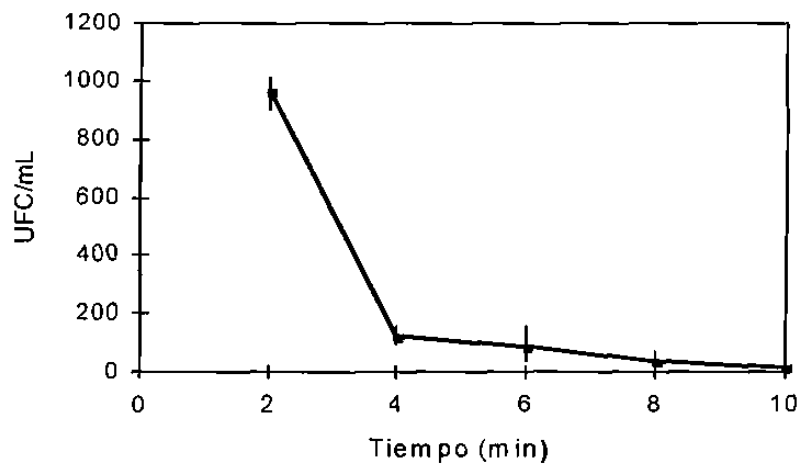


## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 Ensayo de mutagénesis

La lámpara de luz UV fue colocada a 10 cm de la suspensión de conidias. La Figura 4 muestra la curva de sobrevivencia de *B. bassiana* al tratamiento; como puede observarse, el tiempo al cual hubo menos del 1% de sobrevivencia, es decir, menos de 30 colonias, fueron 4 min, tiempo que fue seleccionado para llevar a cabo la mutagénesis y así poder seleccionar las colonias mutantes.



**Figura 4.** Porcentaje de sobrevivencia de *B. bassiana* cepa BbCh1 después de irradiación con luz UV (254 nm). 4 ml de una suspensión de  $1 \times 10^7$  a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 min a 10 cm. Posterior a la irradiación, las muestras fueron cultivadas en agar YPD y contadas para así seleccionar el tiempo de exposición. El criterio de selección del tiempo fue considerando aquel al cual se redujo la viabilidad en un 60-70%. Puede observarse que a 4 min el porcentaje de sobrevivencia es menor al 1%. Los datos de la gráfica muestran la media de tres repeticiones diferentes.

## 6.2 Selección de las cepas mutantes

Después de la exposición a la luz ultravioleta fueron obtenidas alrededor de 10000 colonias mutantes, de las cuales, fueron seleccionadas 136 colonias mutantes, que fueron sembradas en cajas con AC, diariamente se hicieron observaciones en cuanto al crecimiento, así mismo, también fueron medidos el diámetro de la colonia y el halo de hidrólisis. Ejemplo de ello se puede observar en la Tabla 4. El resto de las colonias se enlistan en el apéndice C. Las cepas mutantes fueron seleccionadas por su habilidad de producir halos de hidrólisis alrededor de la colonia, cuando las cepas fueron crecidas en cajas con agar suplementado de leche descremada (AC). De estas 136 colonias se hizo una selección inicial de 36, las cuales presentaron un halo de hidrólisis mayor que el de la cepa paterna, y fueron sembradas nuevamente en cajas con AC y monitoreadas diariamente en cuanto al desarrollo del halo de hidrólisis, así como su estabilidad, algunas de ellas no fueron estables en el desarrollo del halo de hidrólisis, que fue disminuyendo conforme las resiembras.

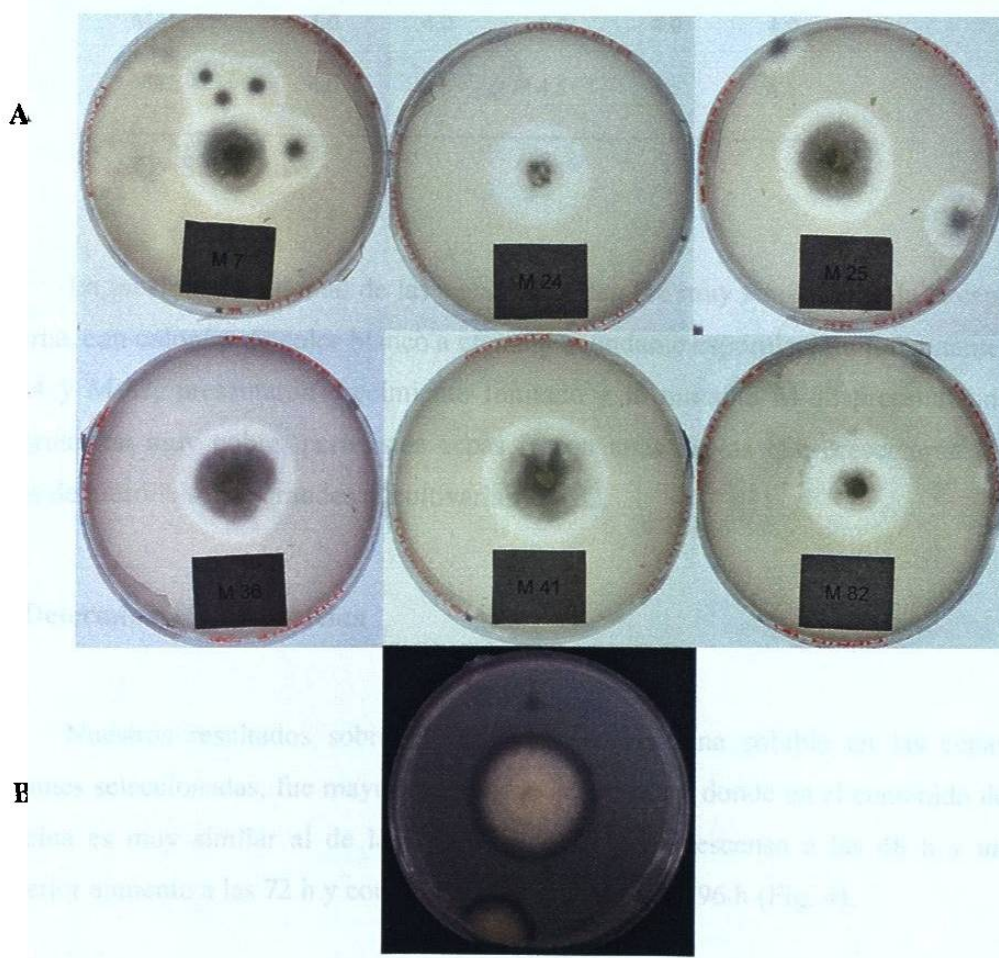
**TABLA 4**  
Ejemplo del desarrollo del halo de hidrólisis de las cepas mutantes obtenidas por medio de luz ultravioleta. Observación en medio de agar caseína\*.

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
Paterna	6	0.5	D	9	1	D	14	1.5	D	19	4	C
1	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
2	5	1	D	8	1	D	14	1	D	28	1.5	C
3	5	0.5	D	6	1	D	13	1	D	27	1.5	C
4	4	1.5	C	7	1.5	D	12	1.5	C	27	1	C
5	5	1	D	8	1	D	14	1	D	22	2.5	C
6	6	1	C	10	1.5	C	14	1.5	C	26	4	C
7	6	1	C	9	1	C	12	1	C	27	3.5	C
8	5	0	-	5	0	-	6	0.5	D	17	2	C
9	4	1	D	7	1.5	C	13	1	C	27	1.5	C
10	5	1	C	9	1	C	13	1.5	C	29	1.5	C
11	6	1	C	9	1	C	13	1	C	23	2	C
12	4	1.4	C	8	1.5	C	13	1	C	23	2.5	C
13	4	1	D	6	1.5	D	11	1	D	25	1	C
14	5	1	D	9	1.5	D	14	1.5	C	27	2	C
15	5	1.5	D	9	1	D	14	0.5	D	26	1.5	C
16	4	0.5	D	5	1	D	7	1.5	C	22	1	C

\* Una suspensión de 4 ml ( $1 \times 10^7$  esporas / ml) fue irradiada, inoculados en AC e incubada 7 días a 28°C en la oscuridad. Las cepas mutantes fueron seleccionadas por el tamaño de halo de hidrólisis, formación de zonas claras alrededor de la colonia. Col- Colonia, H- Halo, A- Apariencia del halo (C-Claro, D-Difuso).

### 6.3 Estabilidad de las cepas mutantes

La estabilidad de las mutantes fue determinada realizando cultivos sucesivos y alternados en agar YPD y AC. De las 36 colonias seleccionadas previamente, 6 cepas fueron estables al menos a 5 subcultivos alternados en agar YPD y AC. En la tabla 6 se presenta el tamaño del halo de hidrólisis durante los 5 subcultivos de las 6 colonias seleccionadas, en AC, así como también en la figura 5 se muestra la imagen del halo formado por las diferentes cepas crecidas en agar caseína, en esta imagen puede observarse que los halos de hidrólisis de las cepas mutantes designadas como M-7, M-24, M-25, M-36, M-41 y M-82, son mayores al de la cepa paterna.



**Figura 5** Desarrollo del halo de hidrólisis de las cepas Paterna y mutantes crecidas en Agar Caseína y medidas a los 5 días de cultivo. Panel A, mutantes; Panel B, Paterna.

TABLA 5

Tamaño del halo de hidrólisis, en AC, durante los cinco subcultivos sucesivos y alternados en AC y agar YPD. Medida a los cinco días de cultivo.

Cepa	SC 1	SC2	SC3	SC4	SC5
Paterna	2.5	2.5	3.0	3.0	3.0
M7	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
M24	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
M25	4.0	3.5	4.5	4.0	4.5
M36	3.0	3.5	4.0	4.0	4.0
M41	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
M82	4.0	4.5	4.5	4.5	4.5

SC= Subcultivo

La morfología colonial de las cepas mutantes fue muy similar a la de la cepa paterna, con colonias de color blanco a crema y abundante esporulación. La mutantes M-24 y M-82, presentaron crecimiento limitado y la mutante M-82 presento una esporulación muy pobre, pero estas cepas fueron unas de las que presentaron los halos de hidrólisis más grandes al cultivarlas en AC.

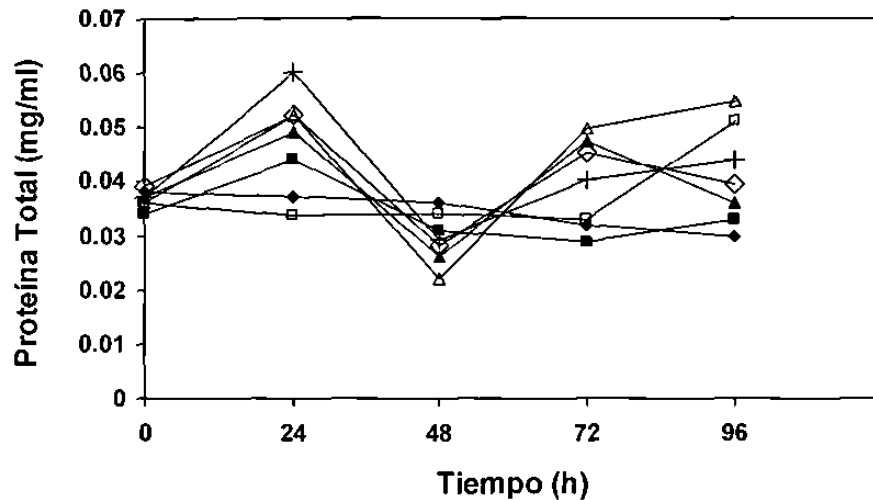
#### 6.4 Determinación de proteína

Nuestros resultados sobre el contenido de proteína soluble en las cepas mutantes seleccionadas, fue mayor después de 72 h día, en donde en el contenido de proteína es muy similar al de la cepa paterna, con un descenso a las 48 h y un posterior aumento a las 72 h y con muy poco aumento a las 96 h (Fig. 4).

