

ANÁLISIS DE GENES DEL HONGO *METARHIZIUM* IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN CON PLANTAS DE *SORGHUM VULGARE*

Cervantes Velázquez Lizbeth Karina (1), Dávila Berumen Fabiola (2), González Hernández Gloria Angélica (2), Padilla Guerrero Israel Enrique (2)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [liz.kari.93.lcv@gmail.com]

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

Resumen

Metarhizium es un patógeno de insectos ubicuo, simbionte de plantas, endofítico y micorriza competente. En este trabajo evaluamos 10 genes de *Metarhizium* en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno que se pueden encontrar en los exudados de las raíces de las plantas. Los resultados por RT-PCR muestran la regulación de los genes seleccionados, algunos están regulados por carbohidratos específicos o fuente de nitrógeno.

Abstract

Metarhizium is one ubiquitous insect pathogens and plant symbionts, endophytic and mycorrhiza competent. We evaluated 10 genes of *Metarhizium* in diferents carbon and nitrogen sources that can be find in plant root exudates. RT-PCR showed the regulation of the genes selected, some are regulated for specific carbohydrates or nitrogen source.

Palabras Clave

Metarhizium; Planta; Simbiosis.

INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un grupo diverso de organismos eucariotas, pueden vivir como saprofitos o como parásitos de plantas o animales. Estos se clasifican en cinco subdivisiones muy importantes y éstas reflejan la evolución de su biología. Por ejemplo, especies del género *Coelomomyces* y *Lagenidium* (subdivisión Mastigomcotina) son acuáticos y producen zoosporas móviles, mientras que los miembros del género *Metarhizium* y *Beauveria* (subdivisión Deuteromycotina) son terrestres diseminándose por la formación de conidios [1].

Metarhizium

Metarhizium es un género de hongos ascomicetos (Hypocreales: Clavicipitaceae) clasificado como entomopatógeno-micorrízico y esto se debe a que existe una simbiosis mutualista del hongo con las plantas la cual estimula el crecimiento de las raíces y translocación de nutrientes para ambos organismos [2].

Asociación de *Metarhizium* con *Sorghum*

Esta reportado que el género *Metarhizium*, tiene la capacidad de asociarse endofíticamente y traslocar nitrógeno a las plantas proveniente de insectos, tanto en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas [3].

En nuestro grupo de trabajo, Herrera Gutiérrez (2016) realizó interacciones con varios aislados del hongo *Metarhizium* y la planta *Sorghum vulgare*, concluyendo que la asociación realizada resulta beneficiosa. Observando en plántulas de sorgo hasta un 92.2% más de crecimiento y 300% más de germinación en una interacción de 10 días en condiciones *in vitro*, así como un 341% más de crecimiento y 525% más de germinación en condiciones semicontroladas de invernadero, siendo la cepa CARO19 la tuvo un mayor efecto en las plantas de sorgo.

En este trabajo con la finalidad de conocer más sobre la asociación de la planta *S. vulgare* y la cepa CARO19 de *Metarhizium*, se decidió analizar el nivel de expresión de genes del hongo *Metarhizium* con diferentes nutrientes los cuales están presentes en los exudados de las plantas, los genes a analizar están implicados en diferentes procesos como la transferencia de aminoácidos, adhesión, defensa y síntesis de aminoácidos (tabla 1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante un análisis bioinformático utilizando el sitio de National Center for Biotechnology Information se determinaron los genes que serían estudiados para la cepa CARO19, a partir de dicho estudio se diseñaron los oligonucleótidos necesarios.

Se extrajo RNA por el método de TRIzol a partir de un cultivo de la cepa CARO 19 (1×10^6 conidios/ml) en medio M-100 líquido suplementado individualmente con los azúcares glucosa, celobiosa y xilosa al 1%; y utilizando como fuente de nitrógeno urea ó KNO_3 al 0.1%. Dichos cultivos fueron crecidos durante 72 horas a 28°C y 150 rpm.

Posteriormente se sintetizó el cDNA a partir del RNA extraído utilizando el kit de RT-PCR Thermo Script™ [4]. A partir de éste se realizaron los PCRs empleando las condiciones establecidas por JumpStart™ Taq ReadyMix™ [5], utilizando las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 95°C durante 1min, 25 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 5min. Como último paso se realizó una electroforesis convencional en gel de agarosa al 2%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó exitosamente la extracción de RNA de *Metarhizium* cepa CARO 19 (Figura 1), de los seis medios de cultivo sintético utilizados.

Nombre del gen	Abreviación	Función
Glucósido hidrolasa	CEL 5B	Degradación de carbohidratos como celulosa o xilan.
Glucósido hidrolasa	CHITCBM-1	Inhibidor de xilanasas
Permeasa de aminoácidos	inda1	Facilita el transporte de aminoácidos
Permeasa de aminoácidos	Dip5	Facilita el transporte de aminoácidos
Adhesinas	MAD 1	Al adherirse al insecto
Adhesinas	MAD 2	Al adherirse a la planta
Proteasa	PR1A	Hidrólisis de proteínas
Uracilo-1	URA3 1	Síntesis de uracilo
Uracilo-2	URA3 2	Síntesis de uracilo
Uracilo-3	URA3 3	Síntesis de uracilo
Ubiquitina	UBIQ	Degradación de proteínas

Tabla 1. Genes seleccionados para estudiar en la interacción de *Metarhizium* con *S. vulgare*.

