

Identificación molecular de mutantes sitio dirigidos de hongos del género *Metarhizium*

Molecular identification of site-directed mutants of fungi of the genus *Metarhizium*

Arely Partida González¹, Eréndira Andrea Hurtado Félix², Aranzazú del Rocío Millán Blanco³, Fátima Montserrath Juárez Rivera⁴,
Mónica Melissa Espino Hernández⁵, Paulina Martínez Rodríguez⁶, Israel Enrique Padilla Guerrero⁷.

Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Noria Alta
S/N. Guanajuato, Guanajuato.

a.partidagonzalez@ugto.mx¹, ea.hurtadofelix@ugto.mx², adr.millanblanco@ugto.mx³, fm.juarezrivera@ugto.mx⁴,
mm.espinohernandez@ugto.mx⁵, p.martinezrodriguez@ugto.mx⁶, ie.padillaguerrero@ugto.mx⁷

Resumen

Los hongos como agentes entomopatógenos afectan una amplia gama de insectos plaga, un ejemplo de estos hongos es el género *Metarhizium* que presenta una amplia distribución a nivel global. *Metarhizium* presenta diferentes estilos de vida como saprofito, entomopatógeno y micorriza. Con la finalidad de conocer más sobre los procesos y mecanismos que utiliza *Metarhizium* en sus diferentes estilos de vida, se han desarrollado e implementado diversas técnicas moleculares, como la eliminación de genes en su genoma con la intención de analizar su función específica.

Palabras clave: *Metarhizium*, transformación, OSCAR.

Introducción

Varias especies de *Metarhizium* tienen estilos de vida multifuncionales y ocurren en diversos nichos ecológicos, como patógenos de insectos, simbioses de raíces de plantas y saprófitos del suelo (Gotti *et al.*, 2023). En particular, *Metarhizium* se ha estudiado y cultivado extensamente como un medio para reemplazar los insecticidas o para reducir la dosis de productos químicos utilizados para controlar los insectos plaga (Woong *et al.*, 2020).

Dentro del estudio de *Metarhizium* se encuentra la secuenciación genómica que permite dilucidar la base genética del estilo de vida como entomopatógeno, al mostrar que esta característica se ha desarrollado a través de la evolución (Wang *et al.*, 2020). Las especies de *Metarhizium* muestran variabilidad en su rango de huéspedes. Por ejemplo, *M. robertsii* y *M. anisopliae* son generalistas con amplios rangos de huéspedes, mientras que otros como *M. album* tienen rangos de huéspedes restringidos (Stone, LB y Bidochka, MJ., 2020).

En el análisis del genoma de *Metarhizium* las herramientas computacionales como la bioinformática, son fundamentales. La bioinformática gestiona y analiza datos biológicos, el estudio de las funciones, así como las relaciones de genes y proteínas (Franco, M., 2008). Con el análisis del genoma de diferentes especies de *Metarhizium* se ha podido determinar sus particularidades y características. Conocer esta información nos ayuda a entender mejor

los estilos de vida que presentan estos hongos y a su vez permite identificar genes de interés, los cuales pueden estudiarse mediante su eliminación, modificación o sobreexpresión utilizando técnicas moleculares, entre las cuales encontramos la transformación génica (Hu, *et al.*, 2014).

La transformación génica mediada por la bacteria *Agrobacterium* fue el primer sistema de transferencia de genes en originar una planta genéticamente modificada, esto ocurrió por primera vez en 1983 (Diaz, *et. al*, 2012). *Agrobacterium* se propuso como mediador para la introducción de genes de interés en plantas, esto debido a la capacidad y eficiencia de éste para infectar diversos organismos (Diaz, *et. al*, 2012) y su capacidad de favorecer la recombinación homóloga (Paz, *et. al.*, 2011), permitiendo que el material genético de diferentes organismos, con secuencias parcialmente similares puedan recombinarse.

En la actualidad y con la creciente disponibilidad de las secuencias genómicas fúngicas se conduce a la identificación de grandes conjuntos de genes, es por esto por lo que los científicos utilizan sistemas rápidos y altamente eficientes para la eliminación de genes (Paz, *et. al.*, 2011). La técnica OSCAR (One Step Construction of *Agrobacterium*-Recombination-ready-plasmids) fue desarrollada para crear en menos tiempo plásmidos para el sistema de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). El propósito de generar mutantes en el hongo *Metarhizium*, es conocer la función de genes específicos para poder dilucidar aplicaciones como mejora de procesos en la industria, biorremediación, etc.