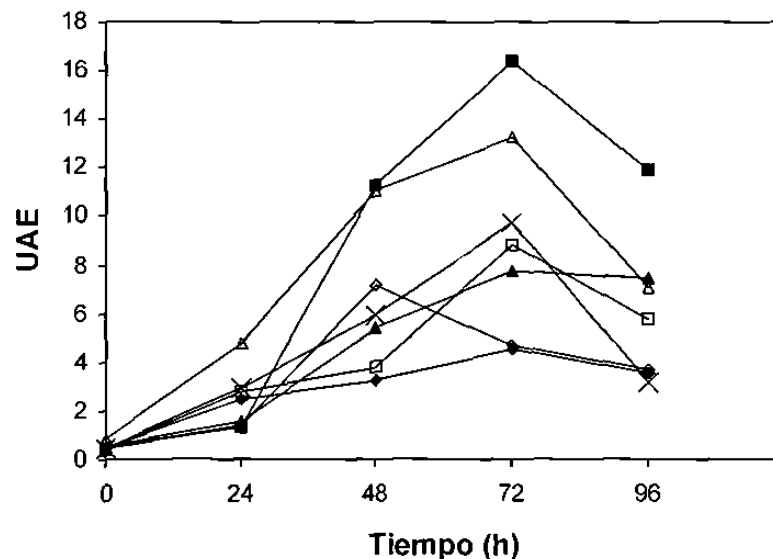
#### 6.5 Inducción de la actividad proteasa

La actividad general de proteasa fue determinado cada 24 h. Cuando las diferentes cepas de *B. bassiana* fueron crecidas en el medio mínimo de sales

adicionada con 1% de gelatina, la máxima actividad fue detectada al tercer día (72 h) en todas las cepas excepto en la mutante M-82 que se detectó a las 48 h y con una mayor actividad que la de la cepa paterna, al menos de dos veces, en todas las cepas mutantes (Figura 7).

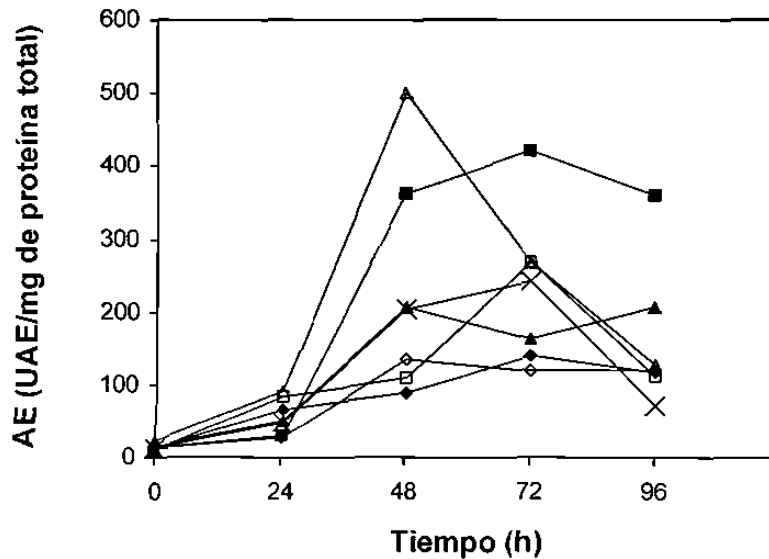


**Figura 6-** Proteína total de la cepa paterna y mutantes. La proteína fue cuantificada directamente de los filtrados de los cultivos mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como estándar. Puede observarse que el contenido de proteína en todas las cepas es muy similar al de la cepa paterna. -◆- Cepa Paterna, +-M7, -▲- M24, -△- M25, -+M 36; -□- M41 y -◇-- M82. Proteína total a las 72h.



**Figura 7** Actividad enzimática (UAE) de las cepas paternas y mutantes. La actividad enzimática fue hecha utilizando azocaseína como sustrato (Secades y Gujarro, 1999). La mayor actividad enzimática se detectó a las 72 h en todas las cepas excepto en la cepa mutante M 82, la cual se detectó a las 48 h. -◆- Cepa Paterna, +- M7, -▲- M24, -△-M25,-+M 36; -□- M41 y -◇-- M82. UAE – Unidades de Actividad enzimática. Actividad enzimática a las 72 h.

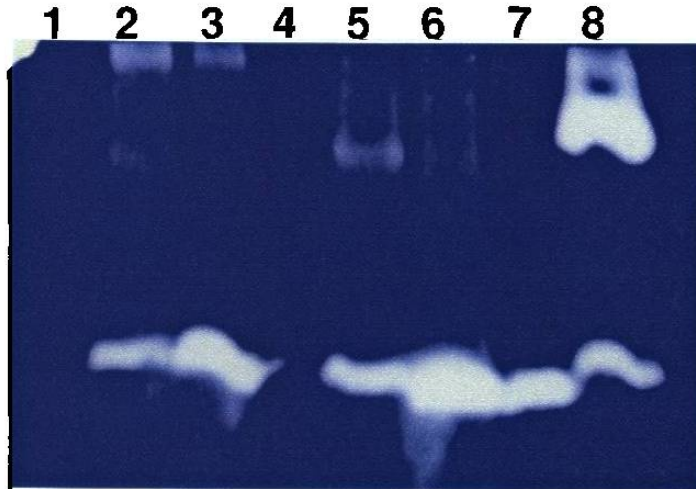
En cuanto a la actividad específica, todas las cepas presentaron una actividad específica mayor o igual a la de la cepa paterna, siendo las cepas mutantes M-25, M-7 y M-36 las que presentaron una mayor actividad específica, encontrándose esta en diferentes tiempos durante la cinética, la mutante M-25 presentó la mayor actividad específica a las 48 h, así como también la M-82, mientras que todas las demás cepas la presentaron a las 72 h (Figura 8).



**Figura 8** Actividad específica (AE) de las cepas paterna y mutantes. Puede observarse que todas las mutantes presentan una mayor actividad específica que la cepa paterna -◆- Cepa Paterna, -□- M7, -▲- M24, -△-M25,-×- M36, -◇- M41 y -◇-- M82. UAE = Unidades de Actividad Enzimática. Actividad enzimática a las 72 h

### 6.6 Perfil de producción de proteasas

El perfil de producción de proteasas, es decir el número y el tamaño de las proteasa extracelulares producidas tanto por la cepa paterna como por las cepas mutantes, fue evaluado mediante zimogramas de caseína, el cual reveló que el perfil de producción de proteasas en algunas mutantes, tales como M7, M36 y M82 fue diferente al producido por la cepa paterna (Figura 9), pero todas las cepas mostraron una banda de actividad principal de actividad proteolítica de un peso molecular de entre los 29 y 36 kDa.



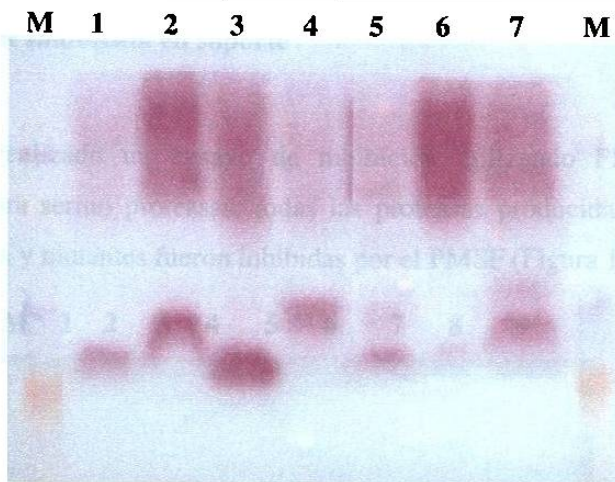
**Figura 9** Determinación del perfil de producción de proteasas por las cepas paterna y mutantes mediante un zimograma de caseína al 1.0%. Algunas de las cepas mutantes muestran un perfil de producción de proteasas diferentes al de la cepa paterna. Carriles: 1, Paterna; 2, M-7; 3, M-24; 4, control negativo; 5, M-25; 6, M-36; 7, M-41; 8, M-82.

### 6.7 Tipo de actividad

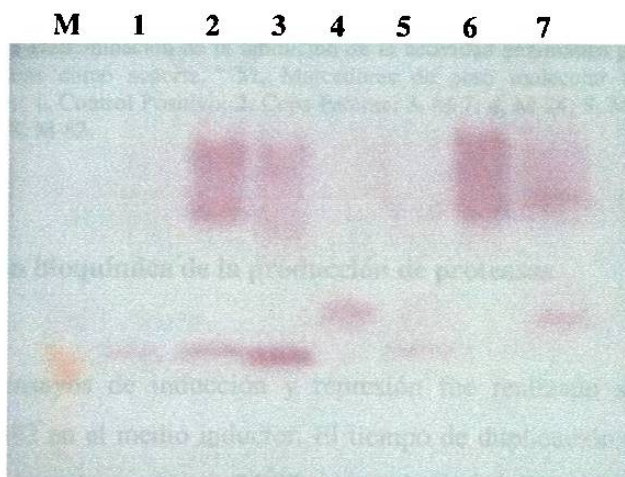
Como la mayoría de las proteasas reportadas son, principalmente de tres tipos, determinamos el tipo de actividad, tipo tripsina (Figura 10); tipo quimiotripsina (Figura 11) y tipo elastasa (Figura 11) usando sustratos sintéticos. Ninguna de las proteasas producidas por las diferentes cepas presentó actividad tipo tripsina.

M 1 2 3 4 5 6 7

**Figura 10** Determinación de actividad tipo tripsina. Ninguna de las cepas mostró este tipo de actividad con el sustrato BApNA M, Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope BIORAD); 1, Cepa Paterna; 2, M-7; 3, M-24; 4, M-25; 5, M-36; 6, M-41; 7, M-82.



**Figura 11** Determinación de actividad enzimática tipo quimiotripsina con nitrocelulosa como soporte. M.-Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope BIORAD); 1, Cepa Paterna; 2, M-7; 3, M-24; 4, M-25; 5, M-36; 6, M-41; 7, M-82.

