

Caracterización de un gen con similitud a un transportador tipo abc de *Metarhizium anisopliae* (Hipocreales: Clavicipitaceae)

Miguel Ángel Hernández-Espinosa^{1,2}, Juan Carlos Torres-Guzmán²,
Gloria Angélica Hernández-González², Selene Lucero Aguilar-Gordillo¹.

¹Centro de Investigaciones Costeras, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente 1150, col. Lajas Maciel, 29000 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. | ²Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato Noria Alta s/n, Colonia Noria Alta, 36050 Guanajuato, Guanajuato, México. miguel.hernandez@unicach.mx

Resumen

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno empleado en el control biológico de insectos plaga alrededor del mundo. Con el propósito de elucidar los mecanismos involucrados en las diversas etapas del ciclo infectivo de *M. anisopliae* hacia su hospedero, se analizó la secuencia del gen Mamdr2 que presenta homología con proteínas transportadoras del tipo ABC, las cuales se caracterizan por transportar una amplia variedad de sustratos y juegan un papel principal en la resistencia a multifarmacos (MDR). El análisis de la expresión del gen Mamdr2 de *M. anisopliae* durante la invasión a su hospedero *Plutella xylostella*, indicó que este gen se expresa a partir de las 48 horas, cuando se inicia el crecimiento invasivo, lo que sugiere que el producto del gen participa en el proceso infectivo y durante la formación del nuevo conidio, posiblemente para iniciar un nuevo ciclo infectivo en otro hospedero. La adición de compuestos tóxicos para *M. anisopliae* como son los antifúngicos incrementó la expresión del gen Mamdr2 a nivel de RNA mensajero, sugiriendo que el producto de este gen podría participar en la detoxificación de las células en *M. anisopliae* durante la invasión a su hospedero.

Palabras clave: *M. anisopliae*, antifúngicos, control biológico, expresión génica.

Summary

Metarhizium anisopliae is an entomopathogenic fungus used in the biological control of pest insects around the world. For the purpose of elucidating the mechanisms involved in the different stages of the infectious cycle of *M. anisopliae* into its host, we analyzed the sequence Mamdr2 gene having homology to ABC transporters, which are characterized by carrying a wide variety of substrates and play a major role in multidrug resistance (MDR). Analysis of the expression of Mamdr2 gene of *M. anisopliae* during the invasion of its host *Plutella xylostella*, indicated that this gene is expressed after 48 hours, when the invasive growth starts, suggesting that the product of this gene is involved in the infective process and during the formation of the new conidium, possibly to start a new infection cycle in another host. The addition of toxic compounds to *M. anisopliae* such as antifungals, increased Mamdr2 gene expression of messenger RNA level, suggesting that the product of this gene might be involved in the detoxification of cells during invasion *M. anisopliae* its host.

Keywords: *M. anisopliae*, antifungals, biological control, gene expression

INTRODUCCIÓN

M. anisopliae es un hongo entomopatógeno que crece naturalmente en el suelo y ha sido aislado de insectos infectados de diferentes partes del mundo (Roberts y St. Leger, 2004). *M. anisopliae* es utilizado como biocontrolador exitoso para más de 200 insectos plaga en la agricultura, ganadería e incluso en vectores de enfermedades humanas como el mosquito vector de la malaria *Anopheles stephensi* (Kannan *et al.*, 2008). El estudio del mecanismo y de los genes involucrados en el

proceso infectivo de este hongo entomopatógeno sobre su hospedero es de interés para entender el mecanismo de acción y así obtener cepas genéticamente modificadas que sean más eficientes en el control biológico de especies blanco (Freimoser *et al.*, 2003).