Resultados

Se trabajó con cepas de las especies de *Metarhizium robertsi* y *Metarhizium guizhouense*, para generar mutantes sitio dirigidos en genes de interés.

1.-Análisis bioinformático.

Dentro de los genomas de *Metarhizium* se identificaron por medio de programas como ApE (A plasmid Editor) y BioEdit (Bioedit sequence alignment editor), los locus de los genes de interés, así como las regiones flanqueantes correspondientes a la región 5' y 3'. Los programas informáticos mencionados se usaron también para diseñar los oligonucleótidos necesarios para la técnica OSCAR.

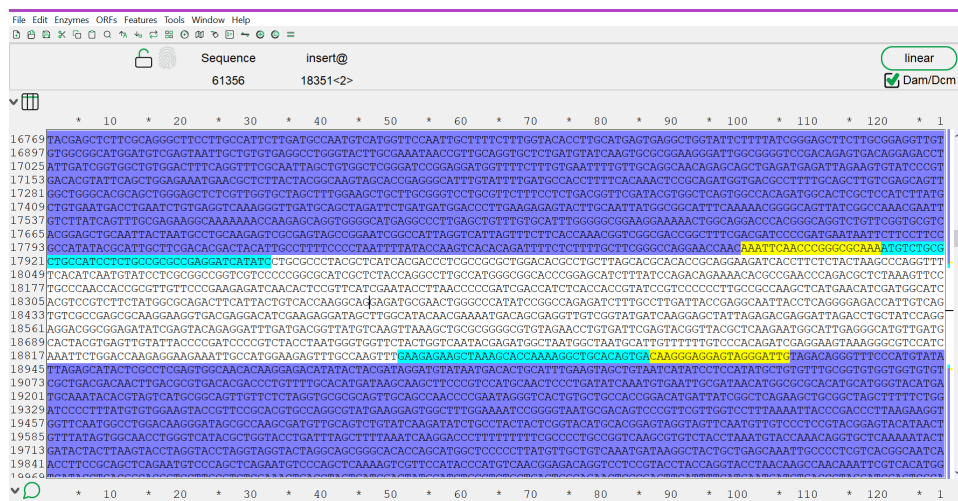


Figura 1. Ejemplo de los análisis bioinformáticos realizados en los genomas de *Metarhizium*. Se muestra la identificación de las secuencias 5' y 3' (morado) del gen de interés (azul cielo) y los oligonucleótidos diseñados (amarillo).

2.-Extracción de DNA de cepas de *Metarhizium*.

2.1.-Recolección y conteo de conidios.

De cultivos en cajas Petri de cepas de *Metarhizium*, se realizó la recolección de conidios. Se adicionó tritón al 0.01% ya que este ayuda a desprender más fácil los conidios. Posteriormente, se realizó de manera manual un suave raspado con la finalidad de desprender los conidios del medio, para centrifugar los conidios y colectarlos. Posteriormente se procedió a realizar diluciones seriadas para su conteo utilizando una cámara de Neubauer.