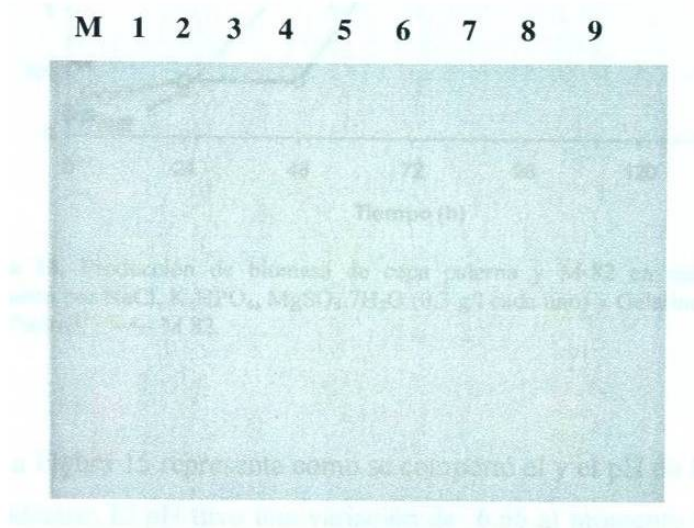


**Figura 12** Determinación de actividad enzimática tipo elastasa con nitrocelulosa como soporte. M, Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope BIORAD); 1, Cepa Paterna; 2, M-7; 3, M-24; 4, M-25; 5, M-36; 6, M-41; 7, M-82.



### 6.8 Ensayo de inhibición en soporte

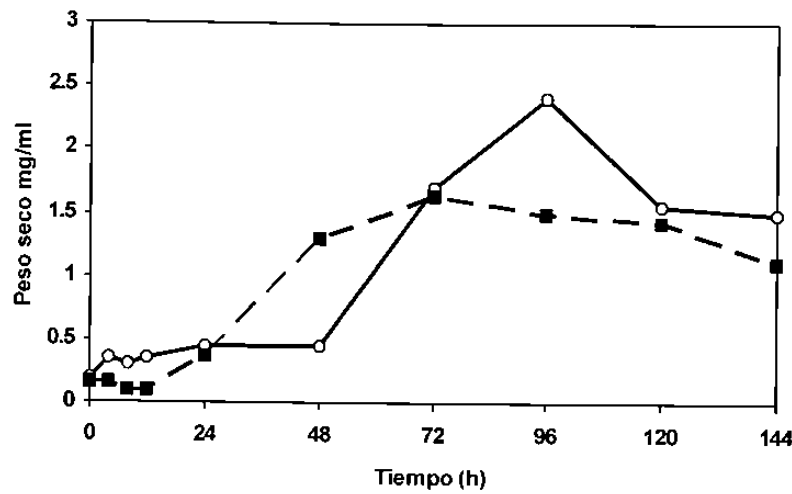
Fue realizado un ensayo de inhibición utilizando PMSF, un inhibidor específico para serino proteasas, todas las proteasas producidas por las diferentes cepas, paterna y mutantes fueron inhibidas por el PMSF (Figura 13).



**Figura 13** Determinación de la inhibición de la actividad enzimática por PMSF con nitrocelulosa como soporte. M, Marcadores de peso molecular (Kaleidoscope BIORAD); 1, Control Positivo; 2, Cepa Paterna; 3, M-7; 4, M-24; 5, M-25; 6, M-36; 7, M-41; 8, M-82.

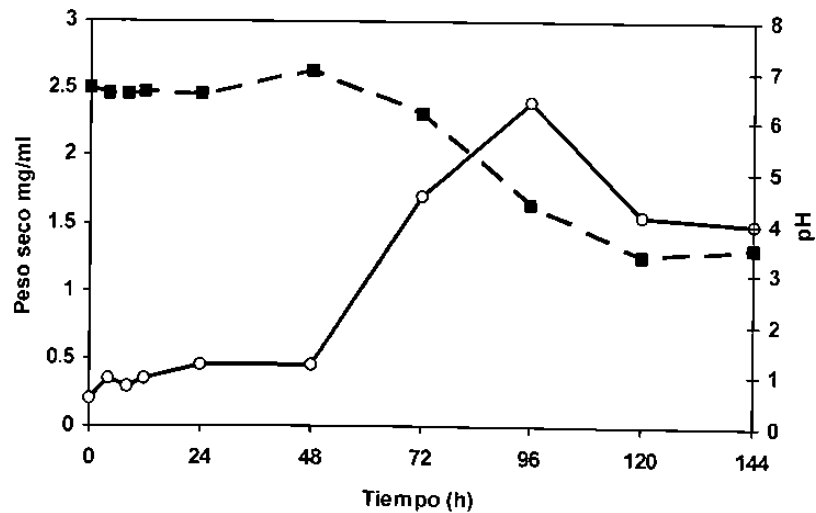
### 6.9 Represión bioquímica de la producción de proteasas

Los ensayos de inducción y represión fue realizado solo para las cepas paterna y M-82 en el medio inductor. El tiempo de duplicación de fue muy similar, 16 h y 14 h para la paterna y M-82, respectivamente. Con respecto a la biomasa (micelio), se presentó una cantidad de 1.55 mg/ml en la cepa paterna y 1.63 mg/ml en la cepa mutante (Fig. 14).



**Figura 14.** Producción de biomasa de cepa paterna y M-82 en medio inductor compuesto por NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. -●- Cepa Paterna, ---- M 82.

La Figura 15 representa como se comportó el y el pH de la cepa paterna en el medio inductor. El pH tuvo una variación de 6.66 al momento 0 h, hasta un pH de 3.37 a las 120 h, casi al final de la cinética.



**Figura 15.** Comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento de *Beauveria bassiana*, Cepa Paterna en medio inductor compuesto por NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. -●- Peso seco, ----pH.

160630

El pH de la cepa mutante en medio inductor no tuvo una variación muy marcada, de 7.22 al momento 0 h, hasta un pH = 8.86 a las 72 h (Fig. 16).

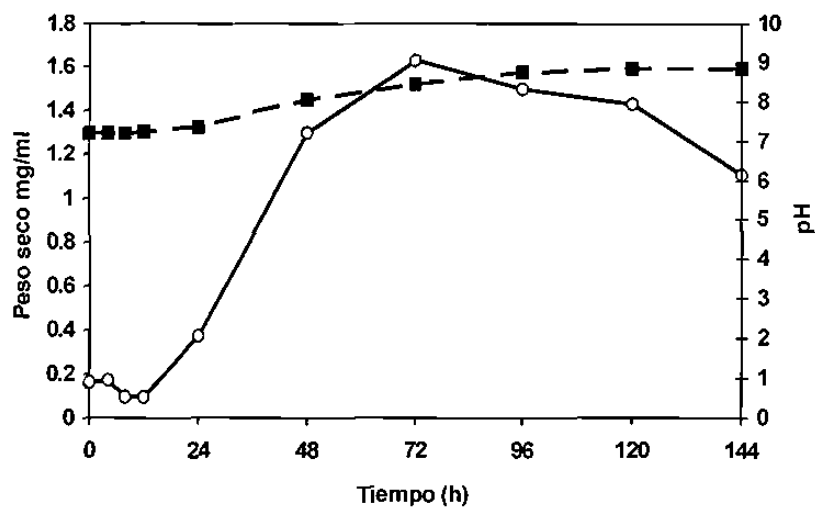


Figura 16. Variación del pH durante la cinética de crecimiento de M-82 en medio inductor compuesto por NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. -●- Peso seco, ----pH.

En la Figura 17 se muestra la concentración de esporas/ml que tuvieron la cepa paterna y M-82 en el medio inductor. La cepa paterna tuvo una producción de esporas de  $12.6 \times 10^5$  esporas/ml a las 96 h, y M-82  $15 \times 10^5$  a las 120 h.

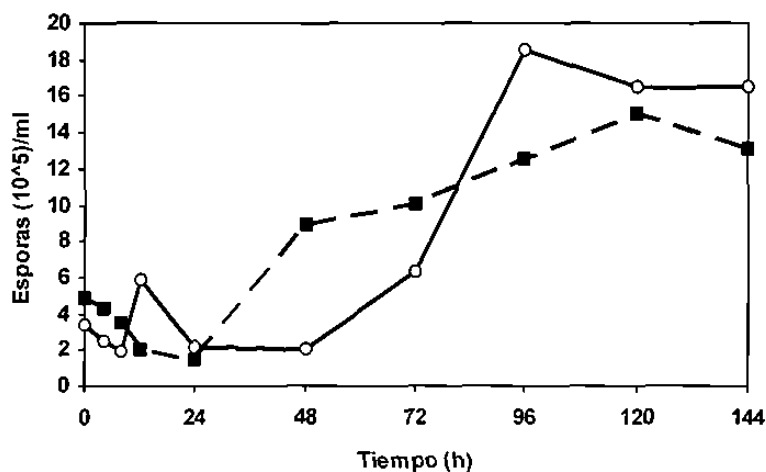


Figura 17 Producción de esporas de la cepa paterna y M-82 en medio inductor compuesto por NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. -●- Cepa Paterna, ---- M 82.

### 6.10 Cinéticas de crecimiento en medio represor

La cepa paterna tuvo 6.33 mg/ml y la mutante 4.5 mg/ml, ambas a las 120 h (Fig. 18). Los tiempos de duplicación fueron de 21 h y 16 h para las cepas, respectivamente.

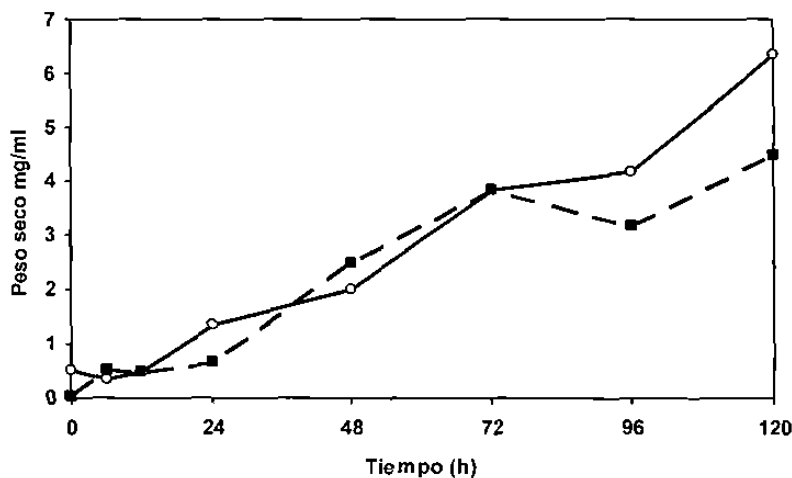


Figura 18. Biomasa de cepa paterna y M-82 en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. -●- Cepa Paterna, ---- M 82.

El consumo de la fuente de carbono del medio represor al término de la cinética se detuvo en los 2.25 g/ml con la cepa paterna (Fig. 19).

