

# BÚSQUEDA DE PROMOTORES INDUCIBLES MEDIANTE FUENTE DE CARBONO EN *METARHIZIUM ROBERTSII*

Durán Gómez Rafael (1), Hernández Cervantes Pablo Luis (2), Torres Guzmán Juan Carlos (2), Padilla Guerrero Israel Enrique (2)

1[Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [r.durangomez@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [ie.padillaguerrero@ugto.mx]

## Resumen

Los hongos del género *Metarhizium* son organismos versátiles los cuales han sido utilizados desde hace más de 100 años como un modelo de estudio por sus aplicaciones biotecnológicas. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de 6 promotores en el hongo *Metarhizium robertsii* para ser regulados, mediante las fuentes de carbono glucosa ó xilosa. Los resultados por RT-PCR muestran la regulación génica de los promotores seleccionados, encontrando uno con expresión diferencial por la fuente de carbono.

## Abstract

The fungi of the genus *Metarhizium* are versatile organisms that have been used for more than 100 years as a study model for biotechnological applications. In the present work, we evaluated the capacity of 6 promoters in the fungus *Metarhizium robertsii* to be regulated by the carbon sources glucose or xylose. The results by RT-PCR show the gene regulation of the selected promoters, finding one with differential expression by carbon source.

## Palabras clave

*Metarhizium robertsii*; Promotores; Glucosa; Xilosa.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Metarhizium* son un modelo de estudio versátil sobre la base de sus aplicaciones biotecnológicas que ha sido implementado desde hace más de 100 años [1]. Estos organismos están distribuidos a nivel mundial, y colonizan una amplia gama de ambientes, incluyendo bosques, sabanas, pantanos, zonas costeras y desiertos [1].

Hu en el 2014, propone que la trayectoria evolutiva de *Metarhizium* fue de especies especialistas a través de especies intermedias a generalistas, y cuyas especies han sido ampliamente estudiadas debido a su estrecha relación con el hospedero, ya que son amigables con el medio ambiente y a la facilidad de su producción en masa [2,3, 4,5,6].

Además del impacto ecológico de los miembros del género *Metarhizium* y su potencial como control biológico, recientemente se ha reportado que pueden interactuar con las plantas colonizando sus raíces de manera micorrízica y endofita, estableciendo una relación simbiótica con éstas, lo que estimula su crecimiento radicular [7], activa su sistema de defensa y aumenta su resistencia a factores abióticos, como la salinidad [8], además de que también transfieren nutrientes, como el nitrógeno que obtiene de los insectos que parasita trasladándolo a las plantas [9]. A su vez, las plantas transfieren compuestos carbonados a los hongos del género *Metarhizium*, lo que indica que tienen una relación mutualista simbiótica [10].

La mayoría de los hongos filamentosos, ya sean saprofitos, patógenos o mutualistas, utilizan polisacáridos derivados de plantas como fuente principal de energía [11]. Este estilo de vida requiere la capacidad de la expresión de genes finamente regulados, de modo que sólo un grupo limitado de genes es activado, incluso en presencia de polisacáridos múltiples. Esta regulación finamente ajustada se logra mediante la inducción y la represión por activadores transcripcionales y represores [11].

Descubrir los mecanismos moleculares subyacentes a la jerarquía de señalización a la utilización de fuentes de carbono es fundamental para las estrategias de biotecnología de hongos filamentosos [11]. Esta comprensión también

proporciona nuevas ideas en el uso de los hongos a nivel industrial [11].

Con la finalidad de evaluar en *M. robertsii* la capacidad de distintos promotores seleccionados, en el presente trabajo se hizo una extracción de RNA del hongo crecido en diferentes fuentes de carbono, se sintetizó el cDNA correspondiente y se determinó la expresión de los genes correspondientes mediante un análisis por RT-PCR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepa y condiciones de crecimiento.** Se inocularon 450  $\mu$ L de la cepa CARO4 de *M. robertsii* a partir de un stock con una concentración de  $2.2 \times 10^8$  conidias/mL en 100 mL de medio Dextrosa Sabouraud durante 36 h a 28 C en constante agitación (150 rpm). Posteriormente, se filtró el micelio y la biomasa resultante se dividió en 4 partes iguales, inoculando con cada una de ellas 50 mL de medio M-100 suplementado con dextrosa o xilosa al 2%, incubando las muestras durante 48 h ó 96 h a 28 C y en constante agitación (150 rpm).

**Extracción de RNA.** Se llevó a cabo un rompimiento mecánico del micelio crecido en cada una de las condiciones anteriores utilizando nitrógeno líquido, y después se utilizó la técnica de extracción de RNA con Trizol [Sigma-Aldrich].

**Estabilidad del RNA.** Se probó la estabilidad del RNA aislado incubando 3  $\mu$ L de cada una de las muestras a -70 °C y 37 C durante 2 horas, y después se corrieron las muestras en una cámara de electroforesis exclusiva para RNA utilizando el mismo volumen de frente para RNA en un gel de agarosa al 1% preparado con Syber-SAFE [Invitrogen™], una vez comprobada la estabilidad del RNA, este se trató con Dnasa para eliminar cualquier contaminación por DNA, se realizó un PCR para descartar la presencia de DNA en las muestras.

