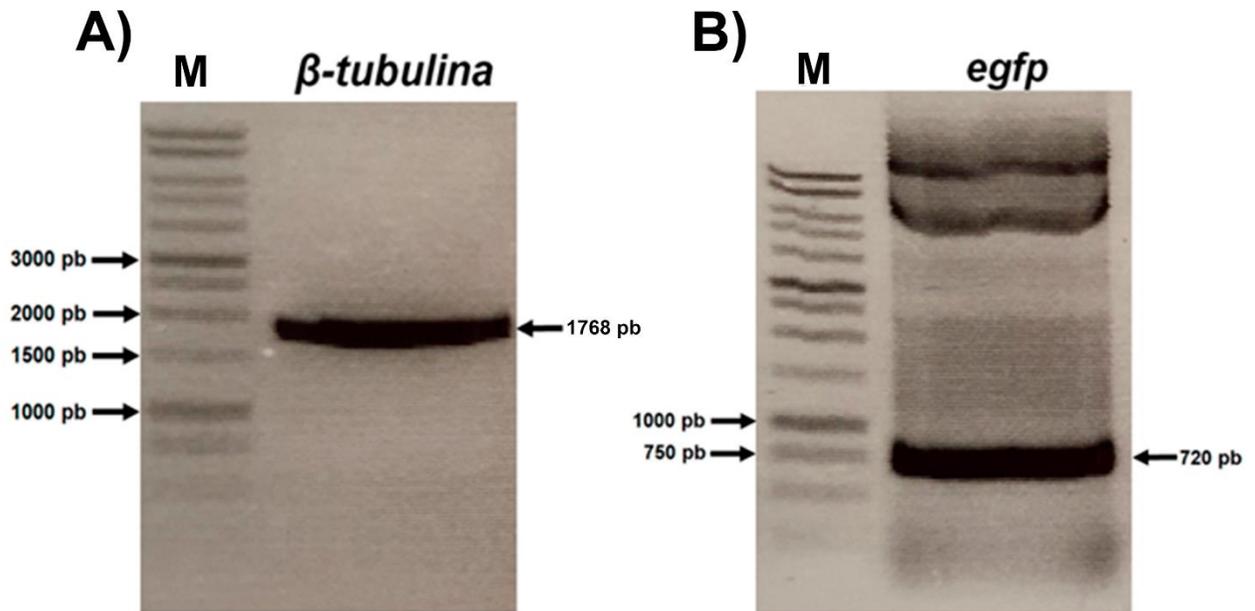


Figura 8. Amplificación por PCR de los ORFs del gen de la β -tubulina y *egfp*. En **A)** corresponde a la amplificación obtenida por PCR de la β -tubulina a partir de DNA genómico de la cepa Caro19 de *M. brunneum* con un tamaño aproximado de 1768 pb y en **B)** el amplicón del ORF de *egfp* de 720 pb obtenido a partir del plásmido pOC-01. **M** corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA leader.

3.1.2 PCR de doble unión para la construcción del casete β -tubulina-*egfp*

Una vez amplificados y purificados los ORFs, de la β -tubulina y de la *egfp*, se determinó la concentración de cada uno de ellos, ya que ambos fragmentos se utilizaron como cadena patrón en una proporción 1:1 para la reacción de PCR de doble unión descrito por Yu y col., (2004). La cantidad de 150 ng del DNA de la β -tubulina y 150 ng de la *egfp* fueron sometidos a 30 ciclos de reacción, usando los oligonucleótidos específicos β -Tub-SpeI-F y eGFP-SpeI-R como se describe en material y métodos.

El producto de la reacción se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y como se observa en la **Figura 9** se obtuvo una banda de amplificación de aproximadamente 2485 pb el cual corresponde al casete que contiene a los 1768 pb de la β -tubulina y los 720 pb de la *egfp*.

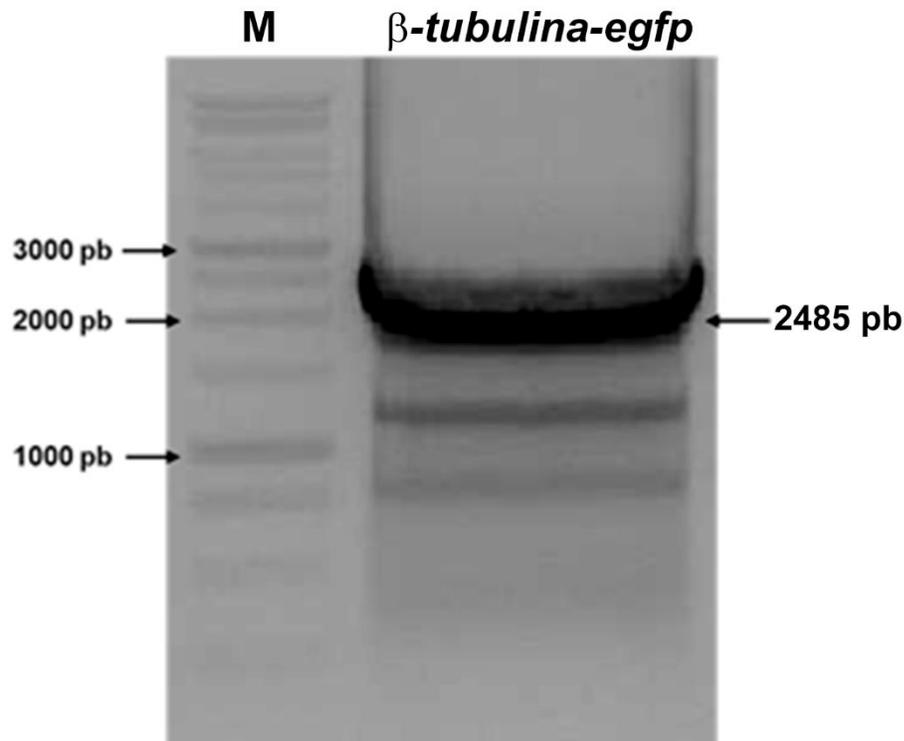


Figura 9. Construcción del casete β -tubulina-egfp. Los DNAs de la β -Tubulina y de la eGFP fueron sometidos a 30 ciclos de amplificación (30 seg a 94°C, 30 seg a 94°C y 3 min 72°C) por medio de PCR usando los oligonucleótidos específicos β -Tub-SpeI-F y eGFP-SpeI-R. El producto de PCR se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0.1% y se observó una amplificación de aproximadamente 2485 pb que corresponde a los 1768 pb de la β -tubulina y los 720 pb de la egfp. **M** corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA leader.

3.1.3. Construcción del plásmido pOC04-AH03 (β -tubulina-egfp+pGEM)

Una vez construido el casete β -tubulina-egfp, se introdujo mediante ligación al vector de almacenamiento pGEM[®]-T Easy (vector para clonar productos de PCR generados por Taq polimerasas termoestables descrito por Brochure, P. 1998) (**Figura 10A**). Posteriormente, el producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* JM109 (descrito en materiales y métodos); de dicha transformación se seleccionaron 5 colonias y se realizó la extracción del DNA plasmídico. Finalmente, al DNA plasmídico de cada clona se comprobó la inserción del inserto por restricción con la endonucleasa *SpeI* y cómo podemos ver en la **Figura 10B, línea 3**, se observaron la liberación de los fragmentos de 2485 pb y 3000 pb que corresponde al β -tubulina-egfp y del vector pGEM[®]-T Easy, respectivamente.

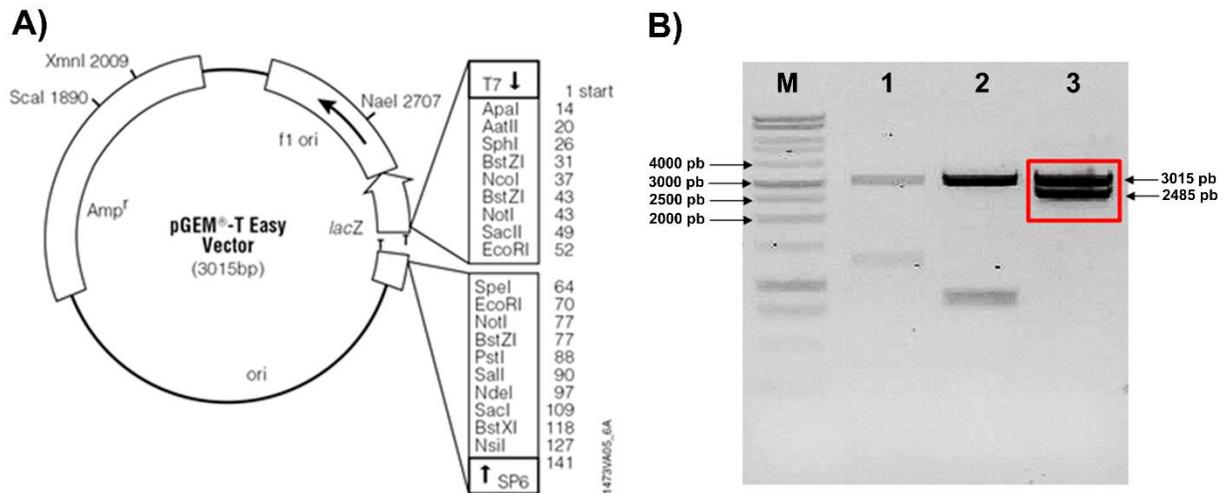


Figura 10. En **A)** se muestra el vector de clonación pGEM[®]-T Easy (PROMEGA). Los promotores de la ARN polimerasa de T7 y SP6 flanquean la región de clonación múltiple dentro de la región codificante del péptido α para la β galactosidasa. La inactivación del péptido α por inserción del fragmento de interés, permite que los clones recombinantes se identifiquen directamente mediante los colores azul / blanco en las placas indicadoras. En **B)** corresponde a la digestión enzimática con la endonucleasa *SpeI* del constructo pOC04-AH03 (β -*tubulina-egfp* + pGEM). En la línea 3 muestra la liberación de la β -*tubulina-egfp* de 2485 pb del vector pGEM[®]-T Easy de 3000 pb. **M** corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA leader.

3.1.4. Construcción del vector pOC05-AH04 (β -*tubulina-egfp*+pAGICA-113)

Finalmente, para la construcción del vector para el marcaje fluorescente de la β -*tubulina*, se realizó por inserción del casete β -*tubulina-egfp* previamente sometidos a restricción y ligado en el sitio *SpeI* del vector binario pAGICA-113 (vector de expresión fuerte constitutivo para *M. brunneum*, **Figura 11**) como se describe en materiales y métodos. El producto de la reacción de ligación se transformó por choque térmico en *E. coli* JM109 obteniéndose tres transformantes, a las cuales se extrajo DNA plasmídico y posteriormente se comprobó que el inserto se encontrara ligado en el vector pAGICA-113 usando la misma endonucleasa (*SpeI*) (**Figura 12A**). Quedando el casete β -*tubulina-egfp* flanqueado entre el promotor *tef1* de *M. brunneum* y terminador *trpC* de *A. nidulans* y como marcador de selección para *M. brunneum* el gen de resistencia a nourseotricina (**Figura 12B**).

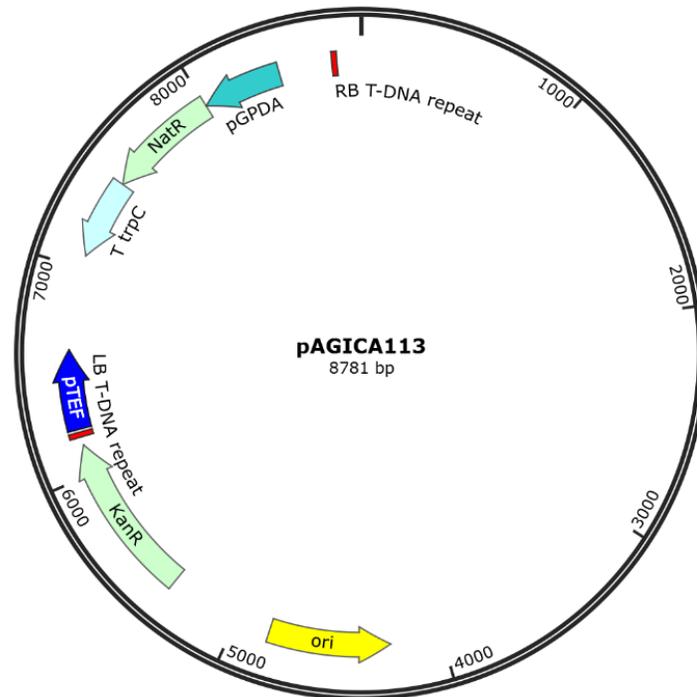
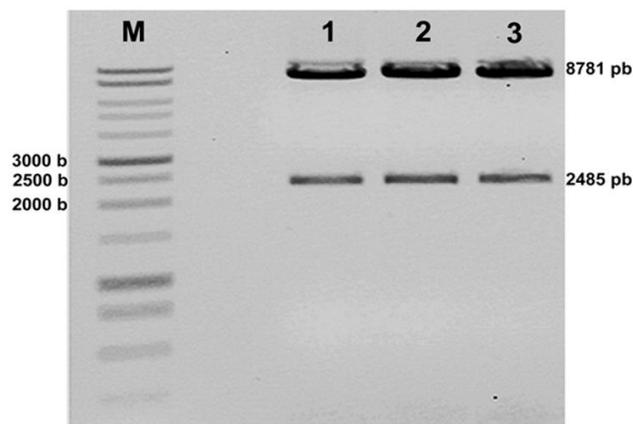


Figura 11. pAGICA113 es un vector binario que contiene el gen de resistencia al antibiótico nourseotricina (NatR) bajo el control del promotor (pGPDA) y terminador (trpC) de *A. nidulans*. También contiene el gen nptII que da resistencia a *Agrobacterium tumefaciens* contra el antibiótico kanamicina (KanR). Además, el vector tiene la característica de contener los extremos T izquierdo y derecho necesarios para la transferencia de DNA por conjugación de *A. tumefaciens* a *Metarhizium*.