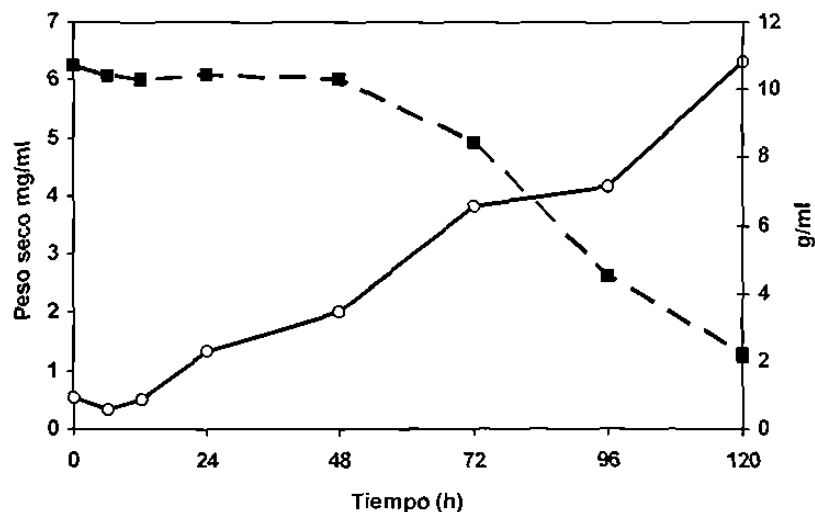
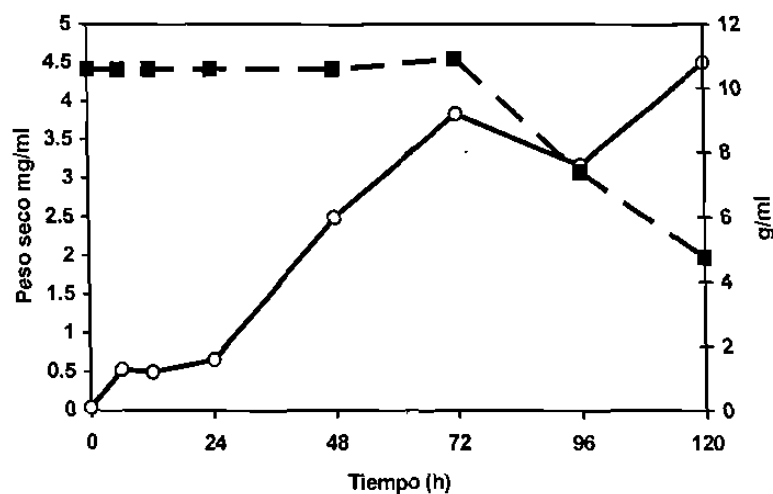
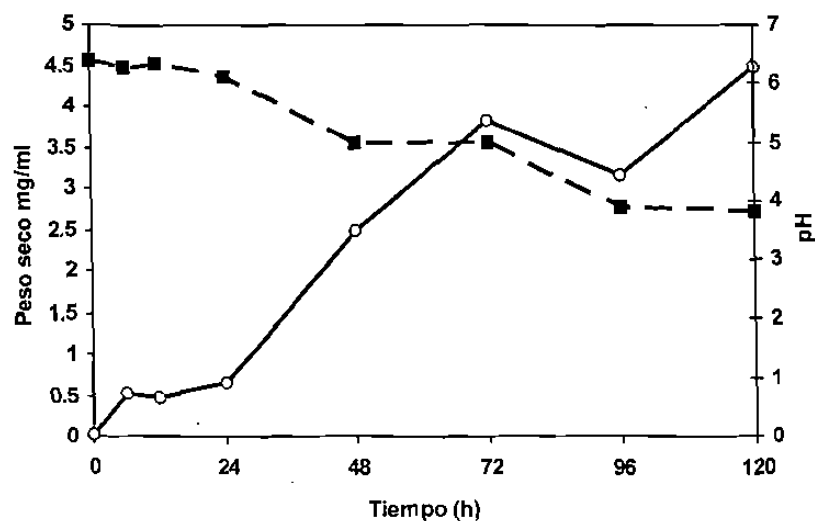


Figura 19. Consumo de glucosa (g/ml) durante la cinética de crecimiento de cepa paterna en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. -●- Peso seco, ----Glucosa.

Durante esta cinética, el pH cambió de 6.48 al tiempo 0 a 3.3 al final de la cinética, siendo el pH más bajo (Fig. 20). Al final de la cinética de crecimiento de la cepa mutante en medio represor se observó un restante de glucosa de 4.8 g/ml (Fig. 20), y se observó un pH final de 3.82 (Fig. 21).



**Figura 20.** Comportamiento del consumo de glucosa por la cepa mutante en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. -●- Peso seco, ----Glucosa



**Figura 21.** Variación del pH durante la propagación de M-82 en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. -●- Peso seco, ---pH.

La producción de esporas de la cepa paterna fue de  $33.83 \times 10^5$  a las 96 h y de la mutante  $21.16 \times 10^5$  a las 120 h, (Fig. 22).

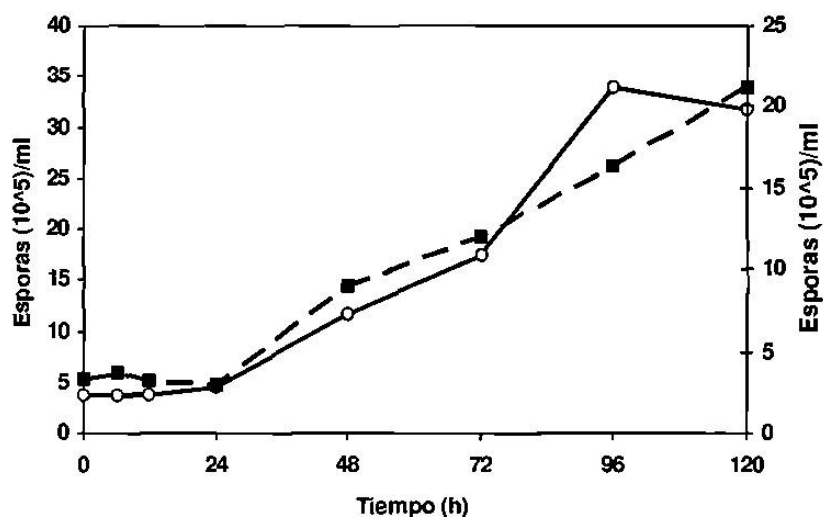


Figura 22. Producción de esporas/ ml de la cepa paterna y mutante en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1.0%. --●- Cepa Paterna, ---■- M 82H.

No se detectó actividad enzimática en las cepas paterna y mutante en el medio YPD (Figura 23 A y B) ni en medio represor (Figura 24 A y B).

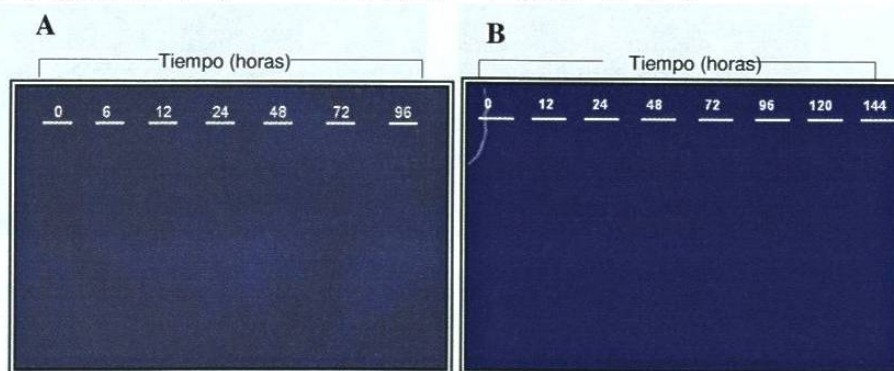
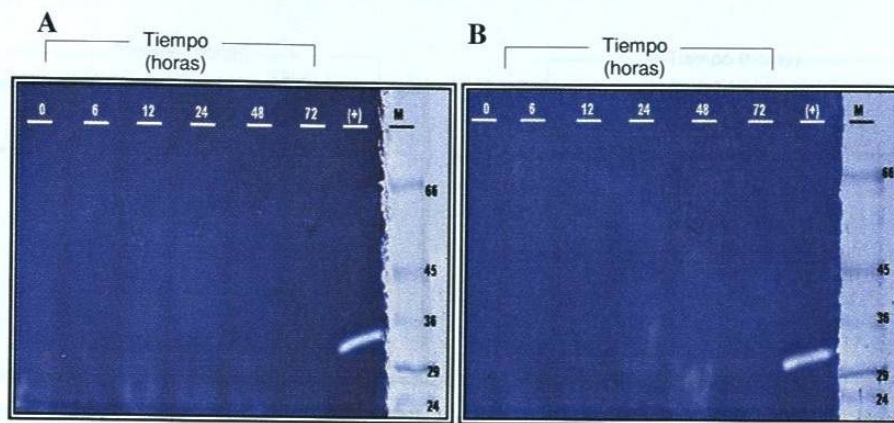
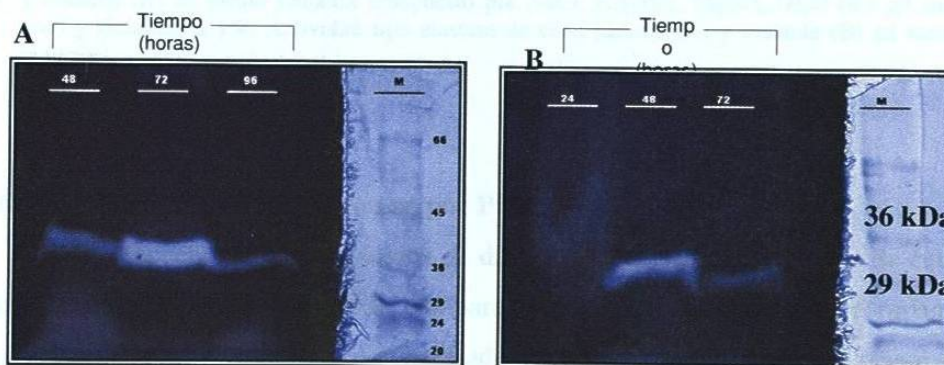


Figura 23. Zimogramas de caseína. Cepa paterna (A) y mutante M-82 (B) en medio YPD.