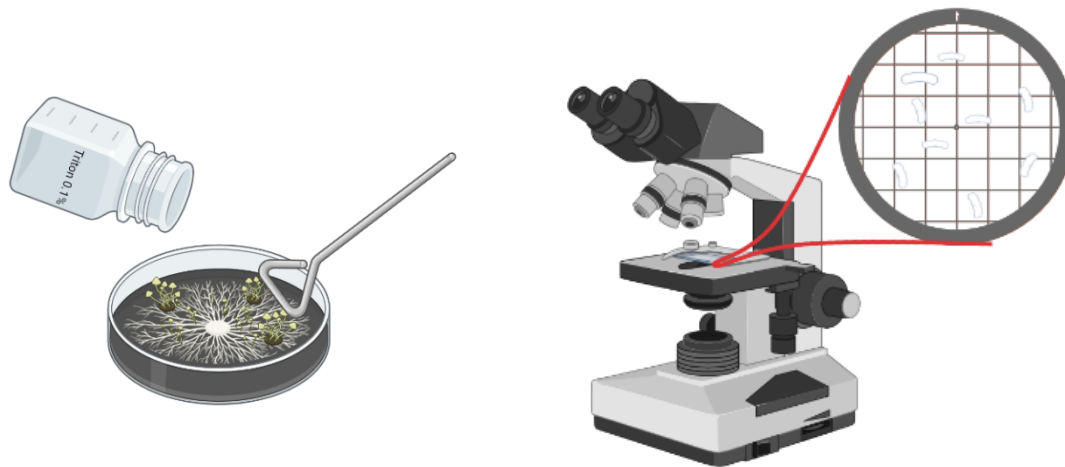


Figura 2. Recolección de conidios y el conteo en cámara de Neubauer. Imagen creada en BioRender.

2.2.-Obtención de micelio.

Los conidios previamente obtenidos, se inocularon en medio de cultivo líquido YPD-2, por 72 horas a 28 °C. Posteriormente el micelio obtenido se filtró al vacío. Una vez obtenido el micelio se almacenó a -80 °C.

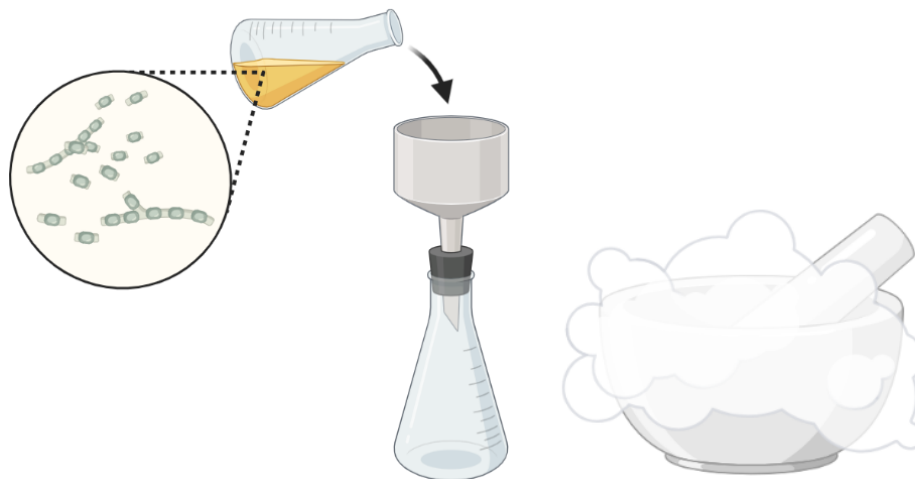


Figura 3. Obtención del micelio. Imagen creada en BioRender.

2.3.- Extracción de DNA.

El micelio obtenido previamente se utilizó para extraer el DNA de nuestras cepas de interés, mediante rompimiento por fricción y utilizando la técnica de fenol-cloroformo (Green. *et al.*, 2012). Las muestras de DNA se trataron con enzimas “RNAsas” con la finalidad de

eliminar la contaminación por RNA. Finalizado el tratamiento con RNAsas, se realizó una electroforesis para ver la integridad del DNA obtenido, como se aprecia en la Figura 4.