En el presente estudio se evaluó el gen Mamdr2 que presenta homología con proteínas transportadoras del tipo ABC. Los transportadores ABC presentes en membranas plasmáticas tienen el potencial para secretar compuestos

antifúngicos al exterior de la membrana, de esta manera evitan la acumulación de compuestos tóxicos en sus sitios blancos dentro de las células miceliales ayudando a prevenir su acción tóxica. Los transportadores ABC en hongos son los más importantes ya que están involucrados en la protección contra antifúngicos (De Waard *et al.*, 2006). El primer transportador ABC caracterizado fue PDR5 de *Saccharomyces cerevisiae* el cual confiere resistencia a muchas toxinas no relacionadas. Otros transportadores ABC han sido identificados en hongos patógenos oportunistas como *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* y en hongos fitopatógenos como *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea* y *Mycosphaerella graminicola*, cuya función es la de proveer protección al hongo contra antibióticos, compuestos de plantas y fungicidas (Sun *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se analizó la participación del gen Mamdr2 en respuesta a antifúngicos y durante el proceso infeccioso contra su hospedero *P. xylostella*, un insecto plaga de los cultivos de crucíferas en México.

METODOLOGÍA

Organismos biológicos

Para los bioensayos se utilizó la cepa CARO19 de *M. anisopliae*, procedente del Centro Nacional de Referencia, Tecomán, Colima, México. Así como su hospedero el insecto *P. xylostella*, obtenido del departamento de agronomía de la Universidad de Guanajuato.

Medios de cultivo sólidos y líquidos

Los medios de cultivo empleados para *M. anisopliae* fueron: Medio Mínimo (MM), Medio Dextrosa Sabourad (MDS) y para los medios de cultivo sólido se adicionaron 20 g de agar bacteriológico (Bioxon) por litro de medio de cultivo, con un pH final de 5.7 ± 0.2 . En el cultivo en Medio Sólido se sembraron 500 conidios/mL de *M. anisopliae*, incubando a 28 °C durante 10 días para la producción de conidios. Los conidios de *M. anisopliae* se sembraron en 100 mL de MDS líquido a una concentración de 1×10^6 conidios/mL, se incubaron por 48 h a 28 °C, en agitación constante a 160 rpm.

Recolección de conidios

Para la obtención de conidios de la cepa CARO19 de *M. anisopliae*, se sembraron (500 conidios/caja) en Medio Mínimo (MM) sólido, se incubaron a 28 °C por 5-8 días, hasta observar conidiación. Se añadieron a la caja de Petri 10 mL de agua con TRITON X-100 al 0.1 % estéril, se

raspo con un asa de Nigransky estéril, para desprender las esporas del micelio. Las esporas desprendidas se recolectaron con una pipeta Pasteur estéril y se filtraron a través de una malla sintética a un tubo Corning de 50 mL estéril. Una vez colectadas las esporas, se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 15 ml de agua con TRITON X-100 al 0.1% tres veces, repitiendo el procedimiento anterior. Finalmente, los conidios se diluyeron 1:100 y se contaron en una cámara de Neubauer, para posteriormente guardarlos en agua con TRITON X-100 al 0.01% a 4%.

Extracción de ARN total

La extracción del ARN total se realizó mediante el método de Trizol® Reagent (Invitrogen). El micelio fue recolectado de los insectos infectados durante las diferentes etapas del ciclo infeccioso.

Tratamiento de RNA total con ADNAsas

Para remover el ADN contaminante y evitar que sirva como templado en los ensayos de RT-PCR semicuantitativo, las muestras de ARN total en las distintas condiciones de crecimiento, fueron tratadas con ADNasa RQ1 RNAase-free DNAase (Promega) según las especificaciones del fabricante.