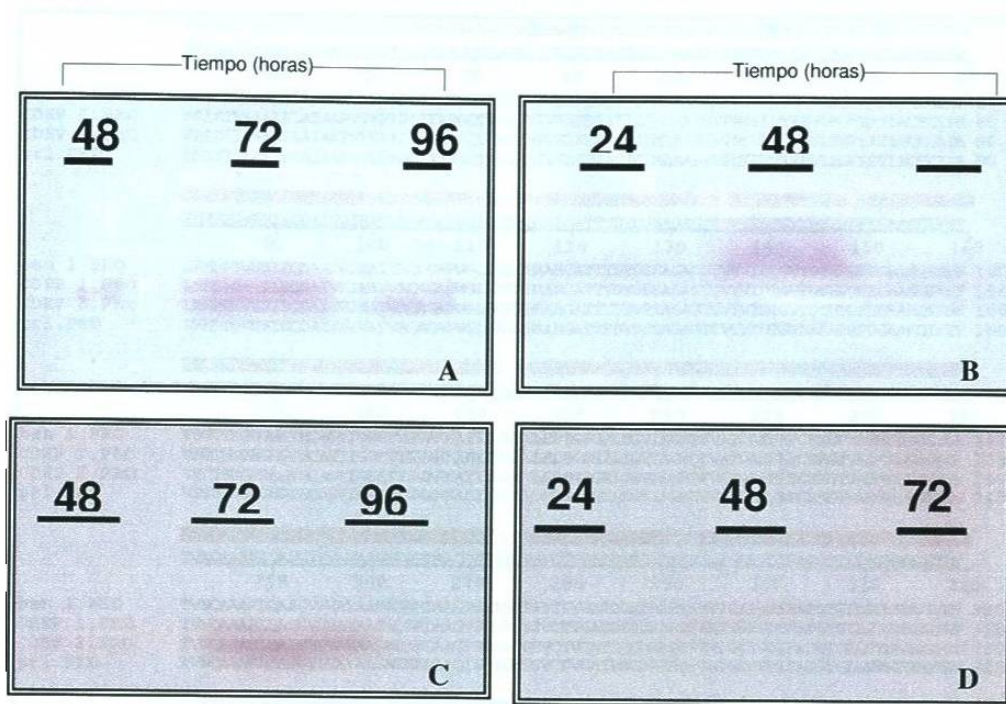
**Figura 24.** Zimogramas de caseína. Cepa paterna (A) y mutante (B) en medio represor compuesto por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 g/l, Glucosa 10 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. (+) Mutante en medio inductor a las 72 h. (M) Marcador kD, SDS-7

Las cepas en el medio inductor si mostraron actividad (halo). La banda observada oscila entre los 29 y 36 kDa. La cepa paterna a las 48, 72 (máxima detección) y 96 h (Fig. 25 A), mientras que la mutante la presentó a las 24, 48 (máxima detección), y 72 h (Fig. 25 B).



**Figura 25.** Zimogramas de caseína. Cepa paterna (A) y mutante (B) en medio inductor compuesto por NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. (M) Marcador SDS-7

En el medio inductor se detectó actividad tipo quimi tripsina y elastasa en la cepa paterna, a las 48, 72 y 96 h (Figura 26 A y B); la cepa paterna también presentó los mismos tipos de actividad a las 24, 48 y 72 h (Figura 26 C y D).



**Figura 26.** Actividad enzimática en soporte. Actividad tipo quimiotripsina de cepa paterna (A) y mutante (B) en medio inductor compuesto por NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.3 g/l cada uno) y Gelatina al 1%. Actividad tipo elastasa de cepa paterna (A) y mutante (B) en medio inductor.

### 6.9 Identificación de las proteasas por PCR

La secuencia de aminoácidos de diversas proteasas degradadoras de cutícula producidas por *B. bassiana* fue comparada. Los resultados de esta comparación muestran que las tres proteasas comparadas son muy parecidas entre si (Figura 27), por lo que se decidió diseñar iniciadores en base a la secuencia más conocida, Pr1. Al ver la similitud de las proteínas, la identificación del tipo de proteasas presentes en las cepas paterna y mutantes, comenzó con el diseño de iniciadores, basados en la secuencia del gen de la proteasa Pr1, reportada por Joshi *et al.* (1995)



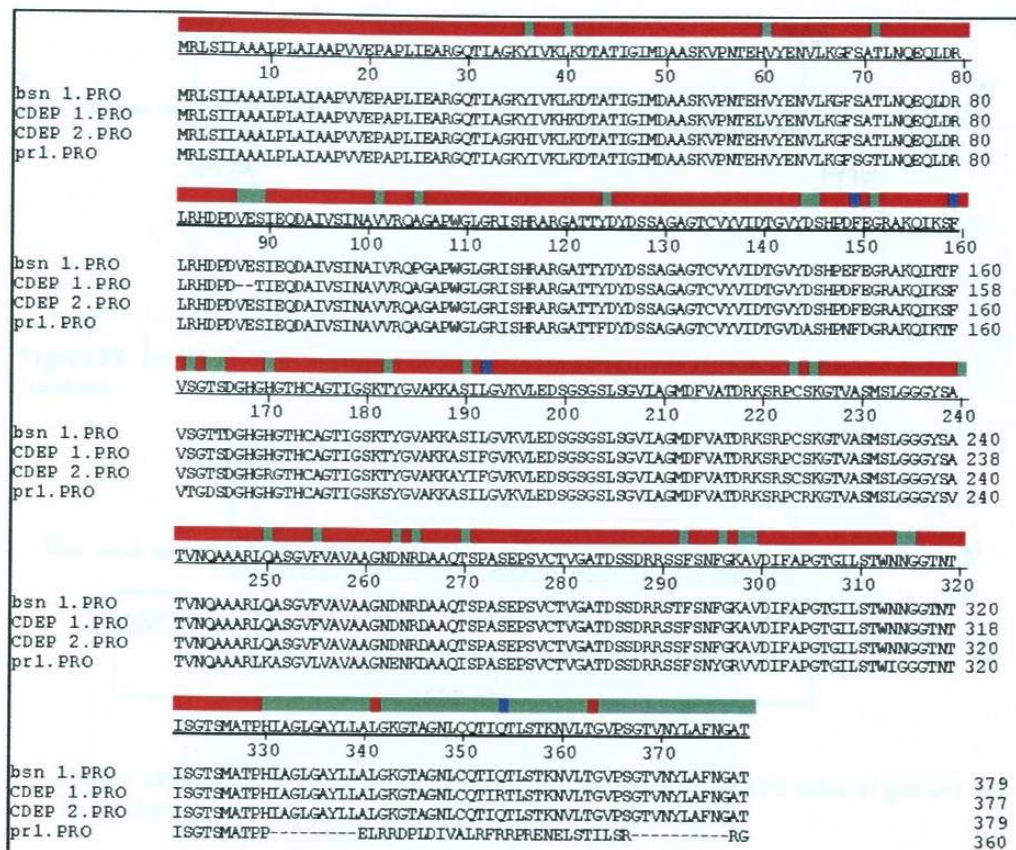
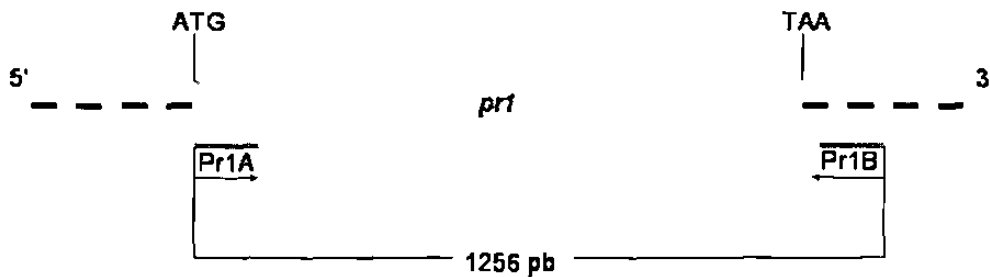
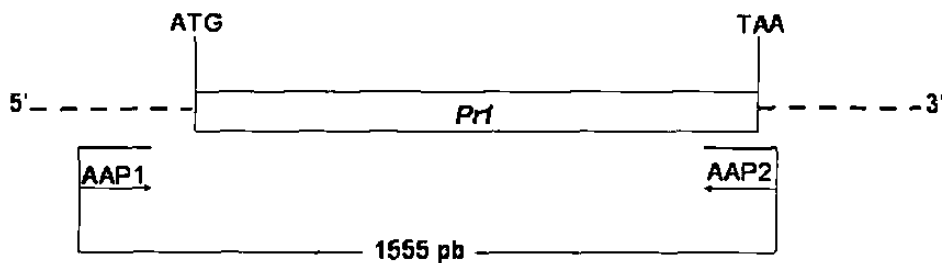


Figura 27 Comparación de la secuencia de aminoácidos por medio del programa LaserGene (DNAsar ver. 4.05) utilizando Clustal W, para cuatro proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, Pr1 (Joshi et al., 1995); Bsn1 (Kim et al., 1999); CDEP-1(Fang et al. 2001) y CDEP-2(Zeng et al, 2006).

En la Figura 28 se muestra la localización de los iniciadores en el gen, el iniciador Pr1 A se localiza desde el codón de inicio ATG hasta el nucleótido +26; el iniciador reverso Pr1 B se localiza en la posición +1230a+1257, esta región se encuentra después del codón de término. La utilización de estos iniciadores no amplificó el fragmento esperado de 1257 pb, por lo que fueron diseñaron unos nuevos iniciadores en diferente región. La Figura 29 muestra la localización de los nuevos iniciadores sobre el gen *pr1*. El iniciador AAP1 se localiza en la posición -60(-34), antes del codón de inicio y el iniciador reverso en la posición +1069-1091 y abarca 12 pares de bases después del codón de término.

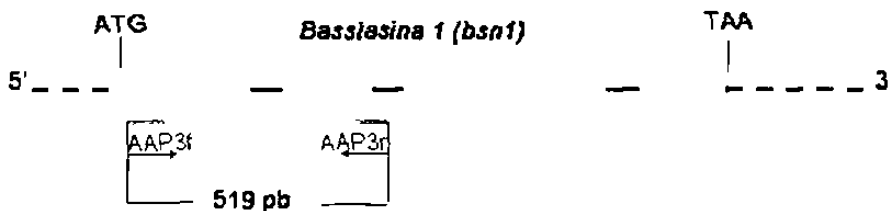


**Figura 28.** Localización esquemática de los iniciadores Pr1A y Pr1B sobre el gen *pr1* de *B. bassiana*.

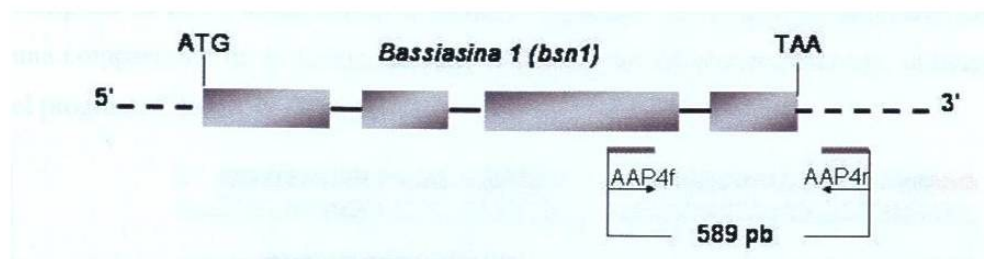


**Figura 29** Localización esquemática de los iniciadores AAP1 y AAP2 sobre el gen *pr1* de *B. bassiana*.

El fragmento esperado de 1151 pb, no amplificó con el uso de estos iniciadores, por lo que fueron diseñados nuevos iniciadores, tomando la secuencia de DNA reportada de otra proteasa producida por *B. bassiana* denominada Bassiasina I (Kim *et al.*, 1999). Los dos pares de iniciadores diseñados; AAP3 y los AAP4 en dos regiones diferentes del DNA, el iniciador AAP3f, localizado en la posición +6-+30 después del codón de inicio y el primer reverso AAP3r en la posición +505-+524 (Figura 30); el iniciador AAP4f localizado en la posición +990-1012 y el iniciador reverso AAP4r en +1369-+1391, después del codón de término (Figura 31).