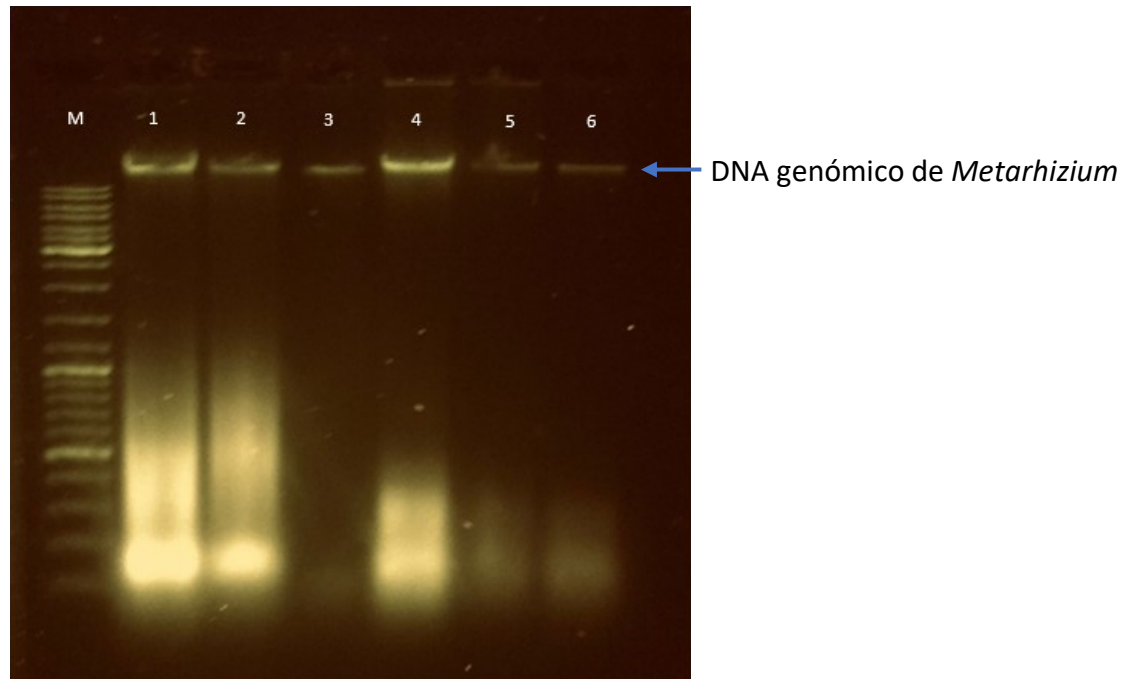


Figura 4. Extracción de ADN en gel agarosa al 1%. La letra M representa el carril marcador de tamaño molecular, los carriles 1 y 2 son las muestras de DNA correspondientes a *M. guizhouense* y los carriles 3 a 6 son pertenecientes a DNA de *M. robertsii*.

Posterior a la electroforesis se realizó la cuantificación del DNA. Esto se realizó utilizando un espectrofotómetro, el cual es un equipo capaz de obtener mediciones de luz reflejada o transmitida de muestras a diferentes longitudes de onda. Para el DNA, se realizan lecturas a 260 nm/280 nm, lo que nos permite conocer la pureza de la muestra y la concentración.

3.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta metodología tiene la finalidad de crear muchas copias de un fragmento de DNA de interés. La reacción requiere de diferentes elementos, los cuales son oligonucleótidos, DNA, nucleótidos, polimerasa y buffer de reacción. Esta reacción se lleva a cabo en un termociclador, el cual es un quipo que puede cambiar de temperaturas para realizar las diferentes etapas de un PCR, las cuales son desnaturalización, alineamiento y elongación (Green. *et al.*, 2012).

Para verificar si la reacción de PCR se hizo correctamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa, donde buscamos identificar bandas correspondientes al tamaño esperado (Figura 5).

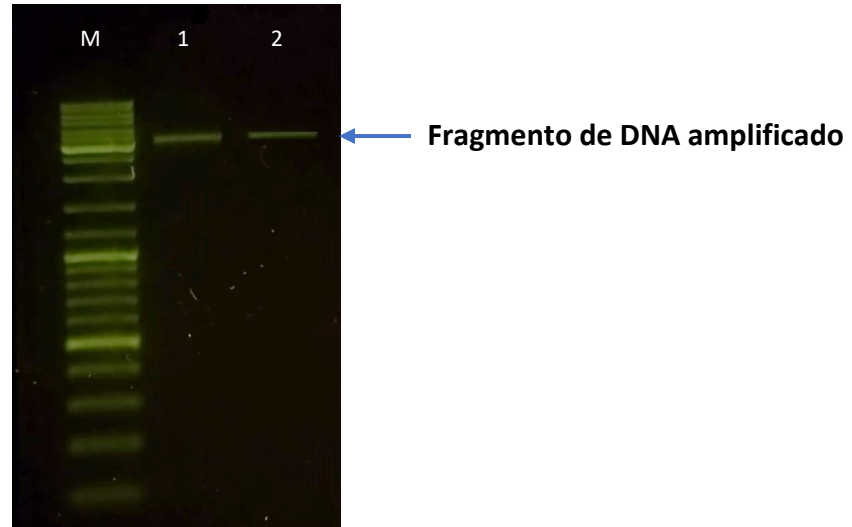


Figura 5. Electroforesis en gel agarosa al 1%. La letra M representa el marcador de tamaño molecular, y en los carriles 1 y 2 los fragmentos de DNA purificados.