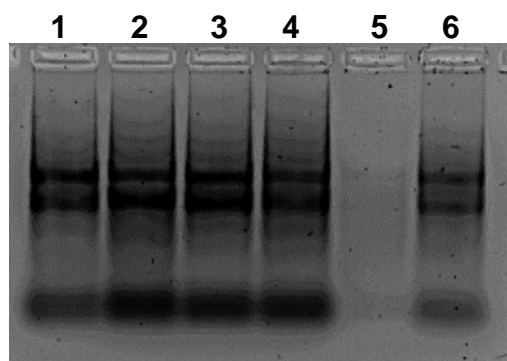


Figura 1. RNA de *Metarhizium* cepa CARO 19. Se muestra la extracción de RNA obtenido de diferentes condiciones de cultivo: 1) Glucosa, Urea; 2) Celobiosa, Urea; 3) Xilosa, Urea; 4) Glucosa, KNO₃; 5) Celobiosa, KNO₃; 6) Xilosa, KNO₃.

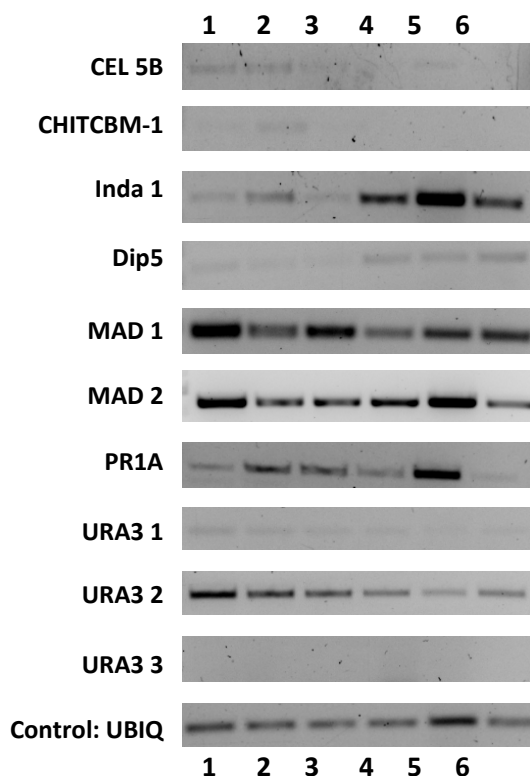


Figura 2. Expresión de los genes mediante RT-PCR. Los diferentes medios de cultivo son 1) Glucosa-Urea; 2) Celobiosa-Urea; 3) Xilosa-Urea; 4) Glucosa-KNO₃, 5) Celobiosa-KNO₃.

La asociación en la rizosfera por parte de *Metarhizium* es conocida y el conocimiento de los genes implicados para su adaptación y persistencia es importante para conocer la variabilidad de fenotipos observados con diferentes cepas y plantas (3). Los resultados de RT-PCR de los genes analizados en la Figura 2, muestran que entre los muchos factores que regulan la asociación de la cepa CARO19 con las plantas de sorgo podrían estar los compuestos secretados por la raíz de la planta, los cuales incluyen ácidos grasos, antibióticos, azúcares, aminoácido y diferentes fuentes de nitrógeno.

Además, en el presente la comparación de la expresión de genes entre cepas de *Metarhizium* rizosfera competentes y cepas no competentes complementaria los estudios sobre la fisiología de este hongo.

CONCLUSIONES

No se puede realizar una resolución concluyente de los niveles de expresión de los genes analizados, más experimentos y repeticiones son necesarias, pero es evidente en los resultados una regulación diferencial de los genes analizados por las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular de Hongos por brindarme todo el apoyo y calidez durante el desarrollo de este trabajo, especialmente a Ana Maya, Iván Piña, Josué Mora con quienes trabajé directamente. Familia y amigos por su incondicional apoyo y finalmente a la Universidad de Guanajuato, por el apoyo en la realización de éste trabajo.

REFERENCIAS

- 1.-Nicholls Estrada., (2008).El uso de enemigos naturales en Universidad de Antioquia (Ed.), Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. 5-9.
- 2.- Fang, W. y St Leger, R. (2010) Mrt, a Gene Unique to Fungi, Encodes an Oligosaccharide Transporter and Facilitates Rhizosphere Competency in *Metarhizium robertsii*. *Plant Physiology*. 154: 1549–1557
- 3.- Lovett and St. Leger. (2016) *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*, 1st edición. Academic Press.
- 4.https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ThermoScriptRT_PCR.pdf