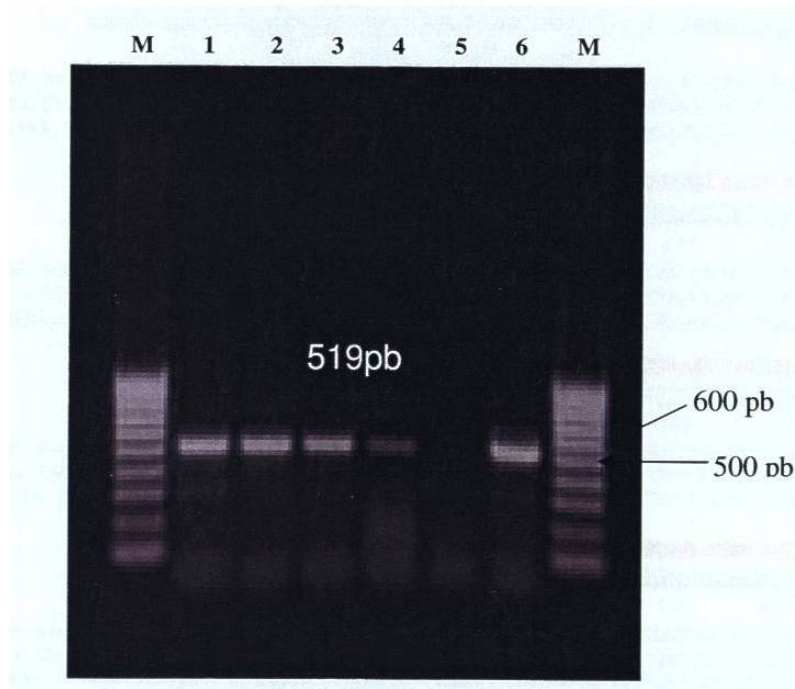


**Figura 30** Localización esquemática de los iniciadores AAP3f y AAP3r sobre el gen *bsn1* de *B. bassiana*



**Figura 31** Localización esquemática de los iniciadores AAP4f y AAP4r sobre el gen *bsn1* de *B. bassiana*.

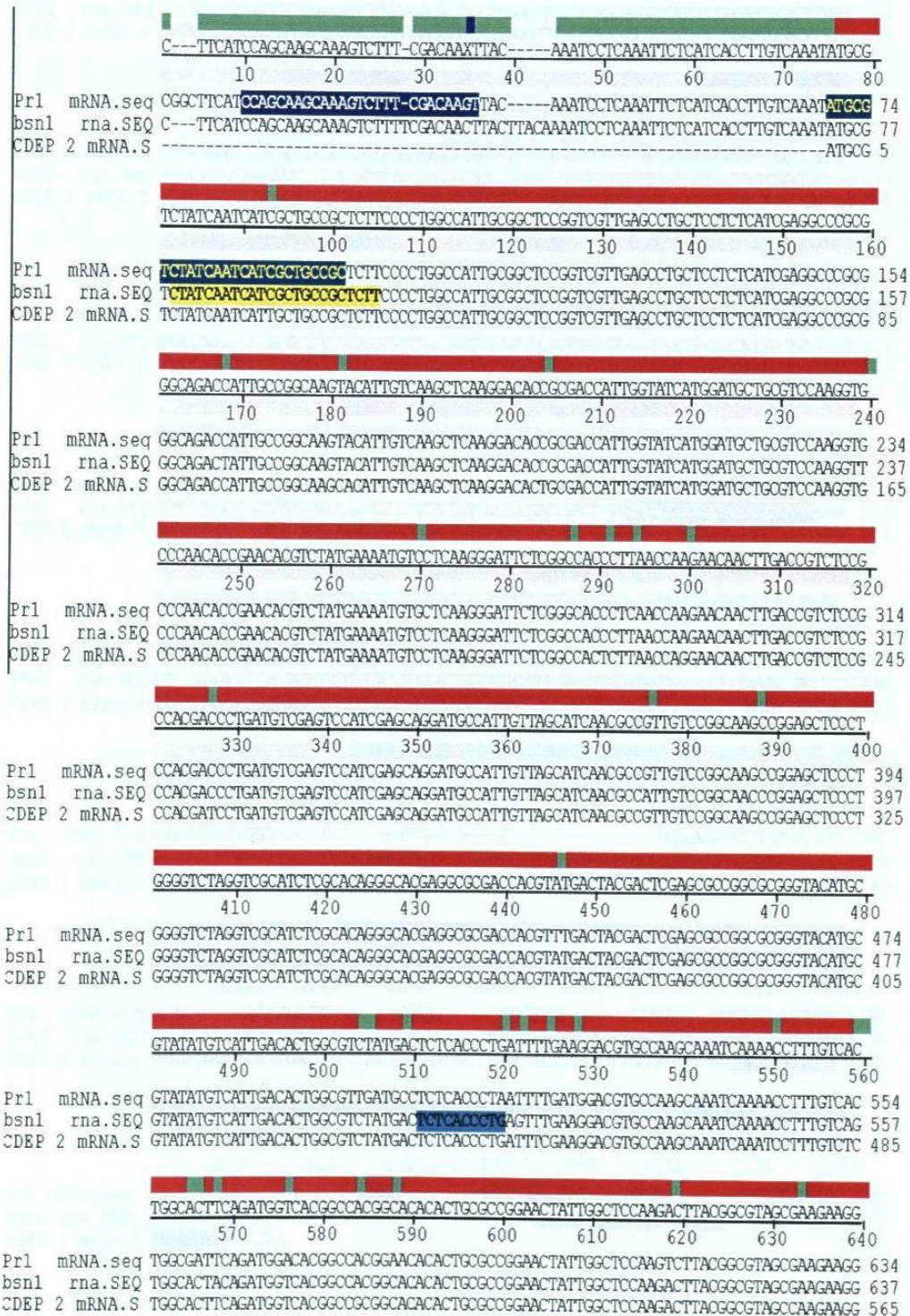
Un fragmento esperado de 519 pb, fue visualizado en gel de agarosa al 1.0% con Buffer TAE (Fig. 32) con los iniciadores AAP3f y AAP3r.