Reacción en cadena de polimerasa

La amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa se realizó de la siguiente manera, la mezcla de reacción contiene 150-200 ng/ μ L de ADN como cadena patrón, 1 μ g/ μ L por cada oligonucleótido específico, 3 μ L H₂O grado HPLC y 19 a 44 μ L High Fidelity PCR Master Mix (Invitrogen) para completar un volumen final desde 25 hasta 50 μ L según sea el caso. Las condiciones generales de amplificación fueron; 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72 °C, posteriormente un ciclo de 10 min a 72 °C. Se empleó un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

RT-PCR

Para los ensayos de RT-PCR la síntesis del cDNA se realizó usando el kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen), dicho cDNA se utilizó como cadena templado para el PCR utilizando el kit PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Utilizando un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

Análisis de la expresión *in vitro* del gen Mamdr2 de *M. anisopliae* durante su ciclo de vida en el hospedero *P. xylostella*. Se utilizó una suspensión de 1.5×10^9 conidios/ml en agua destilada con Triton X-100 al 0.5 % de la cepa CARO 19 de *M. anisopliae*, de la cual se asperjaron 0.5 ml sobre cada muestra de 25 larvas del tercer instar de *P. xylostella* contenidas en una caja de Petri, mediante una torre de microaspersión (Potter Precision Lab Spray Tower Burkard, manufacturing co. Ltd. Kmansworth Herst England) a una presión de 10 libras /pulgada².

Transcurridas las primeras 2 horas postinoculación, se alimentó a las larvas con hojas de brócoli cada 24 horas. Se recolectaron las muestras de 25 larvas cada una, durante diferentes tiempos postinoculación: 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, y 192 h. Asimismo, se guardó una muestra de los conidios usados en la infección para el tiempo cero y se recolectaron los conidios usados en el tiempo 216 h, también se usaron 25 larvas sin infectar 48 horas. Todas las muestras se almacenaron a -70°C hasta que se les extrajo el ARN total. El ARN fue tratado con DNAsas previamente a los ensayos de RT-PCR semicuantitativo. La electroforesis se realizó por 120 min a 50 Voltios en geles de agarosa ultrapure TM agarose-1000 (invitrogene) al 3 %, conteniendo 4 µL de bromuro de etidio para cada 100 ml de agarosa.

Análisis de la expresión *in vitro* del gen Mamdr2 con antifúngicos y antibióticos

Se realizó el análisis de la expresión del gen Mamdr2 con los antifúngicos resveratrol, methotrexato, miconazol, ciclohexamida, glufosinato, carboxina y el antibiótico higromicina (tabla 1). Se recolectó micelio crecido en MM durante 48 horas, se filtró el micelio y se agregaron 50 ml de medio mínimo en matraces, posteriormente se adicionó el antifúngico usando para cada uno de ellos la mitad de la concentración mínima inhibitoria. Se agregó micelio a cada matraz con 50 ml de medio mínimo con el antifúngico. Se incubó durante 5 hrs y finalmente se recolectó el micelio y se guardó a -70°C. Posteriormente se realizó la extracción de ARN y se realizaron ensayos de RT-PCR para determinar el nivel de expresión en la presencia de cada antifúngico. Como control se usó el ARN obtenido de micelio sin exposición al antifúngico.

RESULTADOS

Análisis de la expresión *in vivo* del gen Mamdr2 de *M. anisopliae* durante la invasión a su hospedero *P. xylostella* Para realizar el análisis de la expresión del gen Mamdr2 durante el proceso infectivo del hongo a su hospedero

P. xylostella, se usaron larvas de tercer instar que fueron asperjadas con conidios de la cepa CARO 19 de *M. anisopliae*. Se monitorearon diferentes estadios de la infección mediante fotografías y se recolectaron larvas infectadas para realizar la extracción de ARN de los tiempos postinoculación a las 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 226 horas (figura 1C).