A)



B)

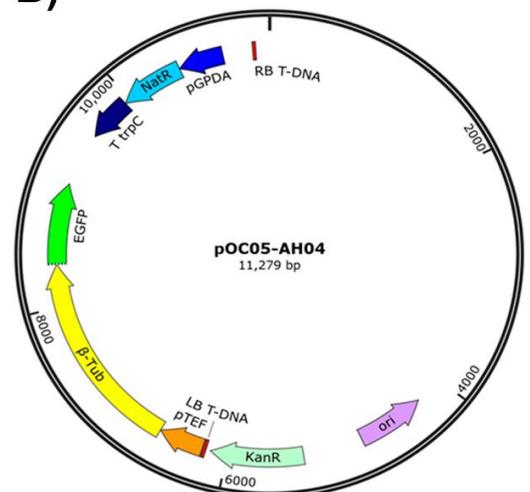


Figura 12. Identificación y características de la construcción β -tubulina-egfp+pAGICA-113. El producto de ligación se introdujo a *E. coli* por choque térmico y se extrajo DNA plasmídico de las transformantes. En **A)** los plásmidos obtenidos se sometieron a restricción con *SpeI*, observándose liberación del casete β -tubulina-egfp de 2485 pb del vector pAGICA113 de aproximadamente 8781 pb. **B)** La construcción resultante se denominó pOC05-AH04 que contiene el casete β -tubulina-egfp bajo el control del promotor fuerte constitutivo del factor de elongación de traslación (tef) de *M. brunneum*, y del terminador trpC de *A. nidulans*. **M** corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA leader; carril 1, 2 y 3 clonas recombinantes.

3.1.5. Localización y dinámica de la β -Tubulina en hifas maduras de *M. brunneum* por expresión heteróloga

Una vez que se construyó el vector binario pOC05-AH04 de *M. brunneum* se realizó la transformación por electroporación utilizando protoplastos y conidios de *M. brunneum*.

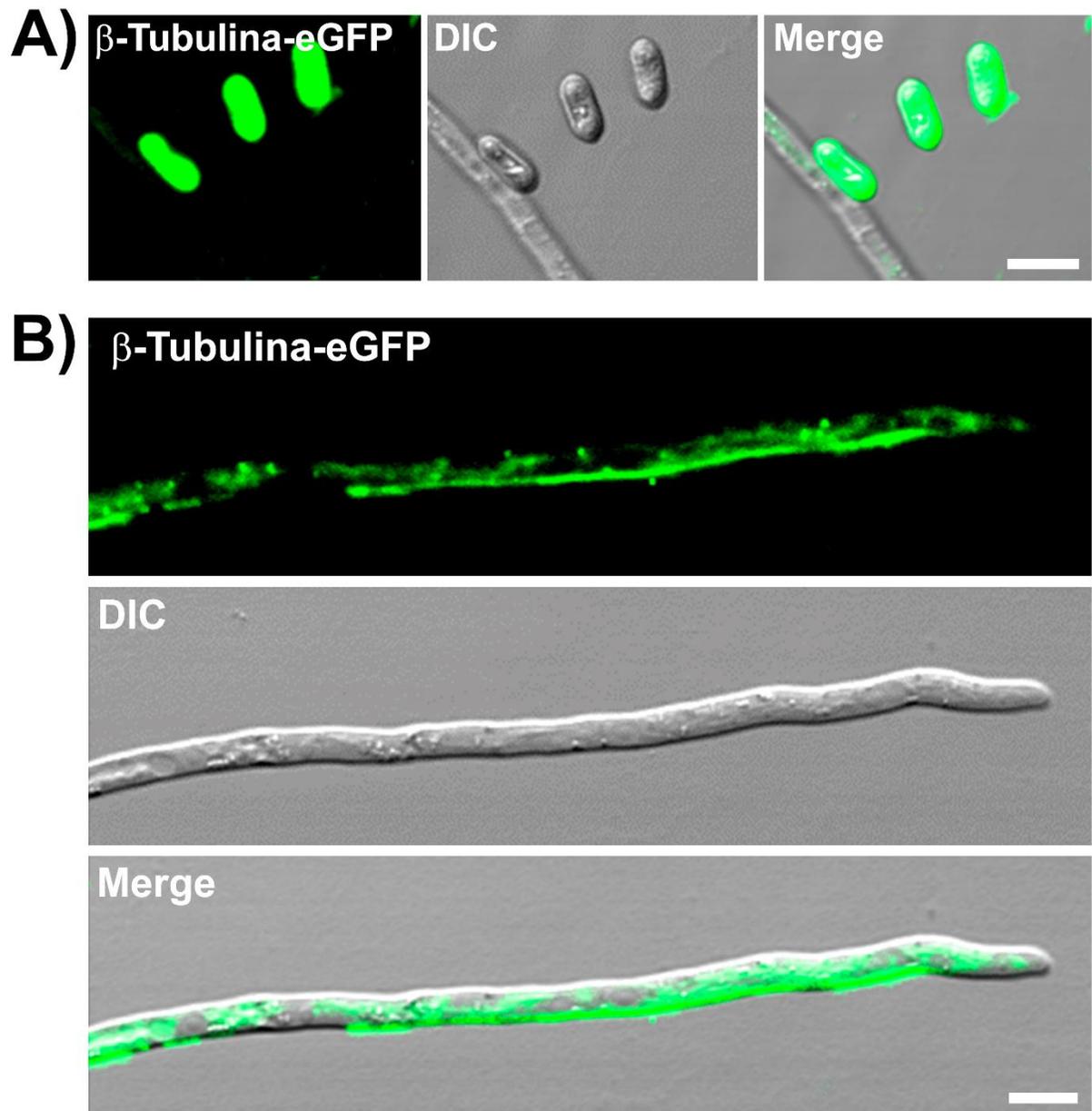


Figura 13. Imágenes confocales de expresión de la β -Tubulina-sGFP de *N. crassa* en *M. brunneum*. **A)** Conidios de *M. brunneum*, muestran fluorescencia en toda la espora y no se observa un patrón definido de fluorescencia. En **B)** corresponde a hifa madura donde se observan pocos haces de microtúbulos que se alinean longitudinalmente a lo largo de la hifa. Barra de escala= 5 μ m.

Además, también se realizó la transformación con el vector PMF-309 el cual contiene el casete de la β -tubulina-sgfp de *N. crassa* junto con el gen de resistencia a higromicina como marcador de selección, lo

anterior con el fin de expresar heterológamente el casete β -*tubulina-sgfp* bajo el control del promotor *Pccg-1* de *N. crassa* en *M. brunneum*. De ambas transformaciones solo con el vector PMF-309 se obtuvieron transformantes resistentes a higromicina, de las cuales se seleccionaron 20 colonias y solo una de ellas presentó fluorescencia. Mediante el análisis por microscopia confocal de barrido láser se analizó la fluorescencia de la transformante, observándose en conidios una fuerte señal fluorescente que abarca en todo el conidio sin estructura definida (**Figura 13A**), mientras que en hifas maduras se observaron pocos haces de microtúbulos alineados longitudinalmente a lo largo de las hifas en crecimiento (**Figura 13B**).

3.2. Asociación del citoesqueleto microtubular en la distribución intracelular de diferentes elementos cargo

Uno de los principales objetivos del presente trabajo, es conocer la organización y dinámica de los diferentes componentes intracelulares en el hongo entomopatógeno *M. brunneum* y la posible asociación de estos componentes con el citoesqueleto microtubular. Para lo anterior, se utilizaron distintos colorantes vitales (BODIPY, MitoTracker Green, FM4-64 y Blanco de Calcoflúor) con el objetivo de visualizar diferentes elementos cargo y analizar la dinámica de cada uno de ellos. También al mismo tiempo, se usó la droga despolimerizadora de microtúbulos Benomilo (BML) a las concentraciones de 0.25 y 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Previamente determinadas por Pérez-Ramírez 2021), con la finalidad de determinar la existencia de alteraciones en distribución y dinámica de los distintos elementos cargo. Por otra parte, en este trabajo se utilizó la cepa KAT-eGFP y 2NP4-eGFP (proteína de membrana y proteína residente de peroxisomas respectivamente) para el mismo análisis.

3.2.1. Dinámica y distribución de peroxisomas en hifas maduras de *M. brunneum*

Se ha descrito en diferentes organismos como en *A. nidulans* y *U. maydis*, que los peroxisomas son organelos que además de tener un papel esencial en el metabolismo lipídico también participa en la desintoxicación celular, y para lleven a cabo estas funciones, los peroxisomas requieren de ser transportados por el citoesqueleto microtubular (Neuhaus et al., 2016; Salogiannis et al., 2016, Congping Lin et al., 2016). Para iniciar con este estudio, se utilizó la cepa KAT-eGFP de *M. brunneum* (proporcionada por el grupo de trabajo de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato) para hacer los

análisis. Al realizar observaciones mediante microscopía confocal de barrido láser de la cepa silvestre KAT-eGFP, se pudo determinar que los peroxisomas se ven como grandes puntos fluorescentes distribuidos a lo largo de la hifa, desde la región distal hasta la región apical, y que estos puntos fluorescentes se mueven en dirección anterógrado y retrógrado a diferentes velocidades (**Figura 14**). Cuando a esta cepa se creció en presencia de BML a 0.25 y 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se pudo ver que la despolimerización de los microtúbulos produce alteraciones en la dinámica de los peroxisomas, observándose cúmulos de puntos fluorescentes y disminución en las velocidades de movimiento de estos, siendo más evidente a la concentración de 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 15**).

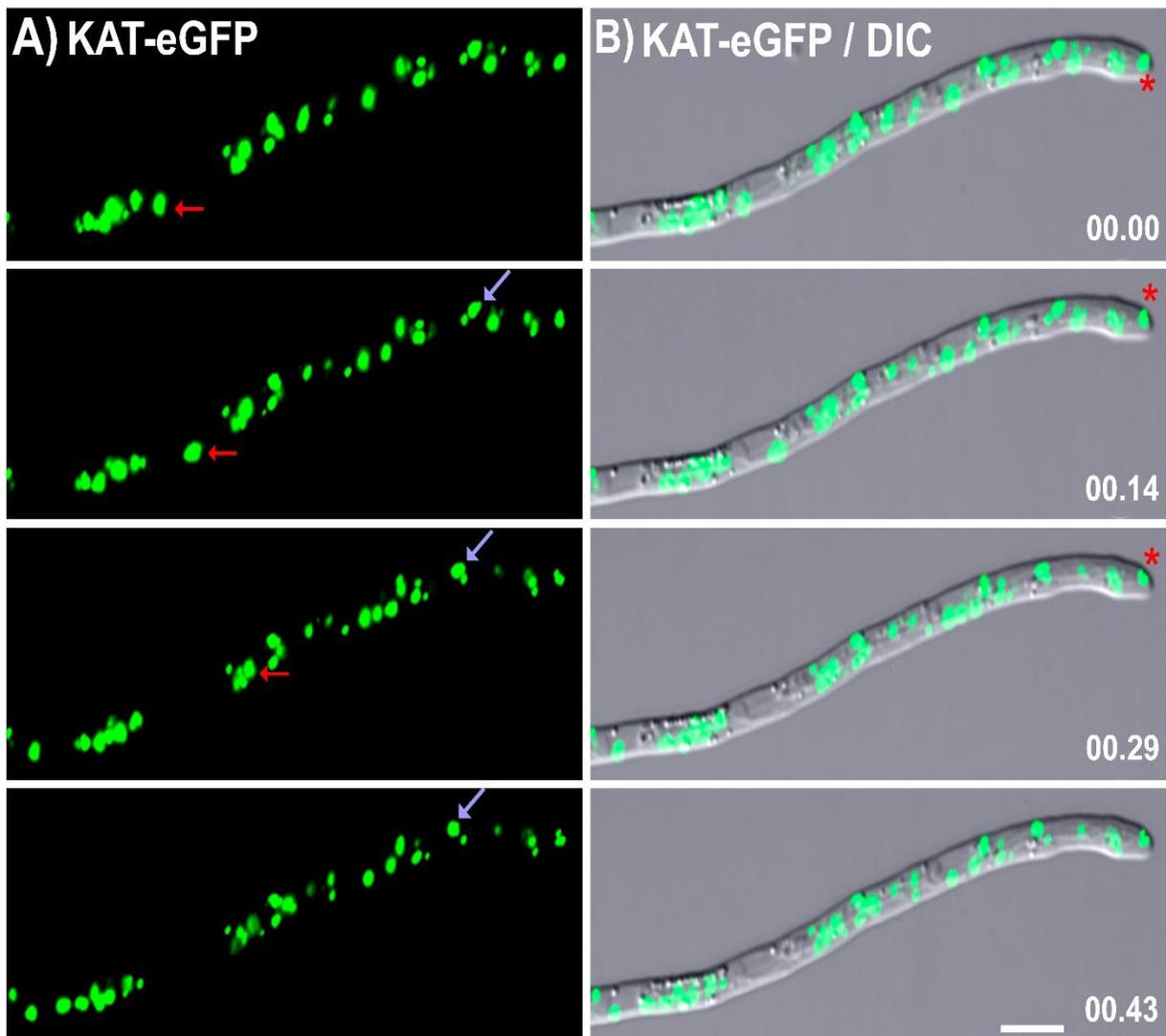


Figura 14. Serie de tiempos de imágenes confocales de la dinámica de los peroxisomas (KAT-eGFP) en hifas maduras de *M. brunneum*. **A)** Las flechas rojas indican el movimiento anterógrado y las azules el movimiento retrógrado de los peroxisomas etiquetados con eGFP. **B)** Fusión de los canales de fluorescencia y DIC (Contraste de Interferencia Diferencial), el asterisco muestra los peroxisomas llegando hasta la punta de la hifa. Barra de escala = 5 μm .

