

## CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN EL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae*

Irma Guadalupe Gutiérrez Alameda<sup>1</sup>, Israel Padilla Guerrero<sup>1</sup>, Eduardo Salazar Solís<sup>2</sup>, Guadalupe Araceli López Andrade<sup>1</sup>, Adriana García Tápia<sup>1</sup>, Gloria Angélica González Hernández<sup>1</sup> y Juan Carlos Torres Guzmán<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Genética Molecular de Hongos. Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n. Guanajuato, Gto. CP. 36050. Tel. (473) 732 00 00 Ext. 8160. Email: [torguz@quijote.ugto.mx](mailto:torguz@quijote.ugto.mx). <sup>2</sup>Departamento de Agronomía. División de Ciencias de la Vida. Campus Irapuato. Universidad de Guanajuato.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, CHIT1, GFP.

**Introducción.** Los hongos mitospóricos tienen un alto potencial como agentes de control biológico de malezas, patógenos de plantas e insectos plaga. *Metarhizium anisopliae* es un hongo entomopatógeno mitospórico y se le conoce como el causante de la “muscardina verde” por el color verde olivo de sus esporas que cubren el cadáver del insecto. Este hongo presenta un amplio rango de hospederos, más de 200 especies de insectos plaga, y en la actualidad se está utilizando en una escala moderada, para el control biológico de varios insectos en Cuba, China, Rusia, Brasil, Australia y México.

El objetivo de este trabajo es el construir un vector para la secreción de productos génicos homólogos y heterólogos en *M. anisopliae* que nos permita incrementar el potencial de patogenicidad del hongo a sus insectos blanco, para lo cual se empleó como marcador de secreción a la proteína verde fluorescente

**Metodología.** La fusión de la secuencia del péptido señal modificada del gen CHIT1 al ORF del gen de la GFP se realizó empleando la técnica de PCR de doble unión, utilizando el kit Platinum PCR SuperMix (Invitrogen). El producto de la fusión se clonó empleado el plásmido pCR2.1TOPO (Invitrogen). La secuencia del plásmido se realizó en las instalaciones del CINVESTAV Campus Guanajuato. La transformación de *M. anisopliae* con el plásmido se realizó mediante protoplastos. Se seleccionaron las colonias resistentes a glufosinato y se identificó la señal de fluorescencia en un microscopio de epifluorescencia marca Nikon acoplado a una cámara digital SPOT-RT Color. La cinética de secreción de la fluorescencia debida a la proteína GFP se realizó inoculando conidios de la cepa transformante en medio Dextrosa Sabourad, tomando alícuotas del medio de cultivo a diferentes tiempos midiendo la fluorescencia en un espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo LS-5B

### Resultados y discusión.

Se analizó el péptido señal de secreción de la proteína Chit1p de *M. anisopliae* y se modificó para aumentar su nivel de hidrofobicidad, el péptido señal de 23 aminoácidos se fusionó al gen de la proteína GFP mediante PCR de doble unión. El producto de la fusión se clonó en el vector pCR4-TOPO, el plásmido resultante denominad pJCTG428 se secuenció, para confirmar la

fusión. Se liberó el producto de la fusión mediante corte con enzimas de restricción y se clonó en el vector pGG269, que posee un promotor fuerte constitutivo para *M. anisopliae*, además contiene como marcador de selección el gen *bar* de resistencia a glufosinato. Se seleccionaron las clonas recombinantes y el vector resultante se introdujo a células de *M. anisopliae* mediante transformación de protoplastos. Se seleccionaron los transformantes resistentes a glufosinato y se analizó la fluorescencia, uno de los transformantes, *SEÑChit-GFP*, mostró una señal de fluorescencia intensa, en todas las fases de crecimiento del hongo, desde conidios hasta micelio (Fig. 1). Se realizó una cinética de crecimiento en medio rico dextrosa Sabouraud tomando fotografías de las células y tomando muestras del sobrenadante para medir el nivel de fluorescencia extracelular y comprobar la funcionalidad del vector. Se determinó el número de copias integradas de la fusión mediante Southern Blot y se comprobó mediante RT-PCR la expresión de la fusión.



Figura 1. Análisis de fluorescencia de la cepa de *Metarhizium anisopliae* SEÑChit-GFP

**Conclusiones.** El vector construido en este trabajo, el cual contiene la etiqueta GFP controlada por el promotor *gdda* y la etiqueta de exportación de *Chit1p* al introducirse en *M. anisopliae* expresa positivamente la proteína verde fluorescente de manera extracelular, indicando que este vector puede ser utilizado para la expresión de genes cuyos productos nos interesa que se localicen extracelularmente.

**Agradecimiento.** Gutiérrez Alameda Irma, es becaria de nivel licenciatura por CONACyT. El presente proyecto es financiado por proyectos específicos de CONACyT y Universidad de Guanajuato.