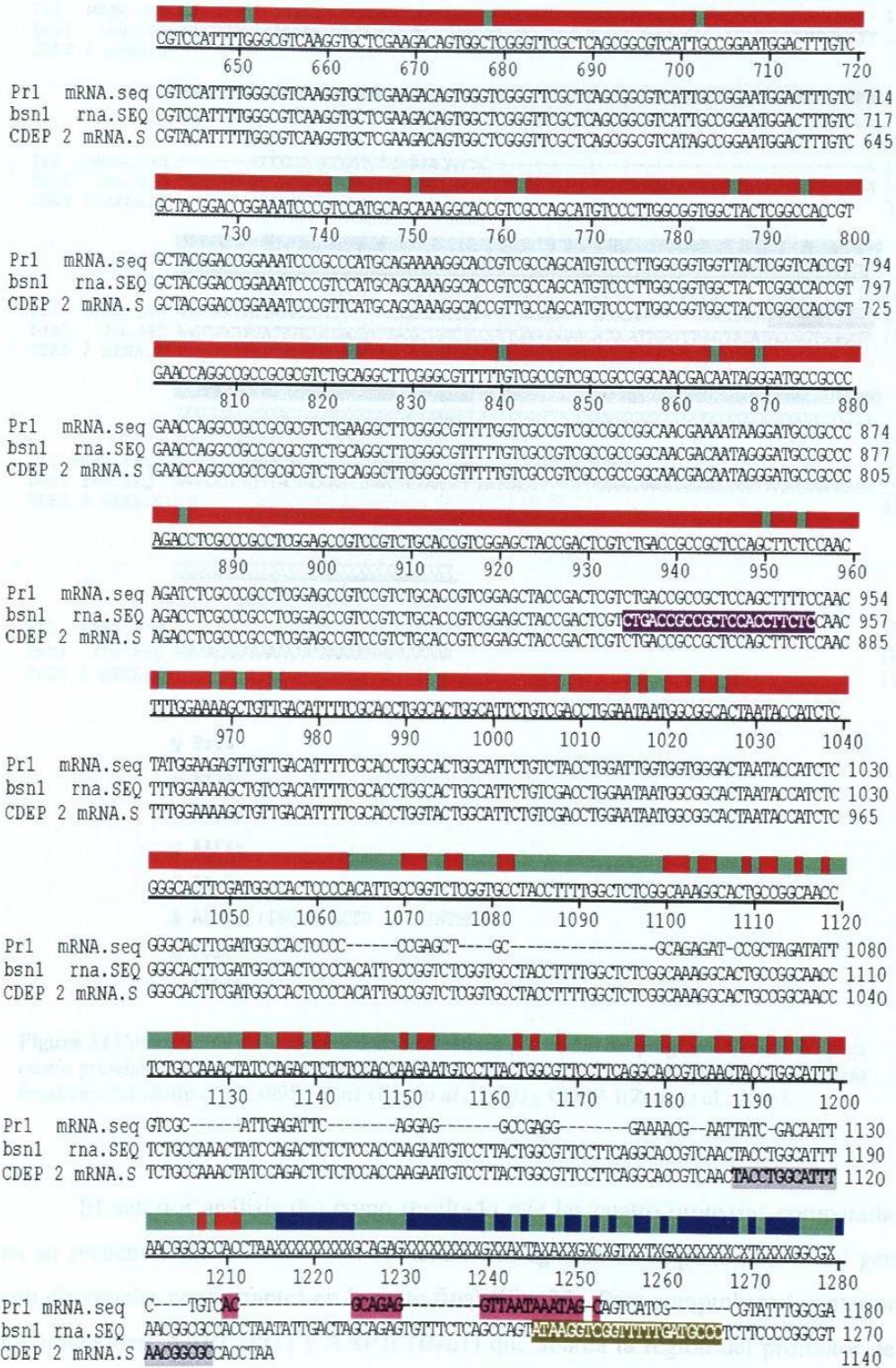


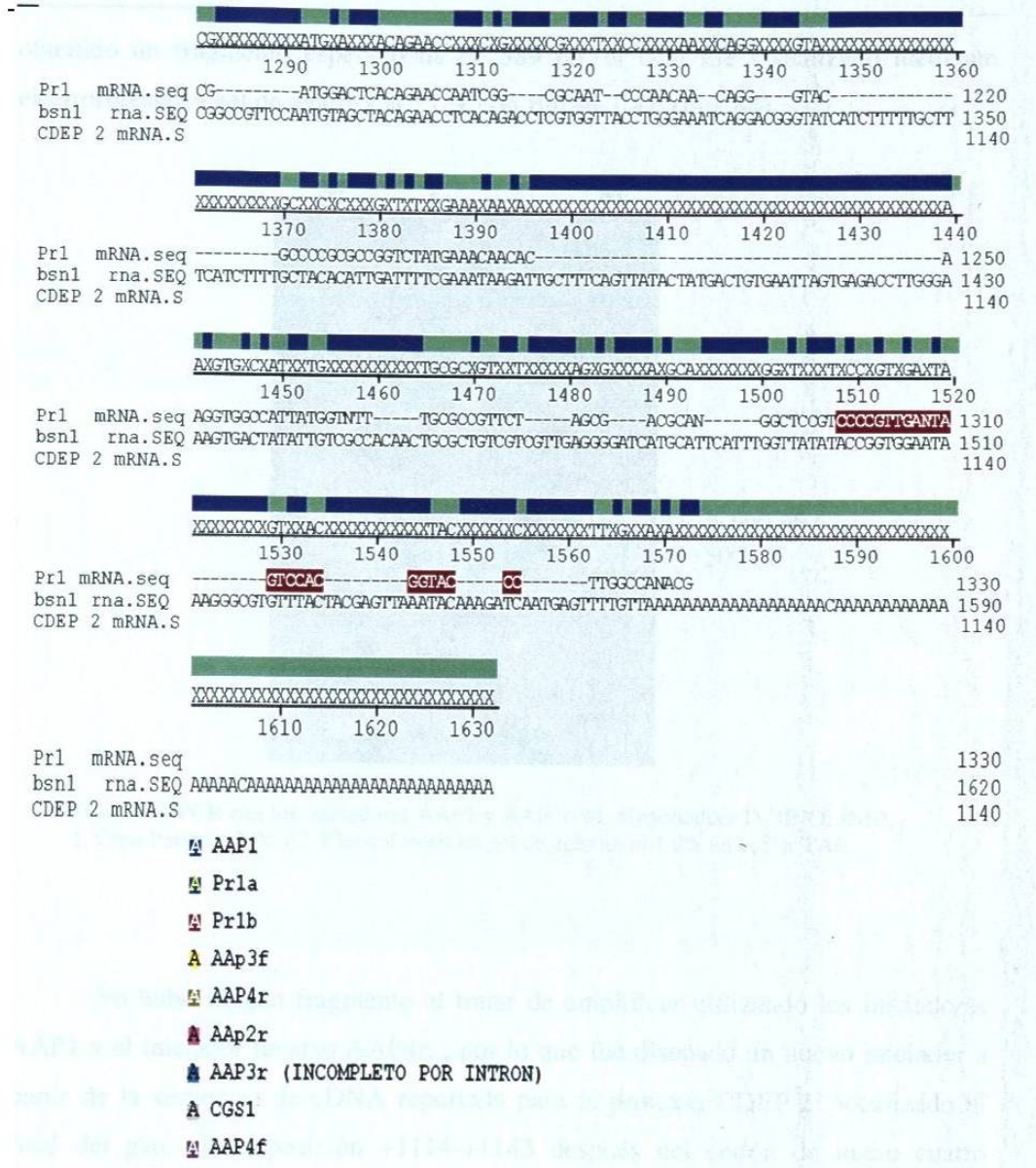
**Figura 32.** PCR con los iniciadores AAP3f y AAP3r. M, Hyperladder IV (BIOLINE); 1, Cepa paterna; 2, M-82; 7-3, M-25; 4, M-36; 5, M-36; 6, M-82. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE.

Los iniciadores AAP4f y AAP4r no amplificaron el fragmento esperado de 401 pb. Hasta aquí, ningún par de iniciadores diseñados a partir de la secuencia de mRNA de Pr1 amplificó el producto esperado, solo un par de iniciadores identificados como AAP3f y AAP3r y diseñados a partir de la secuencia del gen

completo de Bsn1, amplificaron el producto esperado por lo que fue necesario hacer una comparación de la secuencia nucleotídica de las diferentes proteasas, utilizando el programa Clustal W (Fig. 33).



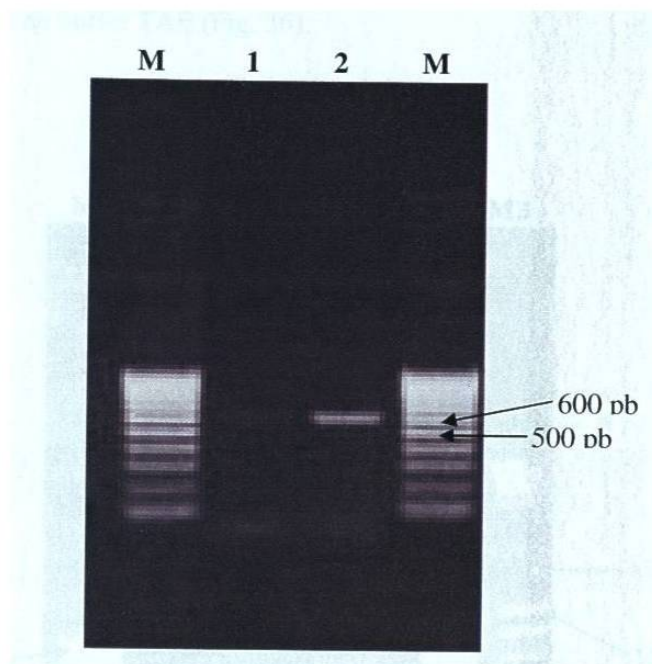




**Figura 33** Comparación de la secuencia de nucleótidos por medio del programa Clustal W; para cuatro proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, Pr1 (Joshi *et al.*, 1995); Bsn1 (Kim *et al.*, 1999) y CDEP-1 (Zeng *et al.*, 2006).

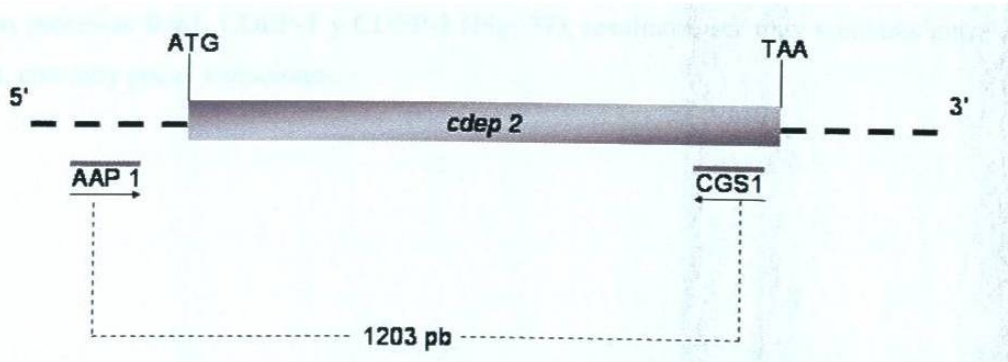
El anterior análisis dio como resultado que las cuatro proteasas comparadas en su secuencia nucleotídica, son esencialmente iguales en la parte inicial del gen, con diferencias contrastantes en la parte final (Fig. 33). Para comprobarlo anterior, los iniciadores AAP1 (Pr1) y AAP3r (Bsn1) que abarca la región del promotor del gen se emplearon para realizar una amplificación; con las cepas Paterna y M-82 fue

obtenido un fragmento esperado de de 589 pb, el cual fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% con Buffer TAE (Fig. 34).



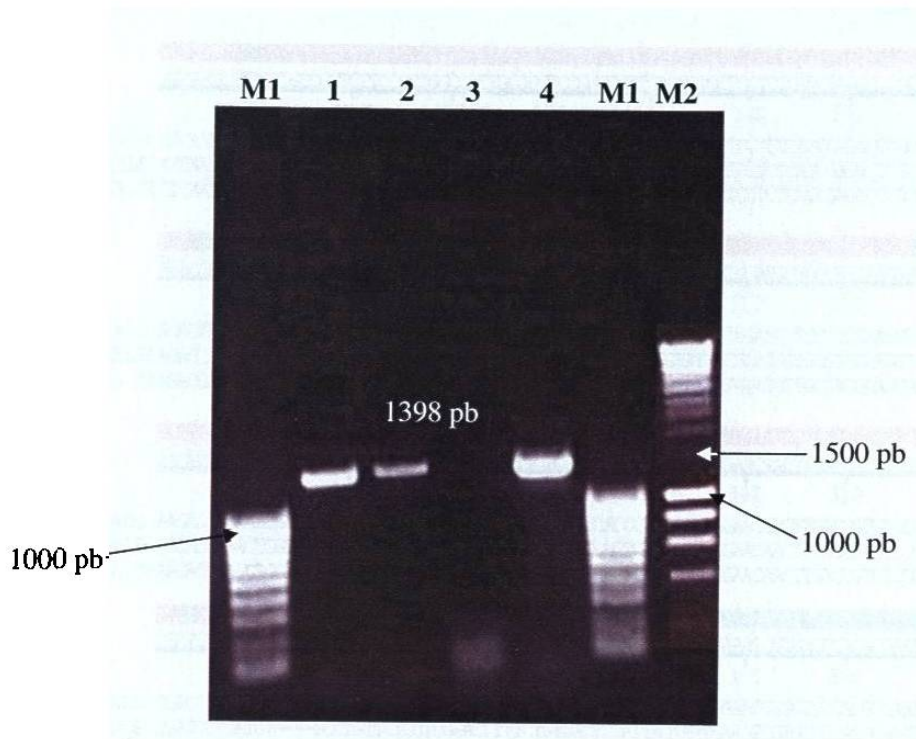
**Figura 34** PCR con los iniciadores AAP1 y AAP3r. M, Hyperladder IV (BIOLINE); 1, Cepa Paterna; 2, M-82. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE.

No hubo ningún fragmento al tratar de amplificar utilizando los iniciadores AAP1 y el iniciador reverso AAP4r, , por lo que fue diseñado un nuevo iniciador a partir de la secuencia de cDNA reportada para la proteasa CDEP-2 localizado al final del gen, en la posición +1114+1143 después del codón de inicio cuatro nucleótidos antes del codón de término (Fig. 35).