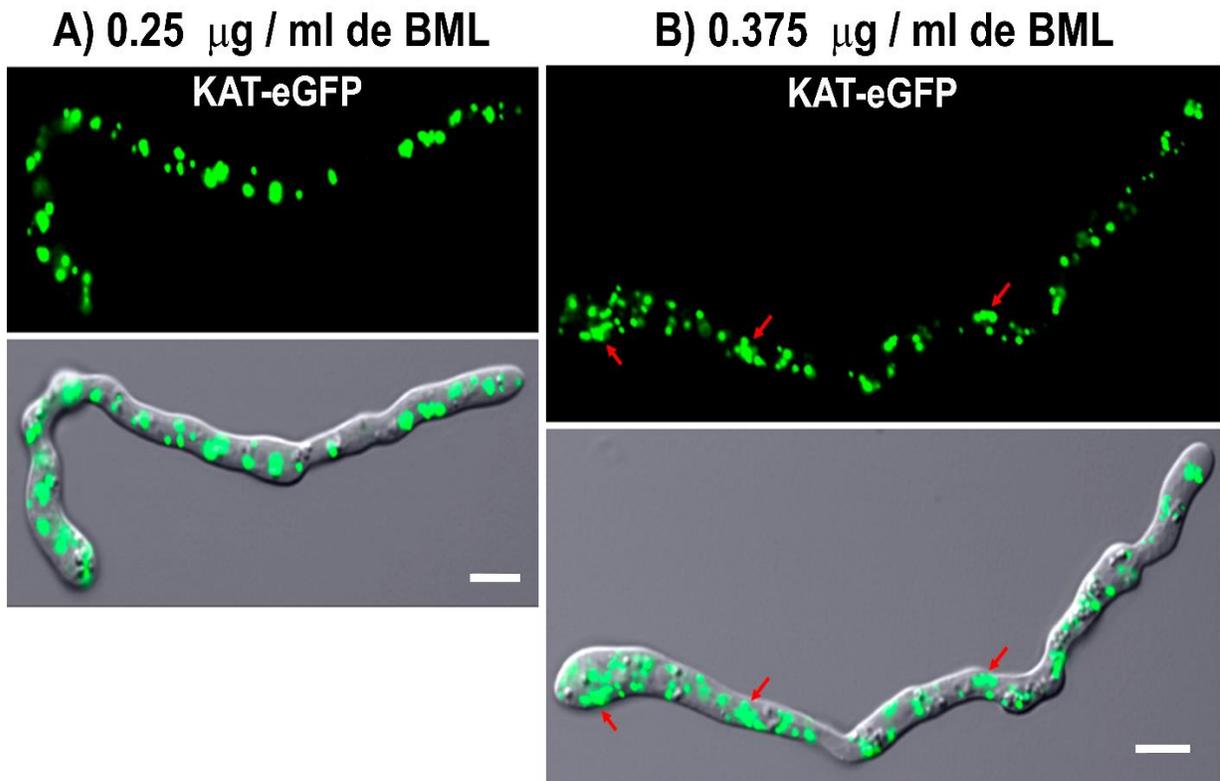


Figura 15. Imágenes confocales de KAT-eGFP tratadas con diferentes concentraciones de BML. **A)** Se utilizó 0.25 µg/mL de BML (CM50 para *M. brunneum*), donde se observó a esta concentración cambios en la dinámica de los peroxisomas. En **B)** tratamiento con 0.375 µg/mL de BML observándose una reducción severa del crecimiento y alteración en la dinámica de los peroxisomas más evidentes. Barra de escala = 5 µm.

3.2.2. Análisis de la dinámica de los peroxisomas en hifas maduras de *M. brunneum*

Por otra parte en este trabajo, también se analizó la dinámica de los peroxisomas de la cepa silvestre 2NP4-eGFP (2-nitropropano dioxigenasa), proteína con dinámica similar a KAT-eGFP en *M. brunneum* (Torres-García y Torres-Guzman, 2015), y derivado de este análisis, se pudo establecer que existen dos poblaciones de peroxisomas; una población de partículas estáticas o bien que se mueven sobre su propio eje (90%), y una segunda población que corresponde al 10%, con movimientos de desplazamiento rápidos y lentos (41% y 59% respectivamente) tanto anterógrado como retrógrado, y que estos movimientos se ven afectado en presencia de BML.

Para determinar la velocidad de desplazamiento de estas partículas fluorescentes, se analizaron videos de 10 hifas independientes con un tamaño de ~65 µm de longitud mediante el Software ImageJ FIJI, encontrándose que las partículas fluorescentes con movimientos tanto anterógrados como retrógrados, manejan velocidades de desplazamiento desde 3.07 µm/s hasta 15.8 µm/s (**Figura 16**).

Cepa 2NP4-eGFP WT

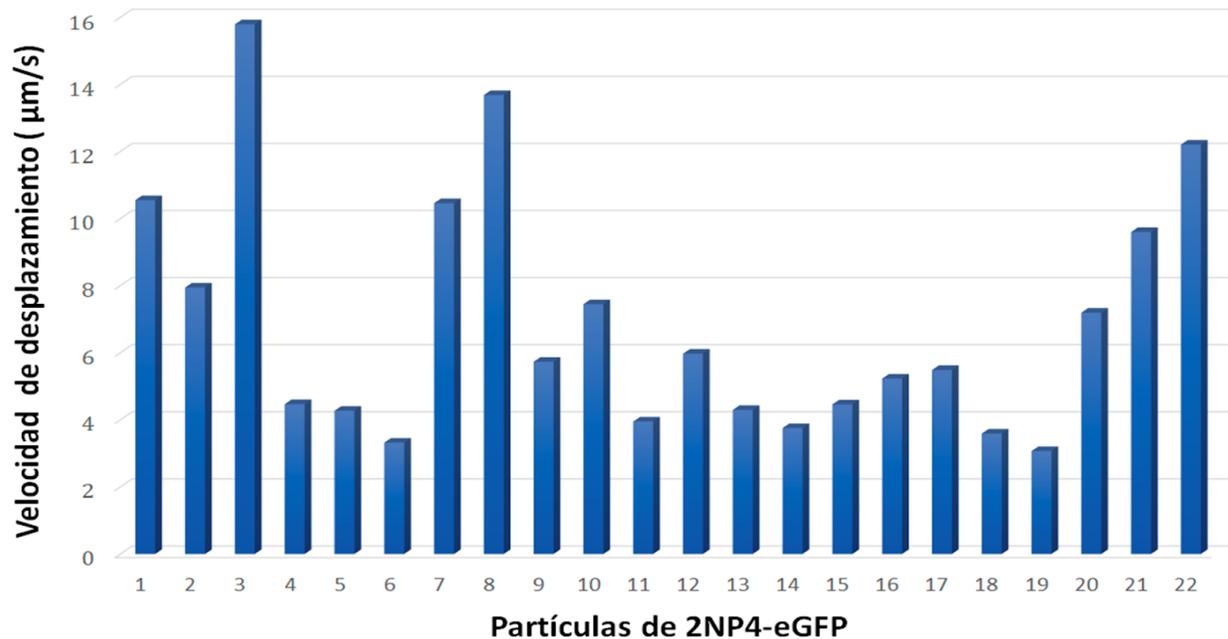


Figura 16. Velocidades de desplazamiento de las partículas fluorescentes de la cepa 2NP4-eGFP tipo silvestre (WT). En el eje X muestra el número de partículas analizadas. El eje Y corresponde a la velocidad de desplazamiento de cada una de las partículas fluorescentes en micrómetros/segundo ($\mu\text{m/s}$).

Al analizar la cepa 2NP4-eGFP en presencia de $0.25 \mu\text{g/mL}$ de BML, se observó una fuerte disminución tanto en el número de partículas fluorescentes con movimiento, como en la velocidad de desplazamiento (2.3 a $5.3 \mu\text{m/s}$), siendo más evidente a la concentración $0.375 \mu\text{g/mL}$ de BML (0.54 a $2.6 \mu\text{m/s}$) (**Figura 17A y 17B**), observándose una disminución en la velocidad de desplazamiento del 63% y 82% respectivamente en comparación con la cepa sin tratar (1.9 ± 0.7 , 3.9 ± 1.0 y $10.6 \pm 1.9 \mu\text{m/s}$).

Esto permite dilucidar que, el movimiento de estas partículas es influenciado por los microtúbulos. Al no encontrarse organizados como normalmente lo hacen, las proteínas motoras y las cargas no pueden desplazarse correctamente, provocando una inadecuada distribución de proteínas y elementos cargo y, por ende, un mal desarrollo de *M. brunneum*.

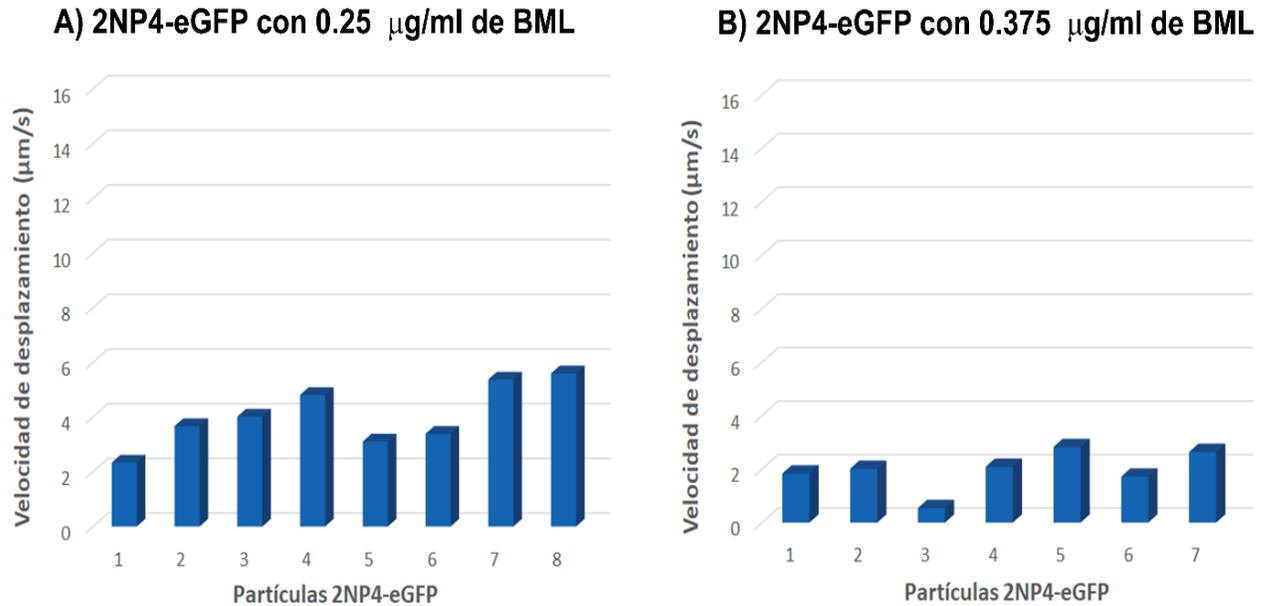


Figura 17. Velocidades de desplazamiento de partículas de la cepa 2NP4-eGFP tratadas en **A)** 0.25 µg/mL de BML y en **B)** 0.375 µg/mL. El eje X corresponde al número de partículas analizadas de la cepa 2NP4-eGFP y en el eje Y se muestra la velocidad de desplazamiento expresada en micrómetros/segundo.

3.2.3. Dinámica de cuerpos lipídicos en hifas maduras de *M. brunneum*

Se conoce que los cuerpos lipídicos además de participar en la homeostasis energética y metabolismo lipídico, en hongos también se ha descrito que participan en la resistencia a toxinas producidas por otros organismos como mecanismo de defensa. Con el fin de visualizar la distribución y dinámica de los cuerpos lipídicos en *M. brunneum*, se utilizó el colorante vital BODIPY (4,4-difluoro-1,3, 5, 7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno (SIGMA)) a una concentración de 5 µg/mL, el cual tiñe lípidos neutros y otros lípidos no polares. Mediante la obtención de imágenes por microscopía confocal, se pudo observar, en hifas maduras, partículas fluorescentes de diferentes tamaños y que estas partículas se distribuyen en toda la hifa con movimiento de desplazamiento lento tanto anterógrado como retrogrado (**Figura 18**). Al tratar las hifas con BML a una concentración de 0.25 µg/mL, se observó que estos cuerpos lipídicos forman grandes cúmulos en la región subapical y basal de la hifa, observándose poco movimiento de estos, siendo más evidente el fenómeno con 0.35 µg/mL de BML (**Figura 19A y 19B**). Por otra parte, se cuantifico la velocidad de desplazamiento de los cuerpos lipídicos en presencia y ausencia de BML.