**Síntesis de cDNA y RT-PCR.** Posteriormente se sintetizó el cDNA a partir del RNA extraído utilizando el kit de RT-PCR Thermo Script™ [Invitrogen™]. A partir de éste se realizaron los PCRs empleando las condiciones establecidas por JumpStart™ Taq ReadyMix™ [Sigma-Aldrich], utilizando las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 95 C durante 1min, 32 ciclos

de 95 C por 20 seg, 60 C por 1min y 72°C por 1 min y finalmente 1 ciclo a 72 C durante 5 min. Como último paso se realizó una electroforesis convencional en gel de agarosa al 2%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

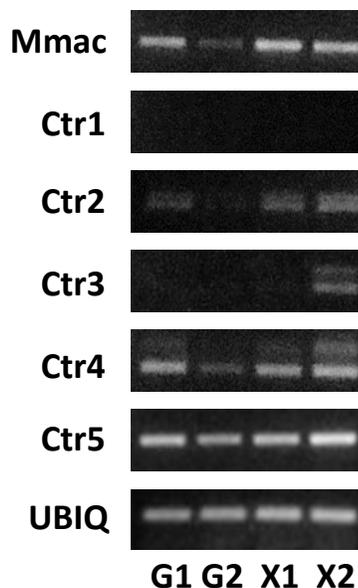
Nombre del gen	Abreviatura	Función de la proteína
Ubiquitina	UBIQ	Dirigir el reciclaje de proteínas
Factor de transcripción inducido por cobre	Mmac	Regular genes inducidos por cobre
Transportador de cobre 1	Ctr1	Transporte de cobre dentro de la célula
Transportador de cobre 2	Ctr2	
Transportador de cobre 3	Ctr3	
Transportador de cobre 4	Ctr4	
Transportador de cobre 5	Ctr5	

**Tabla 1. Genes de *Metarhizium robertsii* seleccionados para su análisis.**

Se llevó a cabo el estudio de 6 promotores (Tabla 1) en la cepa CARO4 de *Metarhizium robertsii*, analizando su expresión génica mediante RT-PCR creciendo al hongo en 4 distintas condiciones, utilizando como control de expresión constitutiva el gen UBIQ el cual codifica para una ubiquitina.

Haciendo un análisis de la expresión génica resultante (**Figura 1**), no se observó la expresión del gen Ctr1 en ninguna de las cuatro condiciones, los genes Mmac, Ctr2, Ctr4 y Ctr5 mostraron expresión en las cuatro condiciones utilizadas, siendo el gen Ctr3 el único que presento una expresión diferencial en las fuentes de carbono utilizadas, teniendo inducción a las 96 h en xilosa. Por lo que estos resultados dan evidencia que el gen Ctr3 es un gen de expresión diferencial al

utilizar las fuentes de carbono de glucosa o xilosa y su promotor podría ser un candidato para utilizar en biotecnología o biología sintética en el hongo *M. robertsii*.



**Figura 1. Expresión de los genes mediante RT-PCR. G1, Glucosa 48 h; G2, Glucosa 96 h; x1, Xilosa 8 h; X2, xilosa 96 h.**

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se llevó a cabo la identificación del promotor inducible por xilosa del gen Ctr3 en la cepa CARO4 de *Metarhizium robertsii*.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al programa de Veranos de la Investigación Científica de la Universidad de Guanajuato por la beca a la estudiante D. G. R., como al soporte financiero de la Universidad de Guanajuato (CIFOREA 89/2016) para la realización de este proyecto.

## REFERENCIAS

- [1] Padilla-Guerrero, Israel Enrique., Bidochka, Michael J. (2017). Agrobacterium-Mediated Co-transformation of Multiple Genes in *Metarhizium robertsii*. *Mycobiology*, 45, 84-85.
- [2] Greenfield, B.P.; Peace, A.; Evans, H.; Dudley, E.; Ansari, M.A.; Butt, T.M. (2015) Identification of *Metarhizium* strains highly efficacious against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae. *Biocontrol Sci. Technol.*, 25, 487–502.
- [3] Fang, W.; Lu, H.-L.; King, G.F.; Leger, R.J.S. (2014) Construction of a hypervirulent and specific mycoinsecticide for locust control. *Sci. Rep.* 4.
- [4] Kamalakannan, S.; Murugan, K. (2011) Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* for the control of Dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta: Diptera: Culicidae). *Toxicol. Environ. Chem.* 93, 1195–1201.
- [5] Ment, D.; Churchill, A.C.L.; Gindin, G.; Belausov, E.; Glazer, I.; Rehner, S.A.; Rot, A.; Donzelli, B.G.G.; Samish, M. (2012) Resistant ticks inhibit *Metarhizium* infection prior to haemocoel invasion by reducing fungal viability on the cuticle surface. *Environ. Microbiol.* 14, 1570–1583.
- [6] Vázquez-Martínez, M.G.; Rodríguez-Meneses, A.; Rodríguez, A.D.; Rodríguez, M.H. (2013) Lethal effects of *Gliocladium virens*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the malaria vector *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 23, 1098–1109.
- [7] Sasan RK, Bidochka MJ. (2012) The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Am J Bot*, 99, 101-7.
- [8] Khan AL, Hamayun M, Khan SA, Kang SM, Shinwari ZK, Kamran M, Ur Rehman S, Kim JG, Lee IJ. (2012) Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World J Microbiol Biotechnol.* 28-1483-94.
- [9] Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ. (2012) Endophytic insectparasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science.* 336, 1576-7.
- [10] Behie SW, Moreira CC, Sementchoukova I, Barelli L, Zelisko PM, Bidochka MJ. (2017) Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nat Commun.* 8, 14245.
- [11] Kunitake, E.; Kobayashi, T. Conservation and diversity of the regulators of cellulolytic enzyme genes in Ascomycete fungi. (2017). Springer. Review.