Identificadas las bandas, se confirma la amplificación de DNA de interés y se realiza la purificación del fragmento obtenido, esto mediante un Kit comercial, se muestran los pasos de la purificación en la Figura 6.

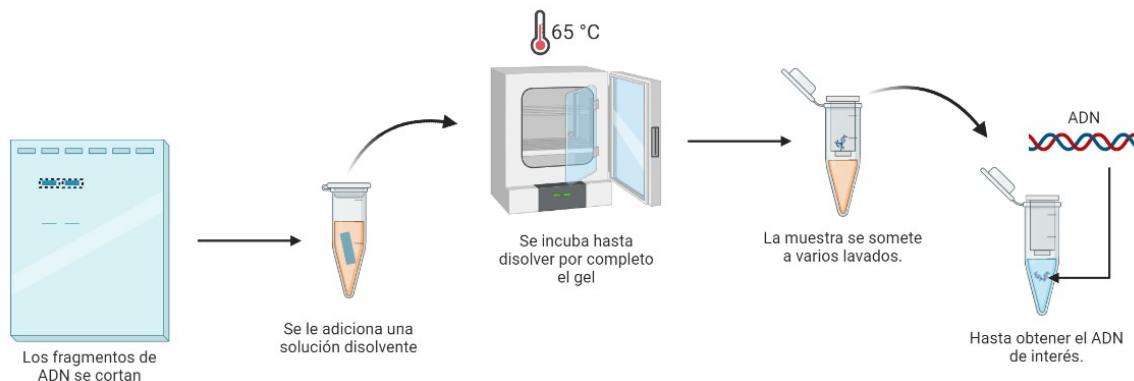


Figura 6. Representación del proceso de purificación de DNA en gel agarosa. Imagen creada en BioRender.

Finalmente, con el DNA purificado se realiza la reacción OSCAR, con la cual se lleva a cabo la construcción para poder transformar *Metarhizium* utilizando *Agrobacterium* y obtener mutantes carentes de los genes de interés.

4.- Conclusiones.

Para la obtención de mutantes en hongos como lo es el género *Metarhizium*, se necesitan diferentes herramientas bioinformáticas y técnicas moleculares. La generación de mutantes facilita y permite dilucidar la participación de genes en los diferentes estilos de vida de *Metarhizium*, permitiendo preceder las bases para el desarrollo de conocimiento y aplicaciones de este género de hongos.

5.-Bibliografía.

- Díaz Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, 15(1), 49-61.
- Franco, M. L., Cediel, J. F., & Payán, C. (2008). Breve historia de la bioinformática. Colombia Médica, 39(1), 117-120.
- Hu, X., Xiao, G., Zheng, P., Shang, Y., Su, Y., Zhang, X., ... & Wang, C. (2014). Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(47), 16796-16801.
- Gotti, I. A., Moreira, C. C., Delalibera Jr, I., & De Fine Licht, H. H. (2023). Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* Are Not Always as Virulent as *Conidia* Are towards *Spodoptera frugiperda* Caterpillars and Use Different Infection Mechanisms. Microorganisms, 11(6), 1594.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular cloning. A Laboratory Manual 4th.
- Kim, H. M., Jeong, S. G., Choi, I. S., Yang, J. E., Lee, K. H., Kim, J., ... & Park, H. W. (2020). Mechanisms of insecticidal action of *Metarhizium anisopliae* on adult Japanese pine sawyer beetles (*Monochamus alternatus*). ACS omega, 5(39), 25312-25318.
- Paz, Z., García-Pedrajas, M. D., Andrews, D. L., Klosterman, S. J., Baeza-Montañez, L., & Gold, S. E. (2011). One step construction of *Agrobacterium*-Recombination-ready-plasmids (OSCAR), an efficient and robust tool for ATMT based gene deletion construction in fungi. Fungal Genetics and Biology, 48(7), 677-684.
- Santoyo, G. (2008). Recombinería en bacterias: ingeniería del ADN usando recombinación homóloga. Revista Latinoamericana de Microbiología, 50(1-2), 38-47.
- Stone, L. B., & Bidochka, M. J. (2020). The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: Evolution and applications. Applied microbiology and biotechnology, 104, 9935-9945.