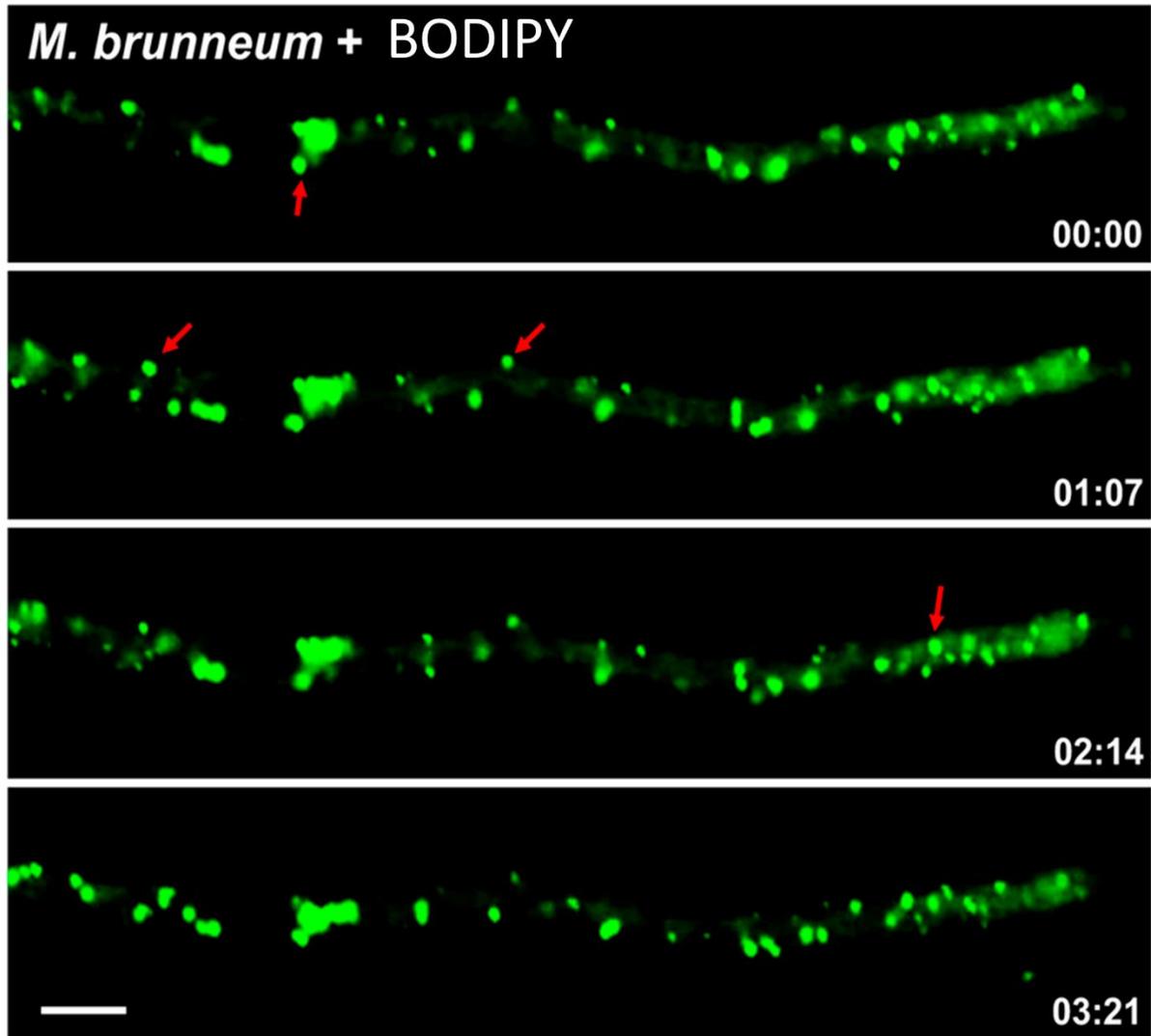
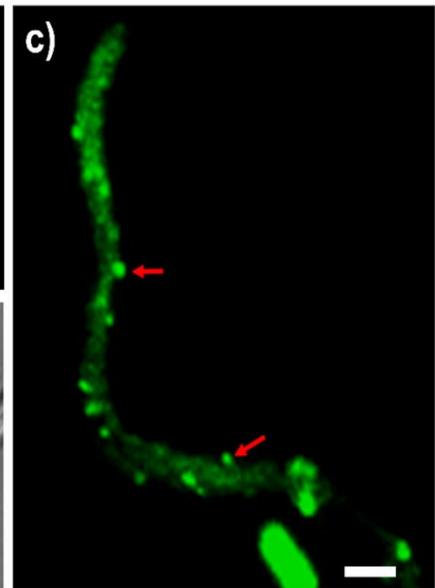
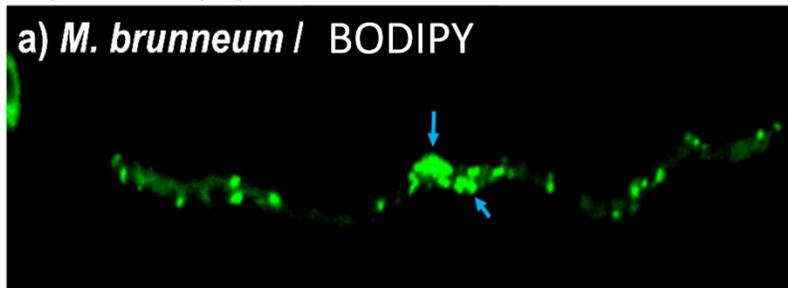


Figura 18. Serie de tiempos de imágenes confocales de hifas teñidas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del colorante vital BODIPY. Se observan puntos fluorescentes de diferentes tamaños distribuidos en toda la hifa desde la región basal hasta la subapical, algunos de estos puntos fluorescentes tienen movimientos tanto anterógrado como retrogrado. Barra de escala=5 μm .

Para lo anterior se analizaron videos de 6 hifas independientes de $\sim 65 \mu\text{m}$ de longitud mediante el Software ImageJ FIJI, encontrándose que las partículas fluorescentes con movimientos de la cepa sin tratamiento con BML, se desplazan de 0.2 $\mu\text{m}/\text{s}$ hasta 0.55 $\mu\text{m}/\text{s}$ (**Figura 20**). Al analizar los cuerpos lipídicos en presencia de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BML, se observó una disminución en la velocidad de desplazamiento del 61% (0.046 a 0.23 $\mu\text{m}/\text{s}$), observándose más evidente la disminución a la concentración 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BML del 88% (0.003 a 0.075 $\mu\text{m}/\text{s}$) (**Figura 21A y 21B**).

A) 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de BML



B) 0.375 $\mu\text{g/ml}$ de BML

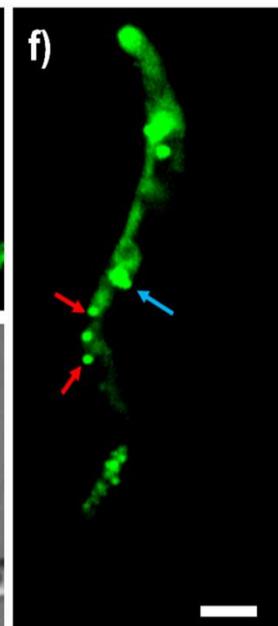
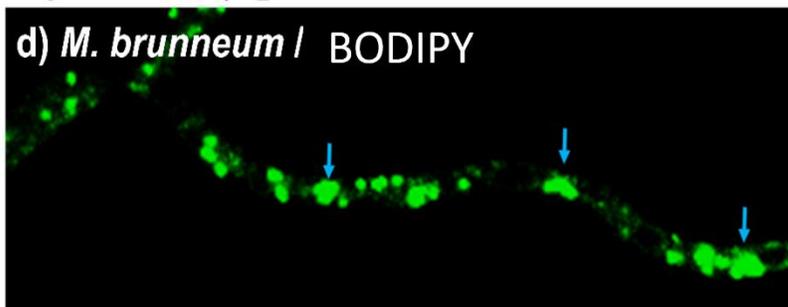


Figura 19. Imágenes confocales de *M. brunneum* teñidas con BODIPY y tratadas con BML. En **A)** hifa tratada con 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de BML y **B)** tratamiento con 0.375 $\mu\text{g/ml}$ de BML. Flechas azules señalan acumulaciones de cuerpos lipídicos en la región basal (a y d) y subapical de la hifa (f). Las flechas rojas indican partículas individuales de cuerpos lipídicos. DIC (Contraste de Interferencia Diferencial). Barra de escala= 5 μm .

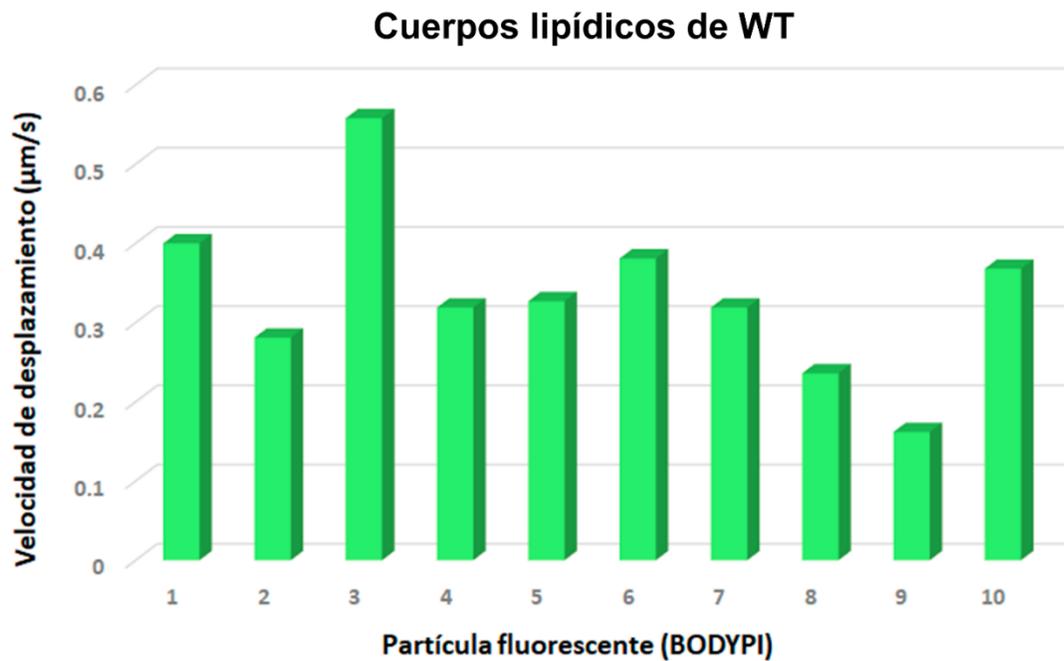
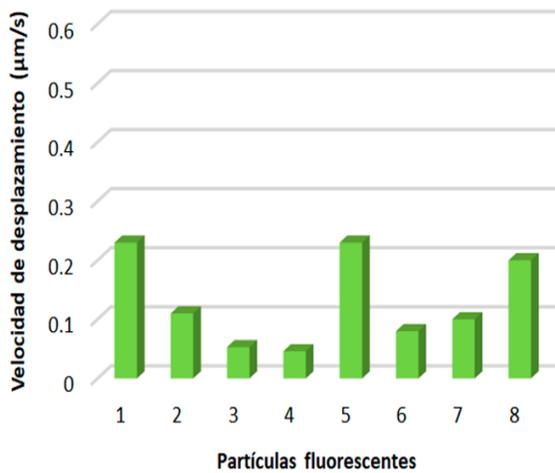


Figura 20. Velocidades de desplazamiento de las partículas de los cuerpos lipídicos de la cepa WT. En el eje X muestra el número de partículas analizadas. El eje Y corresponde a la velocidad de desplazamiento de cada una de las partículas fluorescentes en micrómetros/segundo ($\mu\text{m/s}$).

A) WT + BODYPI + 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de BML



B) WT + BODYPI + 0.375 $\mu\text{g/ml}$ de BML

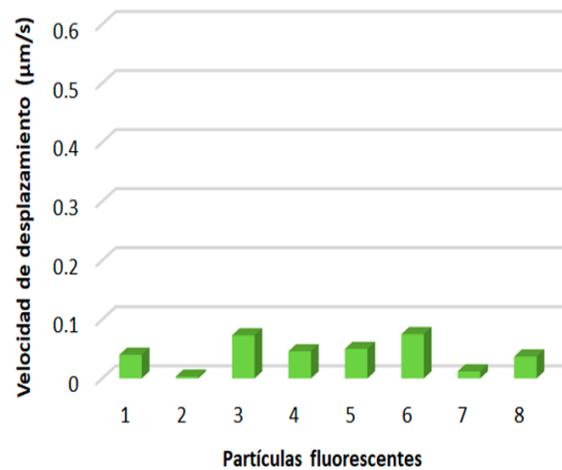


Figura 21. Velocidades de desplazamiento de partículas de los cuerpos lipídicos **A)** 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de BML y en **B)** 0.375 $\mu\text{g/ml}$. El eje X corresponde al número de partículas analizadas de los cuerpos lipídicos en movimiento y en el eje Y se muestra la velocidad de desplazamiento expresada en micrómetros/segundo ($\mu\text{m/s}$).