A partir de este ARN se hicieron ensayos de RT-PCR semicuantitativo amplificando simultáneamente, el gen Mamdr2 y el gen de expresión constitutiva utilizado como control. Se utilizó el programa Quany One (BioRad), para medir el nivel de expresión del gen Mamdr2 comparándolo con la expresión del gen control de 156 pb correspondiente a un EST AJ274118 de expresión constitutiva (Freimoser *et al.*, 2003; Morales-Hernández *et al.*, 2010). Los productos se separaron mediante electroforesis y el análisis densitométrico de las bandas de amplificación mostrado en la figura 1A, indicó que el gen Mamdr2 está presente en el conidio, desaparece y no se expresa en las primeras 24 horas posteriores a la inoculación durante la germinación temprana y penetración. Su expresión reaparece a partir de las 48 horas durante el crecimiento invasivo, la cual continúa incrementando hasta las 120 horas, coincidiendo este máximo de expresión con el inicio de la conidiación sobre el cadáver del insecto. Aunque se presentan oscilaciones en los niveles del transcrito éste se mantiene alto hasta su empaquetamiento en el conidio (figura 1B).

Expresión del gen Mamdr2 en respuesta a antifúngicos y antibióticos

Se realizó el análisis de la expresión del gen Mamdr2 cuando el micelio está expuesto a los antifúngicos reveratrol, methotrexato, miconazol, ciclohexamida, glufosinato, carboxina y el antibiótico higromicina. Para ello el micelio de 48 horas, se suspendió en medio mínimo fresco y se le adicionó el antifúngico a concentración subletal (la mitad de la concentración mínima inhibitoria, tabla 1). Después de 5 horas de exposición al compuesto tóxico se extrajo el RNA y se realizaron ensayos de RT-PCR. En la figura 2, se observa un incremento de la expresión del gen Mamdr2 desde 40 % hasta 60 % en respuesta a los antifúngicos glufosinato, higromicina, ciclohexamida, miconazol y resveratrol. Un 20 % de incremento en la expresión en respuesta al glufosinato y solo en el caso del metotrexato no hubo cambio en los niveles de expresión del gen.

Antifúngicos	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) DL_{50}
Resveratrol	400
Metotrexato	200
Miconazol	100
Ciclohexamida	200
Higromicina	100
Carboxina	200
Glufosinato	50

TABLA 1

Concentración de antifúngicos usados en los ensayos de expresión del gen Mamdr2.

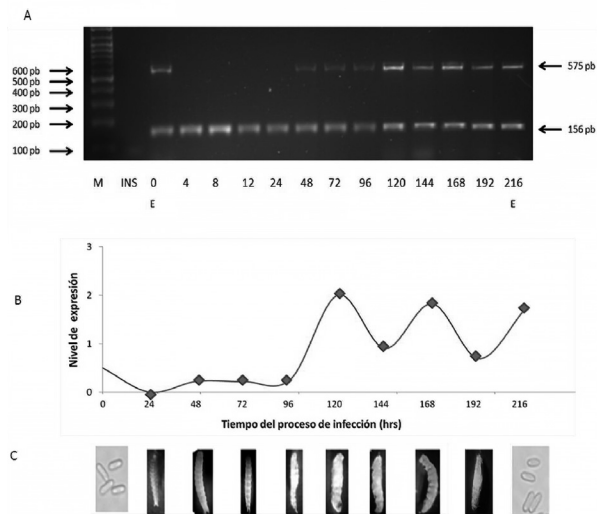


FIGURA 1

Figura 1. Análisis de la expresión el gen Mamdr2 de la cepa CARO19 de *M. anisopliae* mediante RT-PCR semicuantitativo durante el proceso de infección de larvas de *P. xylostella*. A) Productos de la amplificación mediante RT-PCR semicuantitativo, separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. B) Análisis densitométrico del nivel de expresión relativo del gen Mamdr2. El gen de expresión constitutiva EST AJ274118 se usó como control de carga en la reacción de PCR C). Aspecto de las larvas de *P. xylostella* durante el proceso de infección a distintos tiempos postinoculación con conidios del hongo. (M): marcador de tamaño molecular (GeneRuler™ DNA ladderMix 0.1-10 Kp). (E): Representa el producto de amplificación obtenido de esporas. INS: cDNA del insecto sin infectar.

