

EXPRESIÓN DE LA ENZIMA HIALURONIDASA A DE AVISPA (*Polistes annularis*) EN *Metarhizium anisopliae*

Celia Catalina Romero Amaro¹, Israel Padilla Guerrero¹, Eduardo Salazar Solís², Guadalupe Araceli López Andrade¹, Adriana García Tápia¹, Gloria Angélica González Hernández¹ y Juan Carlos Torres Guzmán¹.
¹Laboratorio 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.
²Departamento de Agronomía. División de Ciencias de la Vida. Campus Irapuato. Universidad de Guanajuato.

Palabras clave: *M. anisopliae*, Hialuronidasa A, Control Biológico

Introducción. *Metarhizium anisopliae* es un hongo entomopatógeno ampliamente usado en el control biológico de plagas importantes en la agricultura, ganadería y salud pública, ataca por penetración directa de la cutícula o exoesqueleto de su hospedero (Clarkson y Charnley, 1996)). El ácido hialurónico es un polisacárido que existe principalmente en el tejido conjuntivo de numerosos organismos. La Hialuronidasa es una enzima que hidroliza el enlace entre los residuos de N-acetil-beta-D-glucosamina y D-glucuronato en el ácido hialurónico. El veneno de los insectos contiene hialuronidasa que permite la penetración rápida del veneno al romper las moléculas de ácido hialurónico que conforman la matriz extracelular de los tejidos.

El **objetivo** del trabajo es lograr que *M. anisopliae* produzca y exporte a la enzima hialuronidasa A de *Polistes annularis*.

Metodología. En base a la secuencia de la Hialuronidasa A de avispa se diseñaron oligonucleótidos específicos, se extrajo RNA mediante trituración de avispas empleando el método de TRIZOL® Reagent modificado, para obtener cDNA, mediante el ensayo tipo RT-PCR empleando el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System con Platinum TaqDNA Polimerase (Invitrogen). El producto de la reacción se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) El plásmido recombinante se secuenció en Cinvestav Campus Guanajuato. Para verificar que el cDNA fuese funcional, el cDNA del gen de la Hialuronidasa A se clonó en el plásmido pRSETB (Invitrogen) para su sobreexpresión en *E. coli*, la cual se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen) a una temperatura de 28°C. Una vez que se determinó que el cDNA del gen de la hialuronidasa A se expresa en *E. coli*, se procedió a clonar en el vector pGG269 de *M. anisopliae*, que contiene el gen de resistencia a glufosinato y la señal de exportación del gen Chit1 bajo el control del promotor GpdA. Para lo cual se amplificó el cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa, empleando el kit PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen). El producto de la amplificación se clonó en el vector pGG269. La Transformación de *Metarhizium anisopliae* se realizó utilizando células de la cepa CARO19,

mediante transformación de protoplastos, recuperándose las transformantes resistentes a glufosinato.

Resultados y Discusión. A partir de RNA de avispa se obtuvo el cDNA del gen de la Hialuronidasa A, de 1000 pb aproximadamente. Para demostrar la actividad se expresó en *E. coli* empleando el plásmido pRSETB, observándose la expresión de una proteína de aproximadamente 55 kDa a partir de las 3 horas de inducción a 28°C en presencia de 1mM de IPTG (Fig. 1). Posteriormente el cDNA del gen de la Hialuronidasa se clonó en el vector pGG269 de *M. anisopliae*, fusionándolo a la señal de exportación del gen Chit1 y bajo el control del promotor GpdA. Con el plásmido obtenido se transformaron células de la cepa CARO19 de *M. anisopliae*, se recuperaron 3 transformantes resistentes a glufosinato. En los transformantes se demostró que el gen de la Hialuronidasa se expresa mediante RT-PCR y determinación de la actividad extracelular de hialuronidasa.

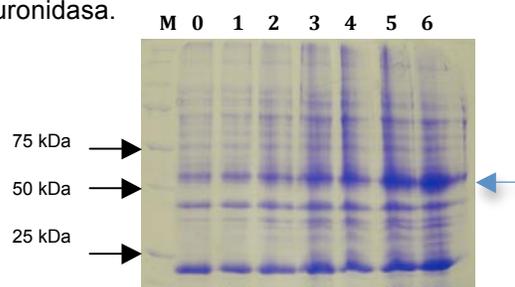


Figura 1. Expresión de la Hialuronidasa A en *E. coli*. Carril M, marcador de peso molecular; Carriles 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, corresponden a las horas post-inducción con IPTG, a 28°C.

Conclusiones

El gen de la Hialuronidasa A de *Polistes annularis* se expresa de manera funcional en *E. coli*. El gen de la Hialuronidasa A de *Polistes annularis*, bajo el control del promotor fuerte y la señal de exportación de Chit1p se expresa en *M. anisopliae* generando una proteína con actividad de hialuronidasa la cual es secretada.

Agradecimiento. Romero Amaro Celia Catalina, es becaria de nivel licenciatura por CONACyT. El presente proyecto es financiado por proyectos específicos de CONACyT y Universidad de Guanajuato.