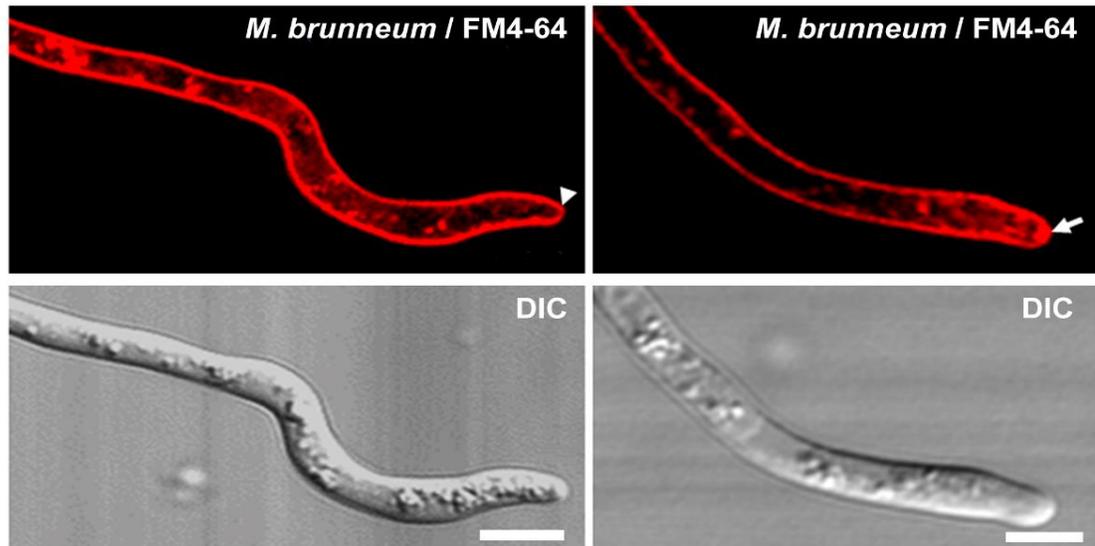
Figura 22. Imágenes confocales de *M. brunneum* teñido con el colorante lipofílico FM4-64. En **A)** Germínulas de 23 μm de longitud, **C)** 34 μm de longitud y **E)** hifas maduras de 68 μm de longitud. Las flechas indican el Spk y los recuadros con asteriscos corresponden a una magnificación de Spk que se observa en forma de medialuna que colocaliza parcialmente con la membrana plasmática apical. **B), D)** y **F)** imágenes de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC). Barra de escala= 5 μm .

3.2.4. Dinámica del Spk y su relación con el citoesqueleto microtubular en *M. brunneum*

El Spk es un cuerpo apical complejo compuesto principalmente de vesículas secretoras de diferentes tamaños implicados en la direccionalidad y crecimiento de la célula, además también se ha establecido, que estas vesículas secretoras son transportadas a larga distancia hacia el Spk a través de los Mts (Bracker y Murphy., 1992; Riquelme et al., 1998; R. W. Roberson., 2020). Para analizar el crecimiento polarizado en hifas de *M. brunneum* y determinar la presencia de un Spk, se utilizó el colorante vital lipófilo FM4-64 a

una concentración de 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cuya característica es teñir selectivamente membranas. Mediante el método de agar invertido y microscopia confocal se obtuvieron imágenes en diferentes etapas del desarrollo del hongo. Se pudo determinar que tanto en germínulas como en hifas maduras (22 μm hasta 68 μm de longitud), la presencia de estructuras membranosas en el citoplasma, además de la definida membrana plasmática de la célula. También, se observó una estructura fluorescente brillante en forma de medialuna en la punta de la hifa alcanzando la membrana plasmática apical, lo que corresponde al Spk o AVC, el cual se mueve siguiendo la direccionalidad del crecimiento de la célula (**Figura 22 A, C y E**).

A) 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BML



B) 0.375 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BML

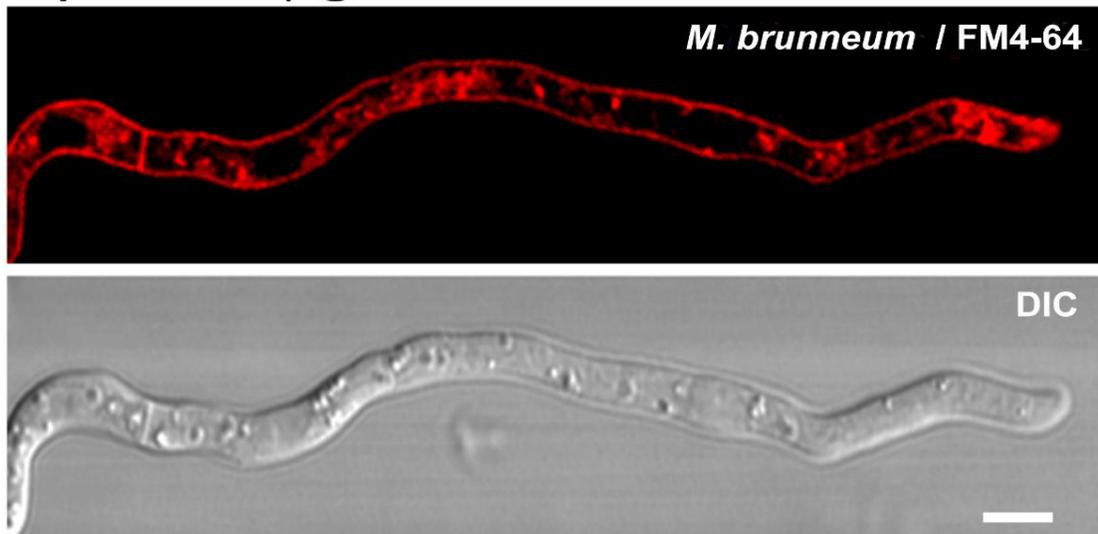


Figura 23. Imágenes confocales de hifas teñidas con FM4-64 y tratadas con BML. **A)** Hifa de *M. brunneum* tratada con 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BML. **B)** Hifa madura tratada con 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BML, a esta concentración se observaron algunas partículas fluorescentes en el ápice que no parecen ser propiamente un Spk. DIC (Contraste de Interferencia Diferencial). Barra de escala= 5 μm .

Posteriormente, al analizar hifas tratadas con BML a la concentración de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se pudo ver partículas fluorescentes con menor abundancia en el citoplasma, y un Spk que no se distinguía claramente en la punta, aunque en algunas hifas presentaron una estructura fluorescente en el ápice similar al Spk que desaparecía eventualmente (**Figura 23A y 23B**).

3.2.5. Análisis de la pared celular en hifas maduras de *M. brunneum*

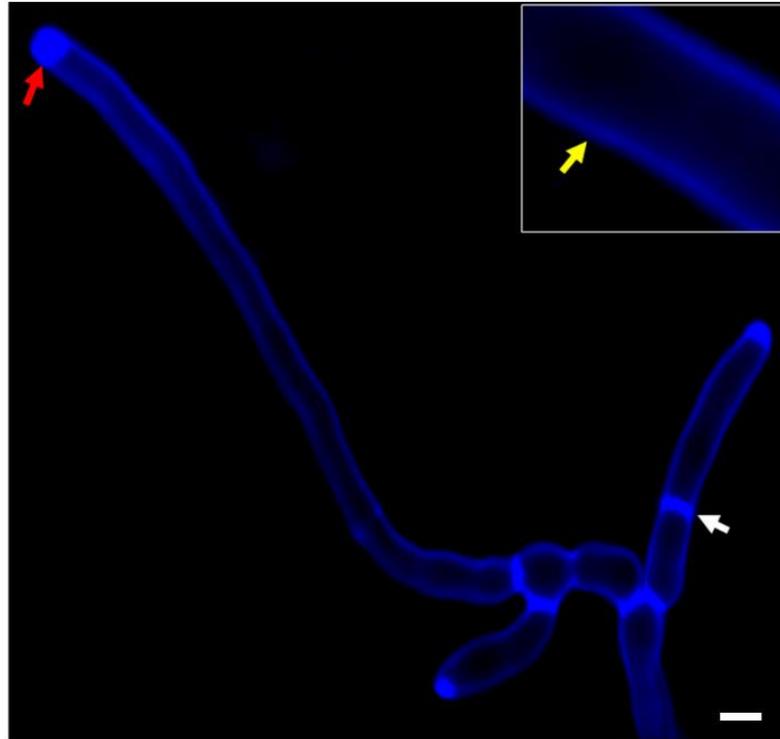
La pared celular es una estructura dinámica que es esencial para la viabilidad, morfogénesis y patogenicidad en los hongos, esta estructura está conformada por distintos elementos que incluyen glucanos, glicoproteínas y microfibrillas de quitina.

Con la finalidad de visualizar la pared celular en *M. brunneum*, se utilizó el colorante blanco de calcoflúor (Calcofluor White) cuya característica es tener afinidad por la quitina que conforma la pared celular de los hongos.

Al igual que los experimentos anteriores, mediante el método de agar invertido y microscopía confocal, se pudo observar en la región subapical y basal de la hifa una señal de fluorescencia bien definida que corresponde a la pared con un grosor de $0.36 \pm 0.07 \mu\text{m}$ ($n=15$), mientras que en el ápice de la hifa se observa con mayor grosor ($2.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$; $n=15$) al igual que los septos ($0.8 \pm 0.07 \mu\text{m}$; $n=15$) (**Figura 24A y 24B**).

Al tratar con BML a una concentración de 0.25 y 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el colorante vital, se observó una menor acumulación de pared celular en el ápice ($0.83 \pm 0.2 \mu\text{m}$; $n=8$) comparado con la cepa sin tratar, aunque el grosor en los septos ($0.7 \pm 0.09 \mu\text{m}$; $n=15$) y la pared celular de la región basal y subapical ($0.32 \pm 0.07 \mu\text{m}$; $n=10$) no se vio afectado (**Figura 25A y 25B**).

A) *M. brunneum* / Blanco de calcofluor



B) Grosor de la pared celular

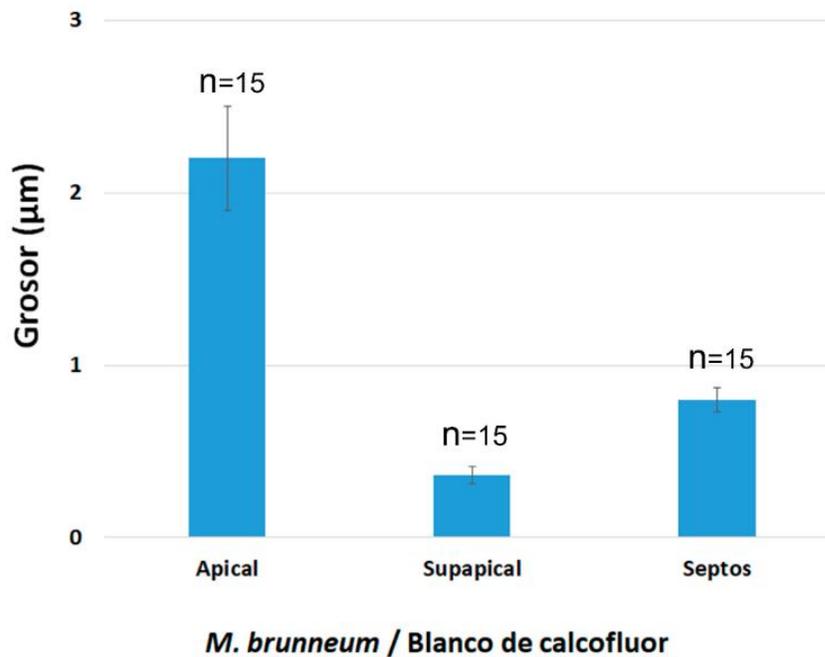
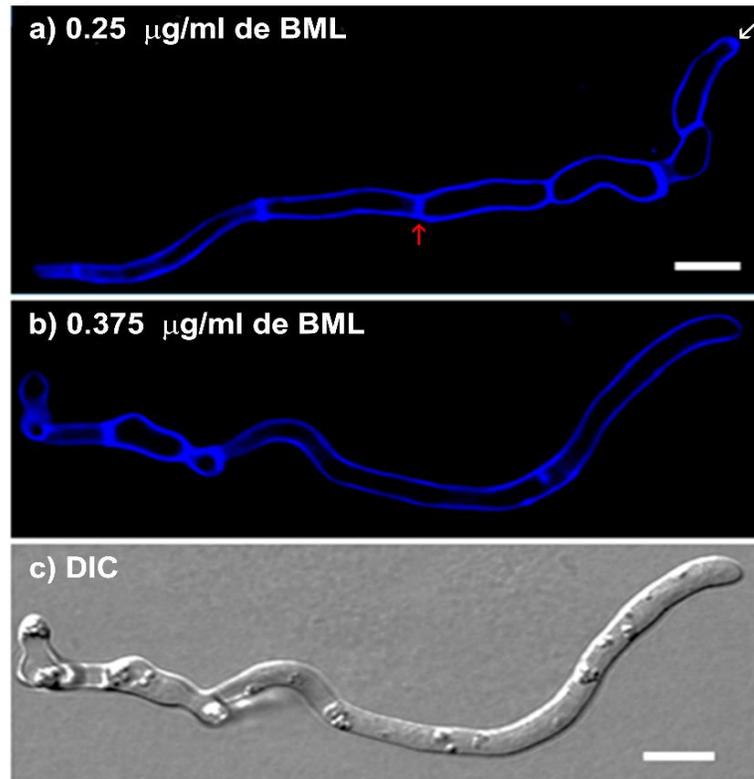


Figura 24. Visualización de la pared celular de *M. brunneum*. **A)** Imagen confocal de *M. brunneum* teñida con blanco de calcoflúor (WC), las flechas nos indican el grosor de la pared en diferentes regiones de la hifa. (Roja, ápice de la hifa; blanca, septo; amarillo, región subapical y basal de la hifa). **B)** Cuantificación del grosor de la pared celular en diferentes áreas de la hifa. Barra de escala= 5 µm.