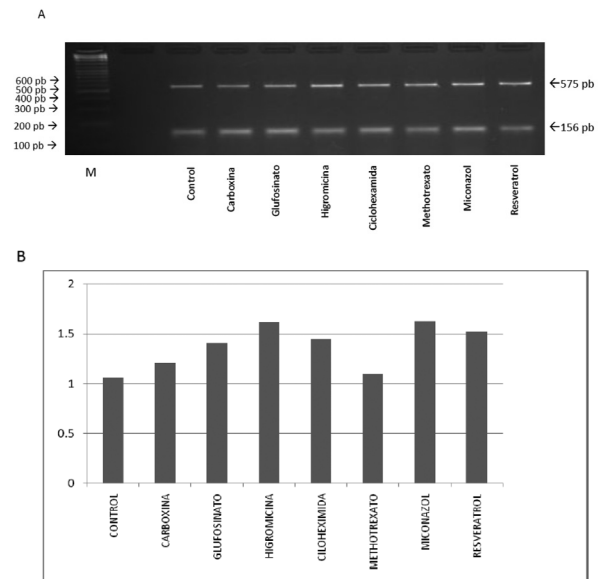


FIGURA 2

Análisis de la expresión del gen Mamdr2 de la cepa CARO19 de *M. anisopliae* durante la presencia de antifúngicos. En reacciones de RT-PCR semicuantitativo se evaluó la expresión del gen Mamdr2 en poblaciones de ARN de células expuestas al inhibidor. A) Productos de la amplificación mediante RT-PCR semicuantitativo, separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%. B) Análisis densitométrico del nivel de expresión relativo del gen Mamdr2. El gen de expresión constitutiva EST AJ274118 se usó como control de carga en la reacción de PCR. (M): marcador de tamaño molecular (GeneRuler™ DNA ladderMix 0.1-10 kp). (Control): Representa el RNA sin presencia de antifúngicos.

DISCUSIÓN

En el ensayo de expresión in vivo para el gen Mamdr2 de *M. anisopliae* durante la invasión al hospedero *P. xylostella*, se observó que en la cepa CARO19, la expresión del gen comienza a partir de las 48 horas coincidiendo con el crecimiento invasivo del hongo dentro del cuerpo del insecto. Esta expresión se va incrementando, alcanzando un máximo a las 120 horas, cuando el micelio emerge e inicia el proceso de conidiación sobre el exoesqueleto del insecto. Aunque después de este tiempo se observaron oscilaciones en los niveles de expresión del gen, la expresión se mantiene alta hasta la conidiación completa. Adicionalmente observamos que este gen responde a

todos los antifúngicos probados (excepto a methotrexato) incrementado su expresión desde 25 hasta el 60 %. Estos resultados se correlacionan con otros reportes donde estos genes aumentan su expresión ante la presencia de ciertos antifúngicos (Gupta y Chattoo, 2007). Estos resultados nos permiten sugerir que el gen Mamdr2 podría estar involucrado en eventos de destoxificación para evadir el mecanismo de defensa del insecto que está siendo invadido, y/o para expulsar las toxinas que el hongo produce para acelerar la muerte del insecto. La comprobación de esta hipótesis requeriría la caracterización de cepas sobre-expresantes o deletantes del gen.

En otros sistemas se ha demostrado que los transportadores ABC (Cassette de unión a ATP) pertenecen a una superfamilia de proteínas integrales de membrana que utilizan la energía de hidrólisis de ATP para transportar activamente una amplia variedad de sustratos tales como; toxinas, fármacos, iones, polisacáridos, aminoácidos, vitaminas péptidos y lípidos. A través de membranas celulares en organismos que van desde procariotas a eucariotas. Varios miembros de esta superfamilia funcionan como exportadores de agentes citotóxicos que cruzan las membranas biológicas ayudando a mantener un reducido nivel intracelular de toxinas o metabolitos (Driessen *et al.*, 2000; De Waard *et al.*, 2006).