**Figura 35:** Localización esquemática del iniciador CGS 1 sobre el gen *cdep-2* de *B. bassiana*.

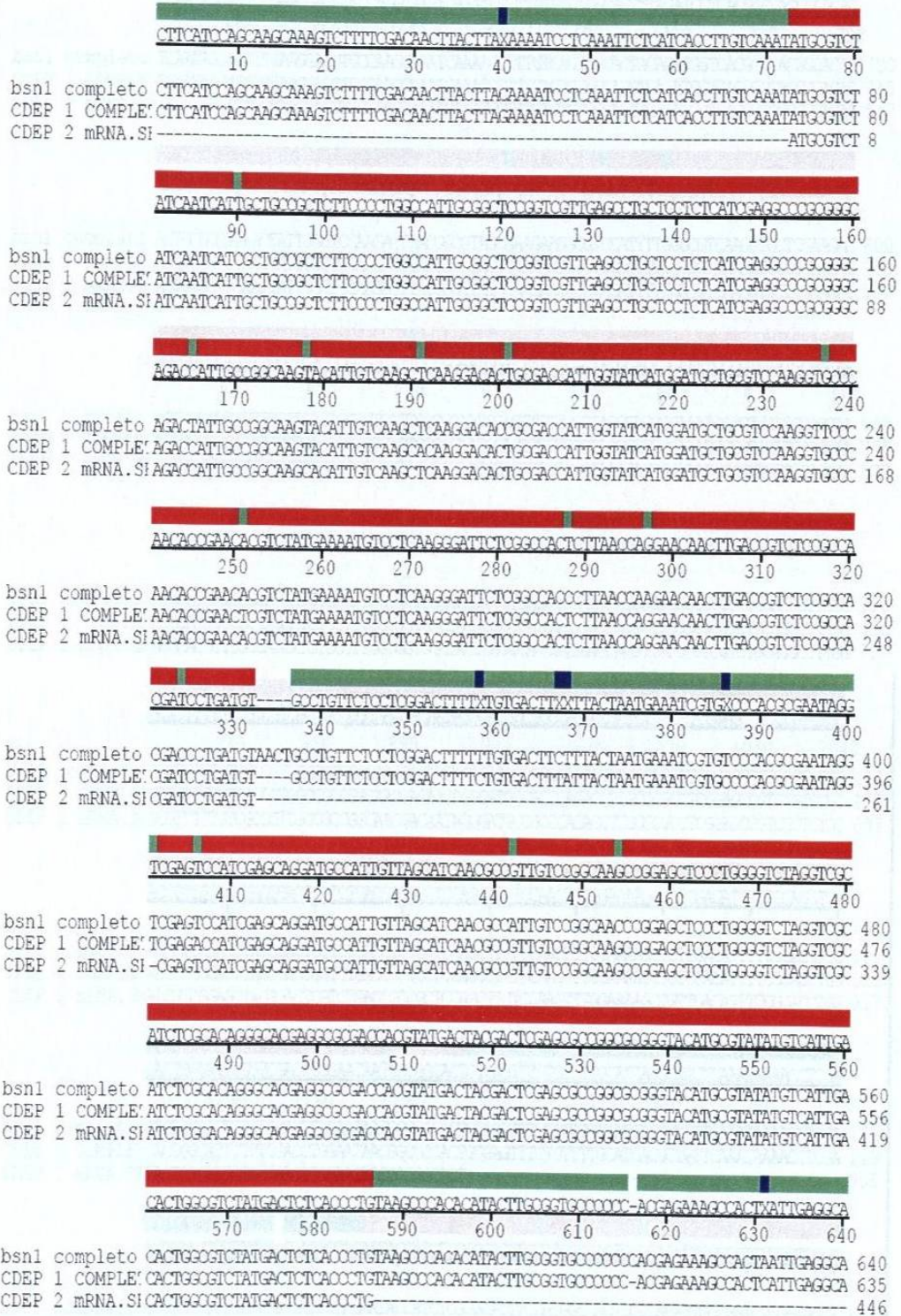
La amplificación con los iniciadores AAP1 y CGS1, fue obtenido un fragmento esperado de 1398 pb y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE (Fig. 36).

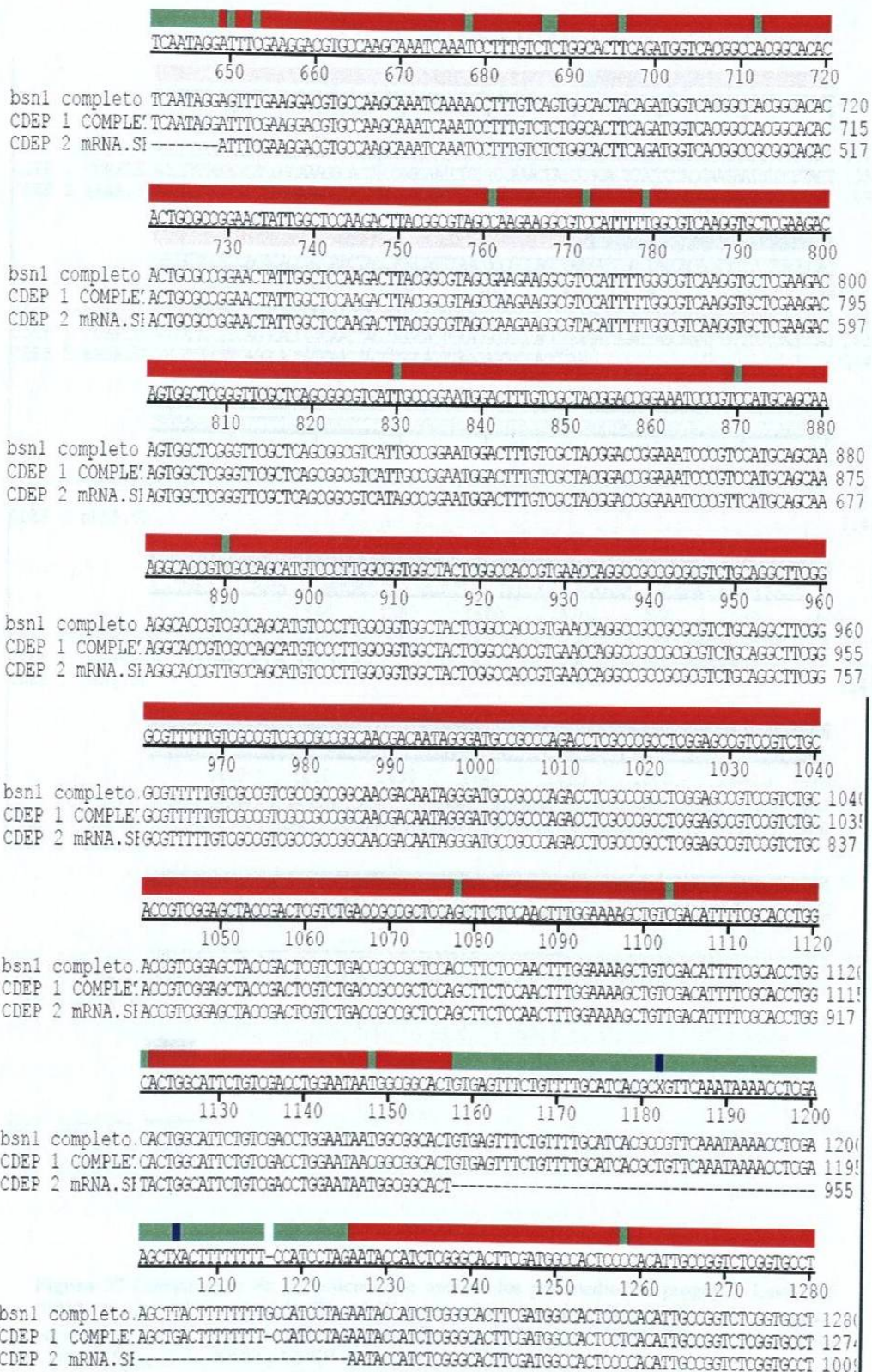


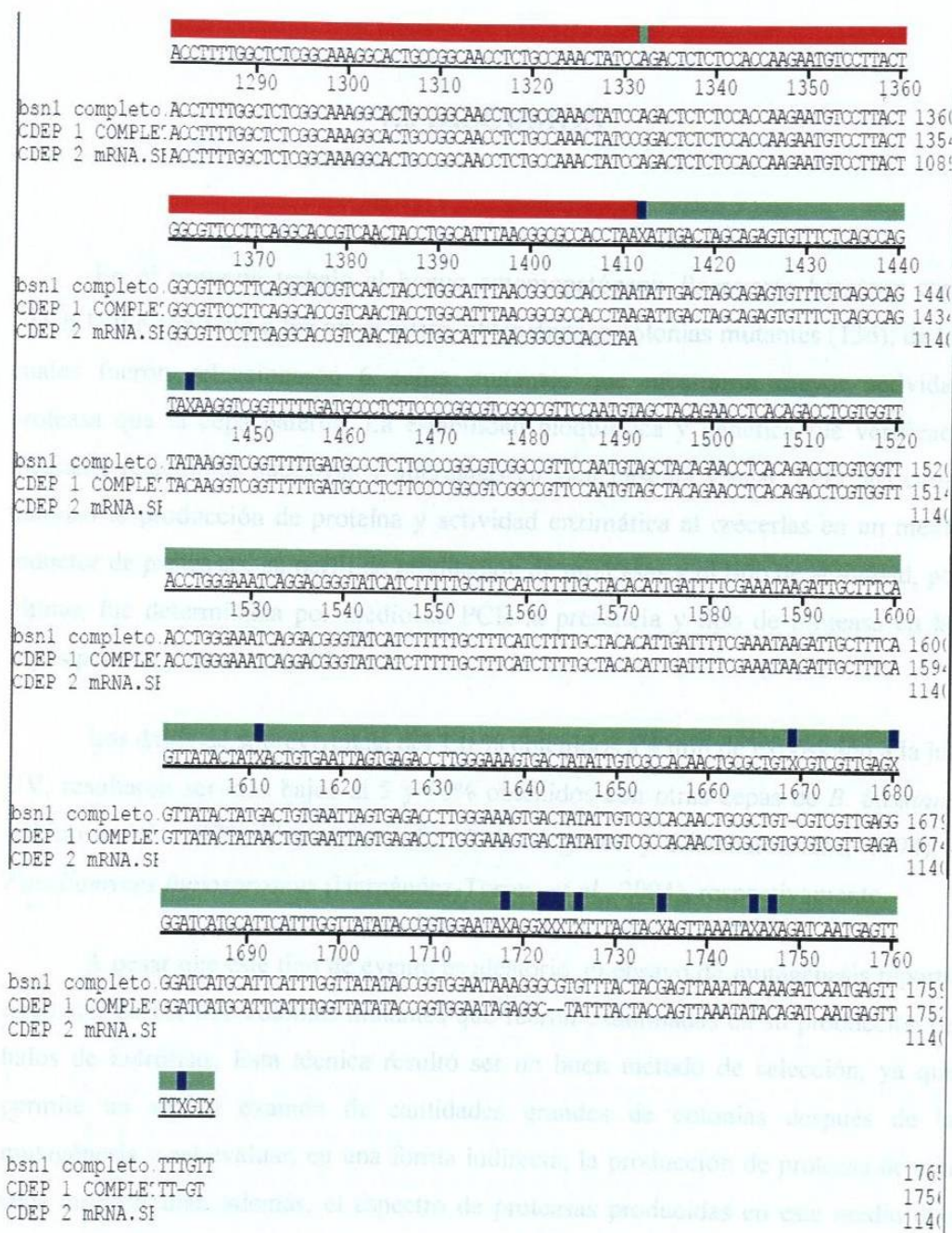
**Figura 36** PCR con los iniciadores AAP1 y CGS1. M1.- Hyperladder IV (BIOLINE), M2.- Hyperladder I (BIOLINE). 1.-Cepa Paterna, 2.- Mutante 7., 3.- Mutante 36, 4.- Mutante 82. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE

Por último al realizar una comparación entre las secuencias nucleotídicas de las proteínas Bsn1, CDEP-1 y CDEP-2 (Fig. 37), resultaron ser muy similares entre si, con muy pocas variaciones.









**Figura 37** Comparación de la secuencia de nucleótidos por medio del programa LaseGene (DNAsar ver. 4.05) utilizando Clustal W; para cuatro proteínas degradadoras de proteasas, producidas por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, Bsn1 (Kim *et al.*, 1999); CDEP-1(Fang *et al.*, 2001) y CDEP-2(Zeng *et al.*, 2006).