A) *M. brunneum* / Blanco de calcofluor



B) Grosor de la pared celular

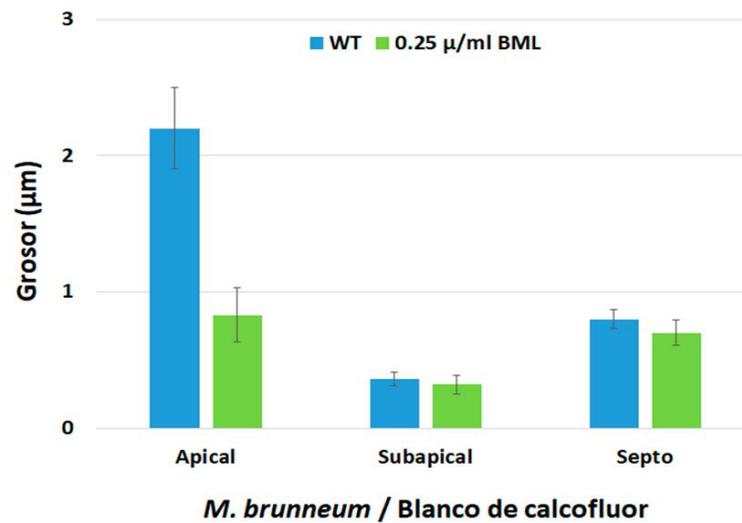


Figura 25. A) Imágenes confocales de hifas de *M. brunneum* teñidas con blanco de calcoflúor y tratadas con 0.25 y 0.375 $\mu\text{g/ml}$ de BML. Flecha blanca señalan la acumulación de pared celular en el ápice y flecha roja en los septos. **B)** Cuantificación del grosor de la pared celular con células tratadas y sin tratar con BML en diferentes áreas de la hifa. DIC (Contraste de Interferencia Diferencial). Barra de escala= 5 μm .

3.2.6. Dinámica de mitocondrias en hifas maduras de *M. brunneum*

Por último, en este trabajo se analizó la distribución de las mitocondrias utilizando el fluorocromo MitoTracker Green que tiñe específicamente estos organelos. Mediante la obtención de imágenes por microscopía confocal, se pudo observar estructuras filamentosas alargadas distribuidas en toda la hifa desde la región basal hasta la apical y que aparentemente se mueven mediante el flujo citoplasmático. Además, en algunas regiones se observaron acumulaciones de estos filamentos, así como algunas partículas (**Figura 26**). Cuando se realizó el tratamiento con BML a las concentraciones de 0.25 y 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se pudo observar que las estructuras filamentosas correspondientes a las mitocondrias se ven aglomeradas, pero manteniendo la distribución en toda la hifa, aparentemente mal posicionadas (**Figura 27**).

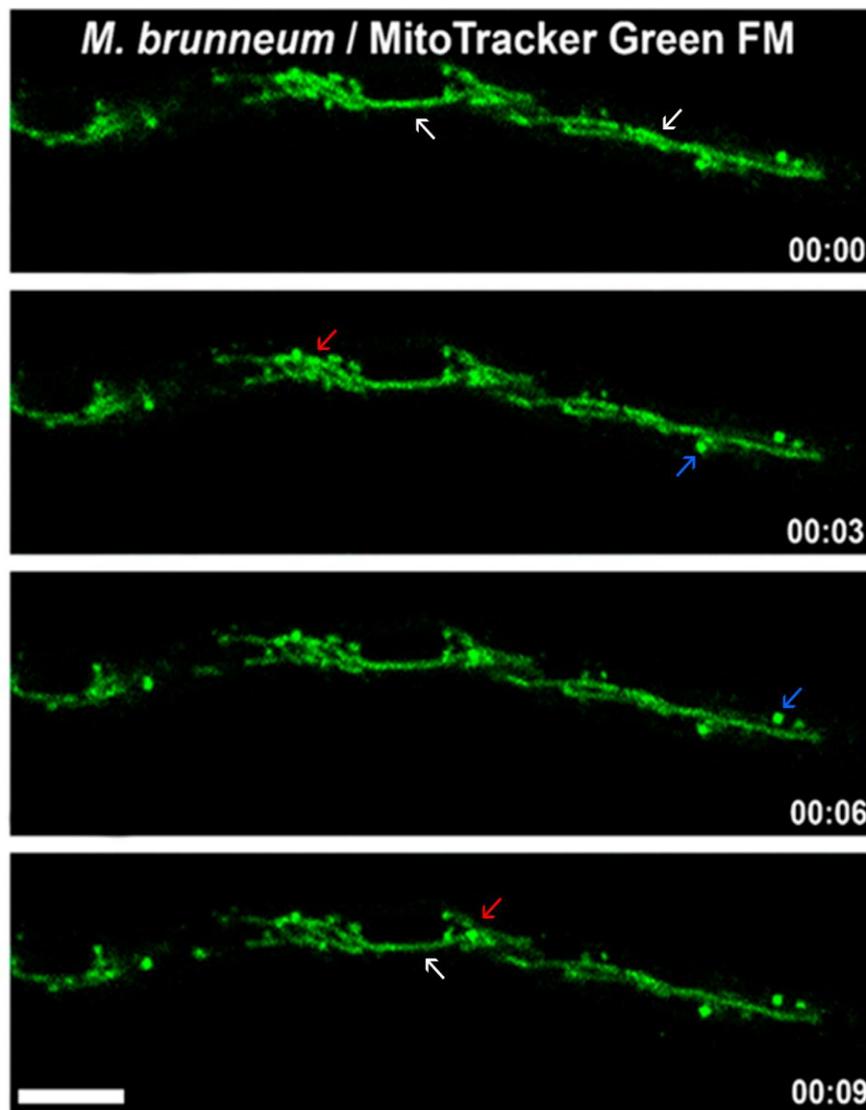


Figura 26. Serie de tiempos de imágenes confocales de hifas teñidas con MitoTracker Green para visualizar mitocondrias. Flechas blancas señalan filamentos correspondientes a las mitocondrias, las rojas a los cúmulos de filamentos y azules a puntos fluorescentes. Barra de escala= 5 μm .

M. brunneum / MitoTracker Green

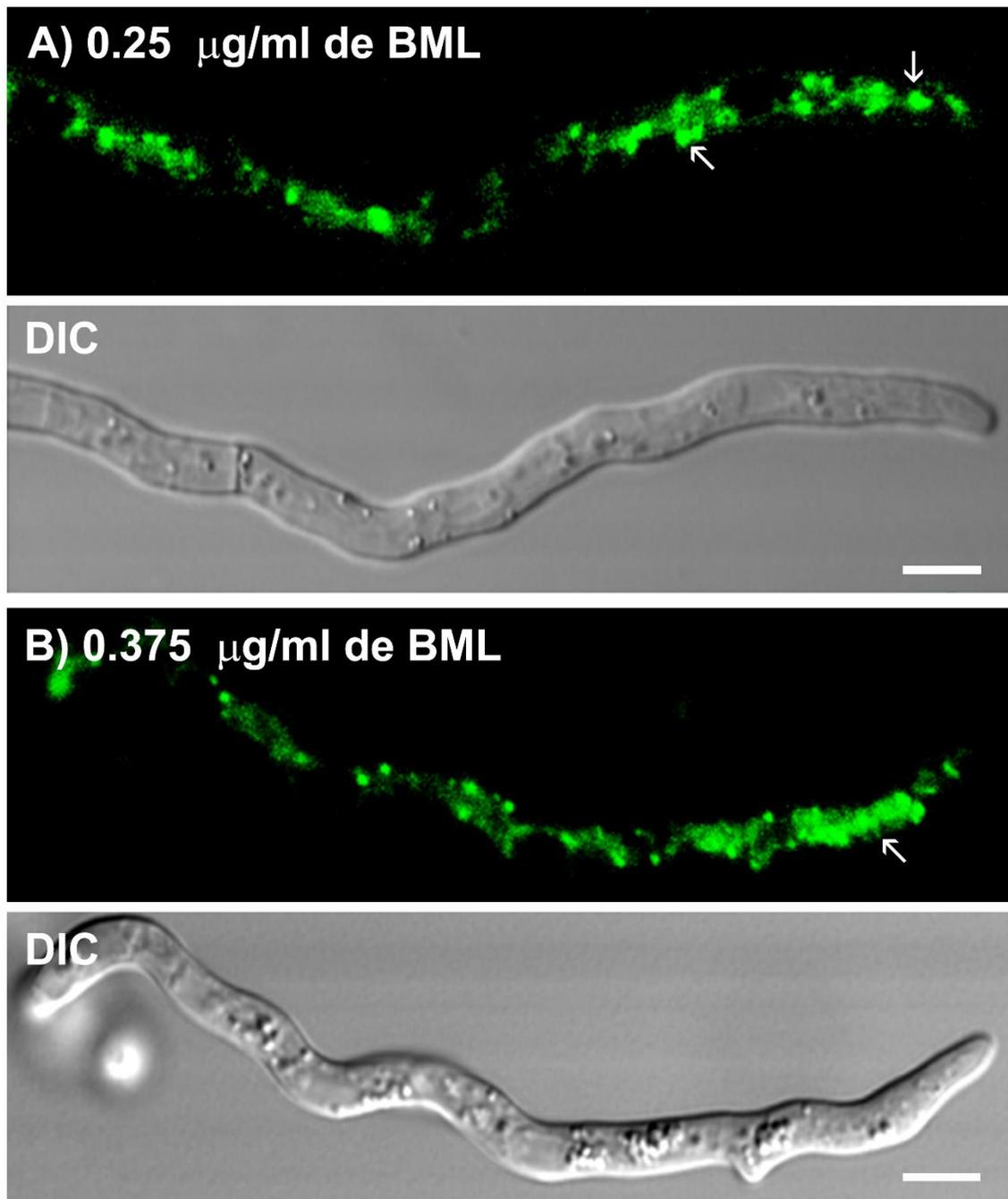


Figura 27. Imágenes confocales de hifas teñidas con MitoTracker Green y tratadas en **A)** con 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de BML y **B)** con 0.375 $\mu\text{g/ml}$ de BML. Flechas señalan estructuras fluorescentes alteradas en su posicionamiento que corresponden a las mitocondrias. DIC (Contraste de Interferencia Diferencial). Barra de escala= 5 μm .

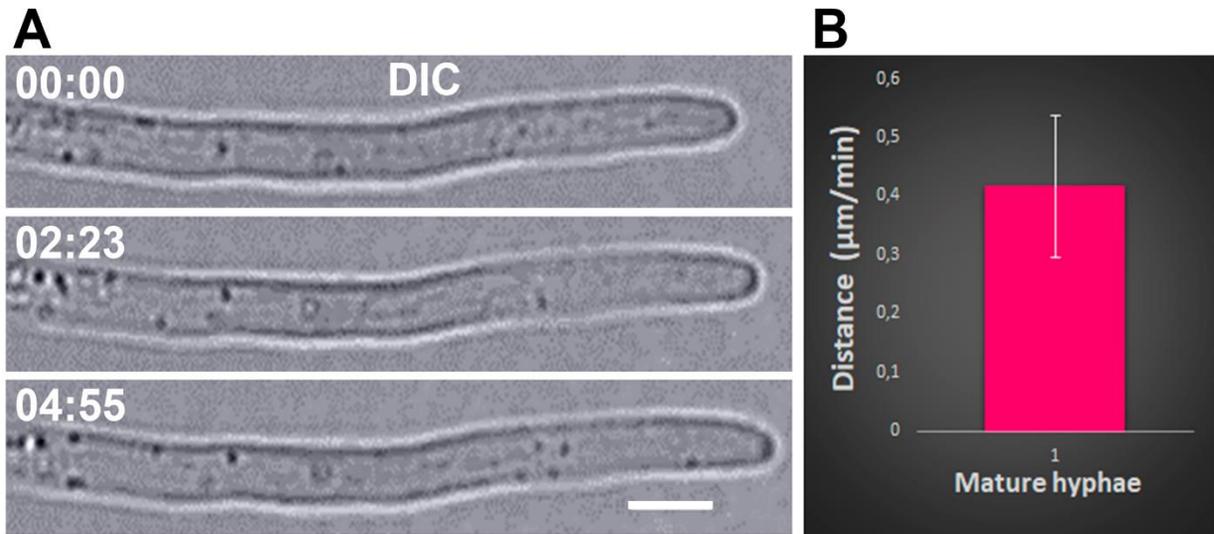


Figura 28. A) Serie de tiempos de imágenes en campo claro (Contraste de Interferencia Diferencial, DIC) de *M. brunneum*. **B)** Análisis estadístico de la tasa de crecimiento ($0.46 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$). Barra de escala= $5 \mu\text{m}$.

Capítulo 4. Discusión

M. brunneum es un hongo entomopatógeno de importancia agrícola por la actividad dual que desarrolla: como biocontrolador y promotor del crecimiento en plantas (Motta et al., 2011; Behie S. W et al., 2012, Liao X. et al., 2014 González-Hernández et al., 2020). A la hora de llevarse a cabo la interacción de *M. brunneum* con el insecto y/o planta, el hongo puede desencadenar eventos de diferenciación y transporte de organelos (para el crecimiento polarizado y desintoxicación) que le permitan mantener la homeostasis. Debido a que existe poca información acerca de la polaridad celular y dinámica intracelular en *M. brunneum*, en este estudio se realizó el análisis de la dinámica de diferentes componentes intracelulares, así como su relación con el citoesqueleto microtubular.

4.1. Localización y dinámica de los Mts en *M. brunneum*

El citoesqueleto microtubular en hongos, es una estructura dinámica que mantiene la forma y organización de los componentes citoplasmáticos, jugando un papel importante en el transporte intracelular (Dent et al., 2011). Con el fin de analizar la localización de los Mts en *M. brunneum*, se construyó un vector de expresión (pOC05-AH04) que contiene la secuencia nucleotídica de la β -tubulina de *M. brunneum* fusionada en el C-terminal con *egfp*, bajo el control del promotor *tef- α 1*, el cual, proveniente de un factor de elongación de traducción de *M. anisopliae*, cuya característica es de ser un promotor fuerte y constitutivo, funcional para el género de *Metarhizium ssp* (Nakazato L. et al., 2006). Para la obtención de transformantes Mts-eGFP, en eventos independientes, se utilizaron dos vectores; pOC05-AH04 y el PMF-309; la diferencia radica en que PMF309 contiene el casete de la β -tubulina-*sgfp* de *N. crassa*. De ambas transformaciones, solo con el vector PMF-309 se obtuvieron recombinantes que expresaban los Mts etiquetados con GFP, indicando que la expresión de un gen heterólogo para *M. brunneum*, fue funcional. Lo anterior puede estar relacionado por la homología que presentan ambos genes, el cual se determinó que la β -Tubulina de *M. brunneum* (MAN_04224; ARSEF 549) comparte un porcentaje de identidad del 96% con la β -Tubulina de *N. crassa* (NCU04054), además de estar descrito, que la expresión heteróloga en el género *Metarhizium ssp.* es eficaz (Diavis KA. et al., 2020).