En el hongo fitopatógeno *M. grisea* la mutación del gen Abc3 se demostró que juega un papel importante durante la penetración al huésped y en la supervivencia al estrés oxidativo durante la patogénesis (Sun *et al.*, 2006).

Se ha reportado que el transportador ABC del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* puede ser un factor en la patogénesis a plantas y en la protección contra fungicidas; ya que la delección del gen de BcatrB que codifica un transportador ABC, reduce ligeramente la virulencia de *B. cinerea* y aumenta la sensibilidad a fungicidas comerciales (Schoonbeek *et al.*, 2001). También la sobreexpresión o la delección del gen AtrB de *Aspergillus nidulans* que codifica para un transportador ABC MDR, afecta la resistencia a todas las principales clases de fungicidas y algunos compuestos naturales, aumentando su resistencia o sensibilidad respectivamente (Andrade *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

El análisis de la expresión del gen Mamdr2 de la cepa CARO 19 de *M. anisopliae* durante la invasión a su hospedero *P. xylostella* indicó que este gen se expresa durante este proceso a partir de las 48 horas, cuando inicia el crecimiento invasivo, lo que sugiere que el producto del gen participa en el proceso infectivo y durante la formación del nuevo conidio, posiblemente para iniciar un nuevo ciclo infectivo en otro hospedero.

La adición de compuestos tóxicos para el hongo como son los antifúngicos incrementa la expresión del gen Mamdr2 a nivel de RNA mensajero, sugiriendo que el producto de este gen podría participar en la destoxificación de las células.

LITERATURA CITADA

- ANDRADE, A.C., G. DEL SORBO, J. VAN NISTELROOY & M. DE WAARD, 2000. The ABC Transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* Mediates Resistance to all Major Classes of Fungicides and some Natural Toxic Compounds. *Microbiology* 146: 1987-1997.
- DE WAARD, M., A. ANDRADE, K. HAYASHI, H. SCHOONBEEK, I. STERGIPOULOS & L. ZWIERS, 2006. Impact of Fungal Drug Transporters on Fungicide Sensitivity, Multidrug Resistance and Virulence. *Pest Management Science* 62: 195-207.
- DE WAARD, M.A., 1997. Significance of ABC Transporters in Fungicide Sensitivity and Resistance. *Pest Management Science* 51: 271-275.
- DRIESSEN, A., B. ROSEN & W. KONINGS, 2000. Diversity of Transport Mechanism: Common Structural Principles. *Trends Biochemistry Science* 25: 397-401.
- FREIMOSER, F., S. SCREEN, G. HU & R. ST. LEGER, 2003. EST Analysis of Genes Expressed by the Zygomycete Pathogen *Conidiobolus coronatus* During Growth on Insect Cuticle. *Microbiology* 149: 1893-1900.

- GUPTA, A. & B. CHATTOO, 2007.** Functional Analysis of a Novel ABC Transporter ABC4 from *Magnaphorte grisea*. *FEMS Microbiology letter* 278: 22-28.
- KANNAN S., K. MURUGAN, K. NARESH, N. RAMASUBRAMANIAN & P. MATHIYAZHAGAN, 2008.** Adulticidal Effect of Fungal Pathogen, *Metarhizium anisopliae* on Malarial Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *African Journal of Biotechnology* 7: 838-841.
- ROBERTS, D.W. & R. ST. LEGER, 2004.** *Metarhizium* spp. Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Micological Aspects. *Advances in Applied Microbiology* 54: 1-70.
- SCHOONBEEK, H., G. DEL SORBO G & M. DE WAARD, 2001.** The ABC Transporter BcatrB Affects the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to the Phytoalexin Resveratrol and the Fungicide Fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 562-571.
- SUN, C., A. SURESH, Y. DENG & N. NAQVI, 2006.** A Multidrug Resistance Transporter in *Magnaporthe* is Required for Host Penetration and for Survival During Oxidative Stress. *The Plant Cell* 18: 3686-3705.