



OBTENCIÓN DE ESTs DE *Pichia guilliermondii* INDUCIDA CON *Penicillium digitatum*

Pérez Sánchez Gilberto, Larralde-Corona C. Patricia, Oliva-Hernández A. y José A. Narváez Zapata*

Centro de Biotecnología Genómica-IPN, Blvd. Del Maestro s/n, Reynosa 88710, Tam. IPN Ext. 87726, E-mail: *jnarvaez@ipn.mx

Palabras clave: Biocontrol, ESTs diferenciales, antagonismo.

Introducción. El control biológico es una de las alternativas que ha cobrado mayor fuerza en el control de hongos fitopatógenos. En nuestro laboratorio se han aislado y caracterizado levaduras epifíticas de cítricos con actividad antagonica *in vitro* e *in vivo*, y se ha seleccionado uno de los aislamientos con mayor actividad, el cual ha sido identificado molecular y bioquímicamente como *Pichia guilliermondii*. El objetivo del presente trabajo es establecer un protocolo de análisis de ESTs expresados diferencialmente durante la inducción de la actividad antagonica de *P. guilliermondii* hacia el hongo fitopatógeno de cítricos *Penicillium digitatum*. El empleo de este método permitirá apoyar el conocimiento sobre la estrategia de antagonismo utilizadas por la levadura, así como potenciar su actividad de biocontrol.

Metodología. Se realizaron ensayos de inducción antagonica cultivando la levadura en un medio mínimo con paredes celulares de *P. digitatum* como única fuente de carbono (1). Para realizar los ensayos de inhibición de la germinación de las esporas de *P. digitatum* se utilizaron los sobrenadantes de 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de edad del cultivo inducido agregándolo a caldo TGY (triptona, glucosa y extracto de levadura), así como su efecto sobre el crecimiento miceliar del hongo al agregarlo en la superficie de una caja petri con el mismo medio rico complementado con agar. La extracción de ARN total (TriReagent, Probiotek) se realizó tanto de la levadura inducida como de un cultivo control en medio TGY. Posteriormente se llevo a cabo la purificación de los ARN mensajeros de ambas condiciones, los cuales se utilizaron para llevar a cabo una Hibridación Sustractiva Supresiva (SSH) (Clontech, EUA). Los productos de PCR de la SSH se clonaron y se secuenciaron para generar una biblioteca sustractiva de ESTs.

Resultados y discusión. El ensayo de inhibición de germinación de esporas mostró que todos los sobrenadantes presentaron una inhibición del 100 % sobre el crecimiento miceliar del hongo desde el primer día (observación macroscópica en caja petri). Esta actividad inhibitoria disminuyó a un 90 % el segundo día hasta llegar a un 0 % el cuarto día. Los sobrenadantes obtenidos a las 72, 96 y 120 horas de inducción conservaron su capacidad de inhibición un día más, pero eventualmente el hongo fue capaz de germinar y crecer abundantemente. Estos experimentos de inducción sugieren que *P. guilliermondii* libera al medio metabolitos que inhiben temporalmente la germinación de las esporas de *P. digitatum*, pero que finalmente son metabolizados o pierden efectividad. Por otro lado, la mayor actividad inhibitoria presentada por los sobrenadantes de 72, 96 y 120 horas de inducción puede probablemente explicarse por una acumulación de los metabolitos inhibitorios. Como resultado de la SSH se obtuvieron 41 ESTs diferenciales, de los cuales se identificaron 14 genes putativos y 27 secuencias desconocidas (Tabla 1). El empleo de la SSH permite involucrar a estos genes en la actividad antagonica de *P. guilliermondii*, aun cuando en la mayoría de los casos se desconozca su función.

Tabla 1. ESTs expresados diferencialmente durante la inducción antagonica de *P. guilliermondii*.

Clona	EST	BLAST %ID
CBG-07	Enz. de Desubiquitinación Cdc48p (<i>Otu1p</i>), <i>S. cerevisiae</i>	100%
CBG-27	Proteína de unión periplásmica, <i>Rubrobacter xylanophilus</i>	95%
CBG-49	Proteína hipotética, <i>Neurospora crassa</i> OR74A-75	95%
CBG-83	Proteína hipotética 3, <i>Microplitis demolitor</i> bracovirus	86%
CBG-53	Proteína hipotética, <i>Tetrahymena thermophila</i>	73%
CBG-67	Proteína hipotética, <i>Gibberella zeae</i>	61%
CBG-52	Proteína hipotética, <i>Debaryomyces hansenii</i>	53%
CBG-15	Cinasa de union de ATP a histidina, <i>Aurantimonas sp</i>	53%
CBG-17	Proteína hipotética Ca019.9862, <i>Candida albicans</i>	47%
CBG-50	Poliproteína, virus de la enfermedad del sueño	45%
CBG-02	Prot. de extrusión antimicrobiana (<i>MatE</i>), <i>P. Putida</i>	43%
CBG-09	Proteína hipotética, <i>Neurospora crassa</i> OR74A-60	36%
CBG-56	Proteína transmembranal, <i>Burkholderia phytofirmans</i>	33%
CBG-33	Proteína hipotética, <i>Phaeosphaeria nodorum</i>	29%

La tabla 1 enlista únicamente las 14 secuencias relacionadas a genes hipotéticos (secuencias desconocidas no incluidas). Estos genes se relacionan probablemente con la aceleración del metabolismo (competencia por nutrientes) y con la resistencia a compuestos tóxicos.

Conclusiones y perspectivas. Este trabajo sugiere que *P. guilliermondii* libera metabolitos al medio extracelular que tienen la capacidad de inhibir temporalmente la formación del tubo germinal en las esporas de *P. digitatum*. Este estudio es el primer acercamiento molecular de este fenómeno biológico, y la aplicación de la técnica de SSH resulto efectiva para obtener 41 ESTs de genes putativos que podrían estar participando directa o indirectamente en el antagonismo. Sin embargo, la posterior identificación *in silico* de únicamente 14 ESTs permite sugerir la novedad del fenómeno antagonico entre estas especies.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo económico otorgado a los proyectos CGPI-IPN (2005-0342 y 2006-0913) y a SAGARPA-CONACyT 2003-C01-8.

Referencias

1. Bar-Shimon, M; Yehuda, H; Cohen, L; Weiss, B; Kobeshnikov, A; Daus, A; Goldway, M; Wisniewski, M; Droby, S. (2004) Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics* 45: 140-148.