Se ha reportado en diferentes hongos la localización y dinámica de los Mts, donde se han observado algunas diferencias, principalmente en la cantidad de haces de Mts. Al analizar hifas maduras de *M. brunneum* expresando Mts-sGFP, se pudo determinar la presencia de pocos y largos haces de Mts que se

arreglan longitudinalmente en toda la hifa en crecimiento. Este arreglo de Mts, concuerda con lo descrito en *A. nidulans* y *U. maydis*, donde se observan pocos haces de Mts altamente dinámicos con arreglo longitudinal a lo largo de la hifa (Karina Sampson y I. Brent Heath., 2005; Cui J Tracy Zeng., 2014 Steinberg G. et al., 2001). Mientras que en *N. crassa* se ven una gran cantidad de haces de Mts, tanto citoplasmáticos como corticales, con un arreglo longitudinal a lo largo de la hifa y que avanzan con el crecimiento como una unidad (Mouriño-Pérez RR. et al., 2006; Mouriño-Pérez RR. et al., 2013; Callejas-Negrete OA. et al., 2015; Mouriño-Pérez RR. et al., 2016). Por otro lado, se ha descrito que la cantidad de haces de microtúbulos está relacionada directamente con el grosor de las hifas y velocidad de crecimiento, ya que al tener menor cantidad de componentes intracelulares (para los requerimientos nutricionales y energéticos), se requieren menor cantidad de Mts para su transporte y posicionamiento. Unos ejemplo de ello es el caso de *N. crassa*, que es un hongo que mide entre 10-15 μm de grosor, con una tasa de crecimiento muy alta de 24 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Araujo-Palomares C., et al., 2009; Potapova TV. et al., 2016), mientras que en *A. nidulans*, que es un hongo con hifas mucho más delgadas con un grosor de 3-5 μm , su velocidad de crecimiento es mucho menor de 0.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Schultzhaus Z. et al., 2016). Concordando con este último, *M. brunneum* tiene una tasa de crecimiento de 0.45 $\mu\text{m}/\text{min}$ y sus hifas tienen un grosor de 2-4 μm (**Figura 28**).

4.2. Dinámica de diferentes componentes intracelulares y su relación con el citoesqueleto microtubular en *M. brunneum*

En este trabajo se pudo establecer la relación que existe entre el citoesqueleto microtubular con diferentes elementos cargo en *M. brunneum*, lo anterior mediante el uso de cepas etiquetadas con GFP y colorantes vitales que permitieron visualizar distintos componentes intracelulares, además de la droga BML que despolimeriza los Mts, que ha sido ampliamente utilizado en distintos hongos filamentosos como *N. crassa*, *A. nidullans*, *U. maydis*, entre otros (Ramos-García SL., 2009; Horio T y Oakley B.R., 2004; Fink G. y Steinberg G., 2006).

Se ha descrito en diferentes organismos que los peroxisomas son organelos derivados del retículo endoplasmático que, además de tener un papel esencial en el metabolismo lipídico, también participa en la desintoxicación celular (Neuhaus A. et al., 2016; Salogiannis et al., 2016, Congping L. et al., 2016). En *M. brunneum* se determinó que los peroxisomas se encuentran distribuidos uniformemente en toda la hifa en forma de grandes puntos fluorescentes y que el 90% de la población total se mueven sobre su propio

eje, mientras que el 10% se desplazan en distintas direcciones con velocidades de 3.07 $\mu\text{m/s}$ hasta 15.8 $\mu\text{m/s}$, el cual se ve afectado al utilizar BLM a 0.25 $\mu\text{g/mL}$ y 0.375 $\mu\text{g/mL}$, observándose una disminución en el número de partículas fluorescentes con movimiento, así como la velocidad de desplazamiento (0.54 a 5.3 $\mu\text{m/s}$). Estos datos concuerdan con la organización y dinámica en hongos filamentosos como *U. maydis*, *A. nidulans* y *N. crassa*, donde se ha reportado que un pequeño porcentaje (5-10%) de los peroxisomas se desplazan de forma rápida y dirigida, mientras que el restante la movilidad es difusiva no dirigida (Guimaraes SC. et al., 2015; Congping L. et al., 2016; Steinberg 2016; Ramos Pulido Juan, 2020). Además de que, en estos organismos, los peroxisomas requieren del citoesqueleto microtubular para su desplazamiento (Steinberg 2016; Ramos Pulido Juan, 2020). Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten dilucidar que, el movimiento de los peroxisomas en *M. brunneum* es influenciado por los Mts. Al no encontrarse organizados correctamente los haces, las proteínas motoras y las cargas no pueden desplazarse correctamente, provocando una inadecuada distribución intracelular, lo que conlleva a un mal desarrollo del organismo.

Los cuerpos lipídicos son organelos de almacena de lípidos neutros que tienen múltiples funciones como son la homeostasis energética, metabolismo lipídico, y en el caso de los hongos también participan en la resistencia a toxinas producidas por otros organismos como mecanismo de defensa (Chang W. et al., 2015; Chao-Wen Wang., 2015). Para visualizar los cuerpos lipídicos en *M. brunneum* se utilizó el colorante vital BODIPY, este colorante ha sido usado en otros hongos como *Phaeosphaeria sp* y *Schizosaccharomyces pombe*, y en estos organismos se observó que los cuerpos lipídicos son estructuras semiesféricas distribuidas en toda la célula con movimiento (Chang W. et al., 2015; Princová J. et al., 2019). Lo anterior concuerda con nuestros resultados, ya que se determinó estructuras fluorescentes de diferentes tamaños semiesféricas, distribuidas en toda la hifa con movimiento de desplazamiento lento tanto anterógrado como retrogrado y que al tratar con la droga despolimerizadora de los Mts, estos organelos se ven alterados, observándose cúmulos en la región subapical y basal de la hifa con poco o nulo movimiento. Lo que nos indica que al igual que los peroxisomas, los cuerpos lipídicos también son dependientes del citoesqueleto microtubular para su desplazamiento y correcto posicionamiento.

Como no existían reportes a cerca de la presencia de un Spk en el género *Metarhizium*, se evaluó la presencia de éste mediante el colorante lipofílico FM4-64. Se determinó que efectivamente *M. brunneum* presentó una estructura fluorescente brillante en forma de medialuna en la punta de la hifa, y que esta estructura alcanzaba la membrana plasmática apical, el cual se movía siguiendo la direccionalidad del crecimiento de la célula. Esta estructura correspondería más a un AVC (Apical Vesicle Crescent) que a un Spk propiamente. Se ha descrito en diferentes hongos filamentosos, que el Spk es un cuerpo apical

redondo y complejo compuesto por vesículas secretoras de diferentes tamaños, componentes del citoesqueleto (microtubular y de actina) y proteínas de señalización. En cambio, el AVC es pequeño, menos complejo y con forma de medialuna, y aun que se sabe poco de su composición, se conoce que está conformado principalmente de vesículas secretoras. A pesar de las diferencias que presentan estas estructuras, se conoce que ambos cuerpos influyen en el crecimiento y la morfogénesis de las hifas (R. W. Roberson., 2020). El tratamiento de *M. brunneum* con BML mostro alteraciones en el AVC, no observándose claramente y desaparecía eventualmente. Estos datos lo que nos indican es que la desestabilización del citoesqueleto microtubular altera el transporte vesicular, concordando con lo descrito en otros organismos como *N. crassa*, *A. nidulans* entre otros, donde describen que vesículas secretoras son transportadas a larga distancia hacia el Spk a través de los Mts (Bracker y Murphy., 1992; Riquelme et al., 1998; R. W. Roberson., 2020).

La pared celular en hongos es una estructura dinámica conformada por diferentes componentes que incluyen glucanos, glicoproteínas y microfibrillas de quitina (Free SJ., 2013; Mahadevan PR., Tatum EL., 1967). Usando el colorante blanco de calcoflúor. Cuya característica es de tener afinidad por la quitina que conforma la pared celular (Xueling Su et al., 2020), en *M. brunneum* se determinó una señal de fluorescencia definida en toda la hifa correspondiente a la pared celular, observándose diferencias en el grosor de ésta en distintas regiones de la célula; región subapical y basal ($0.36 \pm 0.07 \mu\text{m}$; n=15), septos ($0.8 \pm 0.07 \mu\text{m}$; n=15) y estando más gruesa la pared en el ápice ($2,2 \pm 0.3 \mu\text{m}$; n=15). Este resultado nos sugiere que posiblemente el grosor de la pared presente en la punta de la hifa es necesario para la penetración al insecto hospedero por la fuerza que debe ejercer al atravesar la cutícula del insecto. En otros organismos como *N. crassa*, *A. nidullans* (organismos no patógenos) no se observa diferencias en el grosor de la pared celular (Ramirez del Villar et al., 2019; Lichius A, Zeilinger S., 2019). Al tratar con BML a las células y el colorante vital, se observó una menor acumulación de pared celular en el ápice ($0.83 \pm 0.2 \mu\text{m}$; n=8) comparado con la cepa sin tratar, aunque el grosor en los septos ($0.7 \pm 0.09 \mu\text{m}$; n=15) y la pared celular de la región basal y subapical ($0.32 \pm 0.07 \mu\text{m}$; n=10) no se vio afectado. Estos resultados indican que un alterado transporte de vesículas que llevan componentes para la formación de la pared celular, debido a la desestabilización de los Mts, conlleva a un defecto en la deposición de la pared en la región apical de la hifa en *M. brunneum*.

Las mitocondrias son estructuras tubulares responsables de la producción de energía en forma de ATP (Hickey P. y Read N. et al., 2009; English AM. et al., 2020). Para su visualización, se necesita el uso de marcaje con proteínas fluorescentes o bien mediante tinción con colorantes vitales (Hickey P. y Read N. et al., 2009). Para poder visualizar las mitocondrias en *M. brunneum*, se probaron tres colorantes;

SYTO®Red, MitoTracker Red y Mitotracker Green, siendo este último el óptimo para el análisis. Se determinó en *Metarhizium*, que las mitocondrias son estructuras tubulares en forma de filamentos largos distribuidos en toda la hifa y algunas partículas fluorescentes que puede corresponder a mitocondrias redondas. Cuando se realizó el tratamiento con BML, se observó aglomeración de las mitocondrias, aparentemente fragmentadas y mal posicionadas. Este tipo de dinámica ya ha sido descrita en diferentes hongos filamentosos concordando específicamente con la dinámica descrita en *A. nidullans* (Hickey P. y Read N. et al., 2009; Garrido-Bazán 2020). En *N. crassa* las mitocondrias se ven estructuras en forma de filamento cortos delgados, distribuidos en toda la hifa, observándose mayor abundancia en la punta de esta, debido a que en este lugar se requiere altos niveles de ATP para mantener el crecimiento de la hifa. Por otra parte, en este mismo organismo, se ha descrito que la distribución de las mitocondrias es alterada cuando el citoesqueleto microtubular es desestabilizado (Bowman BJ. et al., 2009; Callejas-Negrete OC. et al., 2015)

Capítulo 5. Conclusiones

- Los Mts en *M. brunneum*, se encuentran distribuidos a lo largo de la hifa en forma de haces largos poco abundantes, y la cantidad de Mts está relacionado directamente con la velocidad de crecimiento del organismo.
- La desestabilizar los Mts, alteran la dinámica y posicionamiento de los Peroxisomas, cuerpos lipídicos, mitocondrias, AVC (Apical Vesicle Crescent) y la deposición de la pared en el ápice de la hifa, lo que indica que su distribución y transporte es dependiente del citoesqueleto microtubular.

Literatura citada

- Alcazar-Fuoli, L., Bayry, J., y Aïmanianda, V. 2020. The role of the fungal cell wall in host-fungal interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 392.
- Neuhaus, A., Eggeling, C., Erdmann, R., Schliebs, W., 2016. Why do peroxisomes associate with the cytoskeleton? *Biochim biophys acta*. 1863(5):1019-26. doi: 10.1016/j.bbamcr.
- Bartoszewska, M., Opaliński, Ł., Veenhuis, M., y van der Klei, I. J. 2011. The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology letters*, 33(10), 1921-1931.
- Beccaccioli, M., Reverberi, M., y Scala, V. 2019. Fungal lipids: Biosynthesis and signalling during plant-pathogen interaction. *Front. Biosci. -Landmark*, 24, 172-185.
- Behie, S., Zelisko, P., Bidochka, M., 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, 22;336(6088):1576-7. doi: 10.1126/science.1222289.
- Bowman, B. J., Draskovic, M., Freitag, M., y Bowman, E. J. 2009. Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 8(12), 1845-1855.
- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. D. R., Moonjely, S., Bidochka, M. J., y Toriello, C. 2019. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol science and technology*, 29(1), 83-102.
- Callejas-Negrete OA., Plamann, M., Schnittker, R., Bartnicki-García S., Roberson, RW., Pimienta, G., Mouriño-Pérez RR. 2015. Two microtubule-plus-end binding proteins LIS1-1 and LIS1-2, homologues of human LIS1 in *Neurospora crassa*. *Fungal genet biol*. 2015 Sep; 82:213-27. doi: 10.1016/j.fgb.2015.07.009.
- Chang, W., Zhang, M., Zheng, S., Li, Y., Li, X., Li, W. y Lou, H. 2015. Trapping toxins within lipid droplets is a resistance mechanism in fungi. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.
- Clarkson, J. M., y Charnley, A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in microbiology*, 4(5), 197-203.
- Collins, T. J. 2007. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(S1), S25-S30.
- Covill-Cooke, C., Toncheva, V. S., y Kittler, J. T. 2021. Regulation of peroxisomal trafficking and distribution. *Cellular and molecular life sciences*, 78(5), 1929-1941.
- Davis, K. A., Sampson, J. K., and Panaccione, D. G. 2020. Genetic reprogramming of the ergot alkaloid pathway of *Metarhizium brunneum*. *Applied and environmental microbiology*, 86(19), e01251-20.

- Dent, E. W., Gupton, S. L., y Gertler, F. B. 2011. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold spring harbor perspectives in biology*, 3(3), a001800.
- Derksen, J., Emons, A.M., 1990. Microtubules in tip growing systems. In: Heath, I.B. (Ed.), *Tip growth in plant and fungal cells*. Academic press, San Diego.
- English, A. M., Schuler, M. H., Xiao, T., Kornmann, B., Shaw, J. M., y Hughes, A. L. 2020. ER-mitochondria contacts promote mitochondrial-derived compartment biogenesis. *Journal of cell biology*, 219(12).
- Fang, W., Pei, Y., Bidochka, M.J. 2006. Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Can J Microbiol*. 52(7):623-6.
- Fink, G., y Steinberg, G. 2006. Dynein-dependent motility of microtubules and nucleation sites supports polarization of the tubulin array in the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular biology of the cell*, 17(7), 3242-3253.
- Free, S. J. 2013. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in genetics*, 81, 33-82.
- Freitag, M., Hickey, P.C., Raju, N.B., Selker, E.U., Read, N.D., 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal genet. Biol.* 41, 897-910.
- Garrido-Bazán, V., Pardo, J. P., y Aguirre, J. 2020. DnmA and FisA mediate mitochondria and peroxisome fission, and regulate mitochondrial function, ROS production and development in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in microbiology*, 11, 837.
- Garvalov, B.K., Zuber, B., Bouchet-Marquis C., Kudryashev, M., Gruska, M., Beck, M., Leis, A., Frischknecht, F., Bradke, F., Baumeister, W., Dubochet, J., Cyrklaff, M., 2006. Luminal particles within cellular microtubules. *J Cell Biol.* 11;174(6):759-65.
- González-Hernández, G. A., Padilla-Guerrero, I. E., Martínez-Vázquez, A., y Torres-Guzmán, J. C. 2020. Virulence factors in the entomopathogen genus *Metarhizium*. *Current protein y peptide science*, 21(3), 324-330.
- Haimo, LT. 1997. Ordering microtubules. *Bioessays*. 19(7):547-50.
- Hickey, P. C., y Read, N. D. 2009. Imaging living cells of *Aspergillus* in vitro. *Medical mycology*, 47(Supplement_1), S110-S119.
- Howard, R. J., Aist, J. R., 1980. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. *J Cell Biol.* 87(1):55-64.

- Horio, T., y Oakley, B. R. 2005. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Molecular biology of the cell*, 16(2), 918-926.
- Kobae, Y., Gutjahr, C., Paszkowski, U., Kojima, T., Fujiwara, T., y Hata, S. 2014. Lipid droplets of arbuscular mycorrhizal fungi emerge in concert with arbuscule collapse. *Plant and cell physiology*, 55(11), 1945-1953.
- Liao X, O'Brien T. R., Fang, W., St. Leger, R., 2014. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied genetics and molecular biotechnology*, Vol. 98, pp 7089-7096, DOI 10.1007/s00253-014-5788-2.
- Lichius, A., y Zeilinger, S. 2019. Application of membrane and cell wall selective fluorescent dyes for live-cell imaging of filamentous fungi. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (153), e60613.
- Mahadevan, P. R., y Tatum, E. L. 1967. Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*. *The journal of cell biology*, 35(2), 295-302.
- Meyling, N. V., y Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. 43, 145–155.
- Morales Hernandez, C. E., Padilla Guerrero, I. E., Gonzalez Hernandez, G. A., Salazar Solis, E., Torres Guzman, J. C., 2010. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Appl microbiol biotechnol.* 87(3):1033-44. doi: 10.1007/s00253-010-2517-3.
- Motta-Delgado, P. A., Murcia-Ordoñez, B., 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente y agua - An interdisciplinary journal of applied science*, vol. 6, núm. 2, pp. 77-90, doi:10.4136/1980-993X.
- Mouriño-Pérez, R. R., Linacre-Rojas, L. P., Roman-Gavilanes, A. I., Lew, T. K., Callejas-Negrete, O. A., Roberson, R. W., y Freitag, M. 2013. MTB-3, a microtubule plus-end tracking protein (+ TIP) of *Neurospora crassa*. *PLoS one*, 8(8), e70655.
- Mourino-Pérez, R. R., Roberson, R. W., y Bartnicki-García, S. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology*, 43(6), 389-400.
- Mouriño-Pérez, R. R., y Riquelme, M. 2013. Recent advances in septum biogenesis in *Neurospora crassa*. *Advances in genetics*, 83, 99-134.
- Nakazato, L., Dutra, V., Broetto, L., Staats, C. C., Vainstein, M. H., y Schrank, A. 2006. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef-1 α* homologous promoter. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(3), 521-528.

- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., Vázquez-Montoya, E. L. 2012. Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai* Vol. 8, Número 3, septiembrediciembren2012.
- Navarro-Espíndola, R., Suaste-Olmos, F., y Peraza-Reyes, L. 2020. Dynamic regulation of peroxisomes and mitochondria during fungal development. *Journal of fungi*, 6(4), 302.
- Nédélec, F., Surrey, T., Karsenti, E. 2003. Self-organisation and forces in the microtubule cytoskeleton. *Curr Opin cell biol.* 15(1):118-24
- Neuhaus, A., Eggeling, C., Erdmann, R., y Schliebs, W. 2016. Why do peroxisomes associate with the cytoskeleton?. *Biochimica et biophysica Acta (BBA)-Molecular cell research*, 1863(5), 1019-1026.
- Oakley, B. R., Morris, N. R. 1980. Nuclear movement is beta-tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell.* 19(1):255-62.
- Oakley, B. R. 2000. An abundance of tubulins. *Trends cell Biol.* 10(12):537-42. Xiang X, Plamann M., 2003. Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(6):628-33.
- Padilla Guerrero, I. E. 2010. Tesis Doctorado. Estudio de la participación de genes de expresión diferencial en el proceso patogénico de *Metarhizium anisopliae*. Universidad de Guanajuato.
- Princová, J., Schätz, M., Ťupa, O., y Převorovský, M. 2019. Analysis of lipid droplet content in fission and budding yeasts using automated image processing. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (149), e59889.
- Promega corporation, 1998. pGEM®-T and pGEM®-T Easy vector systems. Technical manual, (042), 1. Consultado el 20 de enero de 2022, de https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf?rev=42b7715403bf452cb4487ac142d2c61c&sc_lang=en
- Pulido, J. M., Guerrero, I. P., Martínez, I. D. J. M., Valadez, B. C., Guzman, J. C. T., Solis, E. S., ... y Hernandez, A. G. 2011. Isolation, characterization, and expression analysis of the ornithine decarboxylase gene (ODC1) of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Microbiological research*, 166(6), 494-507.
- Ramírez Cuellar, J. 2014. Tesis de licenciatura. Factores que afectan la expresión de genes 2np y localización peroxisomal de proteínas 2Np de *Metarhizium anisopliae*. Universidad de Guanajuato.
- Ramos-García, S. L., Roberson, R. W., Freitag, M., Bartnicki-García, S., y Mouriño-Pérez, R. R. 2009. Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 8(12), 1880-1890.

- Ramos Pulido, J. 2020. Estudio de los peroxisomas y las peroxinas en el desarrollo vegetativo y sexual de *Neurospora crassa*. Tesis de maestría en ciencias de la vida. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada, Baja California. 93 pp.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., ... y Mouriño-Pérez, R. R. 2018. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiology and molecular biology reviews*, 82(2).
- Roberts, D. W., y St Leger, R. J. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology*, 54(1), 1-70.
- Salogiannis, J., Egan, M. J., Reck-Peterson, S. L., 2016. Peroxisomes move by hitchhiking on early endosomes using the novel linker protein PxdA. *J Cell Biol.* 1;212(3):289-96. doi: 10.1083/jcb.201512020.
- Sambrook, J., y Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York. Cold spring harbor laboratory press.
- Sampson, K., y Heath, I. B. 2005. The dynamic behaviour of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 151(5), 1543-1555.
- Sasan, R. K., y Bidochka, M. J. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*, 99(1), 101-107.
- Shah, F. A., Wang, C. S., y Butt, T. M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology letters*, 251(2), 259-266.
- Steinberg, G. 2016. The mechanism of peroxisome motility in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 97, 33-35.
- Su, X., Yan, X., Chen, X., Guo, M., Xia, Y., y Cao, Y. 2021. Calcofluor white hypersensitive proteins contribute to stress tolerance and pathogenicity in entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. *Pest management science*, 77(4), 1915-1924.
- Szewczyk, E., y Oakley, B. R. 2011. Microtubule dynamics in mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology*, 48(10), 998-999.
- Torres Alí, As., Reyes Vidal, Y., López y López, Eric., De la Torre, Mayra. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *J. Avance y perspectivas* 21: 291-295.
- Van der Werf, H. M. 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, ecosystems and environment*, 60(2-3), 81-96.

- Villa Martinez, B.G. 2012. Tesis Maestría. Caracterización de genes 2nitropropano dioxigenasa de *Metarhizium anisopliae*. Universidad de Guanajuato.
- Wang, C., y St Leger, R. J. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic cell*, 6(5), 808-816.
- Wang, C. W. 2015. Lipid droplet dynamics in budding yeast. *Cellular and molecular life sciences*, 72(14), 2677-2695.
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genet Biol.*41(11):973-81.
- Zeng, C. J. T., Kim, H. R., Vargas Arispuro, I., Kim, J. M., Huang, A. C., y Liu, B. 2014. Microtubule plus end-tracking proteins play critical roles in directional growth of hyphae by regulating the dynamics of cytoplasmic microtubules in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 94(3), 506-521.
- Zhang, J., Jin, K., y Xia, Y. 2017. Contributions of β -tubulin to cellular morphology, sporulation, and virulence in the insect-fungal pathogen, *Metarhizium acridum*. *Fungal genetics and biology*, 103, 16-24.
- Zimmermann, G. 1993. *Anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. (1992), 375–379.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *biocontrol science and technology*, 17(9), 879-920.

Anexos

Anexo A Medios de cultivo y soluciones

Medio Mínimo (MM, 1 Lt)

20.0 g	Glucosa
3.0 g	KH ₂ PO ₄
1.8 g	NH ₄ NO ₃
20.0 mL	Sales 50X (MgSO ₄ 2.5%, ZnSO ₄ 0.009%, FeSO ₄ 0.005%, MnSO ₄ 0.001% y CuSO ₄ 0.002%)

En el caso del medio sólido se le adicionaron 20 g de agar por cada litro de medio.

Medio M100

10.0 g	Dextrosa
3.0 g	KNO ₃
1.8 g	NH ₄ NO ₃
60 mL	Solución M100
15 g	Agar

Adicionado con glufosinato o nourseotricina, según se necesite para la selección de cepas transformadas.

Medio Dextrosa-Sabouraud líquido (100 mL)

0.5 g	Peptona de carne	0.5%
0.5g	Peptona de caseína	0.5%
2.0 g	Dextrosa	2.0%

Medio de digestion (MD, 100)

1.0 mL	Tris-HCL 1M pH 7.0	10mM
40.0 mL	Sorbitol 3M	1.2M

Medio de regeneración líquido (RM, 100 mL)

40.0 mL	Sorbitol 3M	1.2M	
0.1 g	K ₂ HPO ₄	0.1%	
0.05 g	MgSO ₄	0.05%	
0.3 g	NaNO ₃	0.3%	
2.0 g	Dextrosa	2.0%	

Medio de regeneración solido (RM, 100 mL)

40.0 mL	Sorbitol 3M	1.2M	
0.1 g	K ₂ HPO ₄	0.1%	
0.05 g	MgSO ₄	0.05%	
0.3 g	NaNO ₃	0.3%	
2.0 g	Dextrosa	2.0%	
4.0%	Agar	4.0%	

Medio Luria-Bertani (LB, 1 Lt)

10.0 g	Bacto-Triptona	
5.0 g	Extracto de Levadura	
10.0 g	NaCl	

En el caso del medio sólido se le adicionaron 20 g de agar por litro de medio.

Medio LB-XGal-IPTG.

En los experimentos de transformación en *E. coli* (Sambrook y Russell, 2001), se utilizó este medio para la identificación de clonas recombinantes; cada litro de medio LB se suplementó con IPTG (100 mM) y 2.5 mL de X-Gal 2% en formamida (SIGMA).

Anexo B Abreviaturas

BML	Benomilo
Mts	Microtúbulos
MTOC	Centros Organizadores de Microtúbulos
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
Spk	Spitzenkörper
VSC	Centro Suministrador de Vesículas
2np	2-nitroprooano dioxigenasa
FM4-64	Pyridinium, 4-[6-[4-(diethylamino)phenyl]-1,3,5-hexatrienyl]-1-[3-(triethylammonio) propyl]-, dibromide, N-(3-Triethylammoniopropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl) hexatrienyl)pyridinium dibromide
FtsZ	Filamenting temperature-sensitive mutant Z
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Kan	Kanamicina
Nat	Nourseotricina
BODIPY	4,4-difluoro-1,3, 5, 7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno
DIC	Contraste de interfase diferencial
AVC	Apical Vesicle Crescent