

OBTENCIÓN DE MUTANTES *parp::hyg* DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* MEDIANTE LA TÉCNICA PCR DE DOBLE FUSIÓN.

Gallegos Almanza I. A. ⁽¹⁾; Martínez Cadena M. G. ⁽²⁾; Ferrel Cano L. E. ⁽²⁾.

(1) Facultad de Química

Universidad Autónoma de Querétaro

(2) División de Ciencias Naturales y Exactas / Departamento de Biología

Universidad de Guanajuato

RESUMEN

Se obtuvieron mutantes del hongo filamentoso *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* produciendo una delección en el gen *parp* con el gen *hph* el cual introduce una resistencia a la higromicina. El gen *parp* codifica para la proteína poli ADP-ribosil polimerasa (PARP), enzima implicada en las una de las vías de reparación del DNA Para lograr esto se obtuvieron mediante PCR los fragmentos de aproximadamente 1500 pb (F1y F2) del extremos 5' y 3' que flanqueaban el ORF del gen *parp* utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de éstos. Por otra parte se amplificó el gen *hph*; el fragmento F1-Hyg-F2 se obtuvo mediante la técnica de PCR de doble fusión. Dicho fragmento se utilizó para la transformación de protoplastos de este hongo. Mediante este método se obtuvieron colonias que crecieron en medio con higromicina, lo cual indicó que el fragmento F1-Hyg-F2 se integró en el DNA obteniendo mutantes $\Delta parp$ de *F. oxysporum*.

INTRODUCCIÓN

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* es un hongo fitopatógeno causal de la enfermedad denominada marchitez vascular de la plántula del tomate. Este hongo se caracteriza por producir tres tipos de esporas asexuales: las microconidias, macroconidias y clamidosporas, estas últimas tienen paredes muy gruesas, lo cual las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables y a la ausencia de un huésped (Agrios, 1988). Las plantas responden a la invasión del hongo produciendo sustancias que dañan el DNA del hongo y de esta manera inhibiendo su crecimiento. En organismos eucariotes se ha descrito un mecanismo involucrado en la reparación del DNA denominado poli ADP-ribosilación a nivel postraducciona l de histonas y otras proteínas nucleares que contribuyen a la supervivencia de células dañadas en donde las proteínas PARP (poli ADP-ribosil polimerasa) y PARG (poli ADP-ribosil glicohidrolasa) están involucradas en los eventos de señalización temprana desencadenados en respuesta al daño del DNA (Schreiber y col., 2003).

En este trabajo nos dimos a la tarea de obtener mutantes en el gen *parp* de *F. oxysporum*. Para lograr este objetivo se obtuvieron por PCR, cada uno de los fragmentos de 1490 pb, F1 (extremo 5') y F2 (extremo 3') del gen *parp* y un fragmento de 1500 pb conteniendo el gen *hph* que confiere resistencia a la higromicina. Estos tres fragmentos se unieron mediante el uso de la técnica de PCR de doble fusión en la cual se realizan dos rondas de amplificación para conseguir que los fragmentos junto con el gen *hph* se amplifiquen, teniendo así un gran fragmento que interrumpirá el gen *parp*, produciendo el fragmento *parp::hph*. Dicho fragmento se utilizará para transformar protoplastos del hongo y para posteriormente obtener células transformantes resistentes a la higromicina. Para el evento de transformación es necesario que las células del hongo sean más permeables para permitir la entrada de los fragmentos, esto se hace mediante la digestión de la pared celular por un mecanismo enzimático obteniendo así los protoplastos.

EXPERIMENTAL

Crecimiento del hongo para obtención de conidias y micelio. Se inocularon 100 μ L del stock de esporas resuspendidas en glicerol al 30 % (v/v) y mantenidas a -70°C en aproximadamente 100 mL de medio PDB, se incubaron de 3 a 5 días a 28°C, y con una agitación rotatoria de 170 rpm. Posteriormente, el medio de cultivo se filtró y el filtrado obtenido se centrifugó durante 10 min a 10,560 xg a 17,600 xg. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 10-15 mL en agua estéril y se centrifugó. Se lavó tres veces con agua estéril. Se resuspendió la pastilla en 5 mL de agua estéril y se realizó el conteo de las esporas en cámara de Neubauer. Se inocularon 5×10^6 esporas/mL en el medio de cultivo (PDB), se incubó 12 horas a 28°C. El micelio se colectó filtrando el medio de cultivo con tela de nylon y se congeló en nitrógeno líquido guardándose a -70°C.

Extracción de DNA genómico de *Fusarium oxysporum*. El micelio se machacó en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero. Aproximadamente 0.5 mL (polvo). Se añadieron 400 μ L de amortiguador de extracción (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, pH 8). Se le agregaron 80 μ L SDS al 10% + 8 μ L de proteinasa K 20 mg/mL y se incubó por 1 h a 60° C, posteriormente se le agregó 320 μ L 5 M NaCl. Se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante se vertió en un tubo nuevo. Se le adicionaron 0.6 volúmenes isopropanol y se incubó por 20 minutos en hielo. Se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm. Se lavó 2 veces con etanol al 70%. Se centrifugó por 5 minutos y se dejó secar. El DNA se resuspendió en 30 μ L de agua mQ + RNasa (1 – 2 μ L y se dejó incubarlo por 10 minutos a 37° C) y realizó una electroforesis en agarosa para ver su calidad y si no estaba hidrolizado se almacenó a -80°C hasta su uso.

PCR de doble fusión. Este método es una variante de la PCR convencional (Szewczyk y col., 2007), comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de oligonucleótidos en cada una con el fin de aumentar la sensibilidad de amplificación; primero se realiza una amplificación con los fragmentos externos (F1- y -F2) y posteriormente se amplifica un fragmento de DNA más extenso que contiene el segmento diana (F1-Hyg y Hyg-F2). Después con el producto de amplificación se realiza una segunda PCR con los indicadores internos para la amplificación de una región específica (F1-Hyg-F2) (ver figura 1). Cabe mencionar que los fragmentos ya estaban hechos al momento de mi llegada a la estancia (cortesía de Liz Elba Ferrel Cano) y fueron utilizados posteriormente para el evento de transformación de los protoplastos. Sin embargo, a lo largo del proyecto realizamos varios eventos de fusión con el fin de encontrar mejores condiciones y mayor cantidad de éste.

Obtención de protoplastos. Para la obtención de protoplastos se obtienen conidias como se mencionó antes y enseguida éstas son contadas en la cámara de Neubauer; se inoculan 2×10^8 conidias en 200 mL de PDB y el medio se incubó a 28° C durante 12 a 14 h con una agitación rotatoria de 170 rpm. Las germínulas obtenidas se incubaron con una enzima glicohidrolítica (glucanasa) que digirió la pared celular de éstas; los protoplastos formados se observan al microscopio para corroborar su formación; posteriormente los protoplastos se filtran, se lavan por centrifugación y se almacenan a -80°C hasta su uso.

Transformación de *Fusarium oxysporum*. Para la transformación de los protoplastos se hicieron una serie de 4 controles (protoplastos) y una serie de 4 transformantes (protoplastos + DNA transformante) según el protocolo que se muestra en la Figura 2.



3

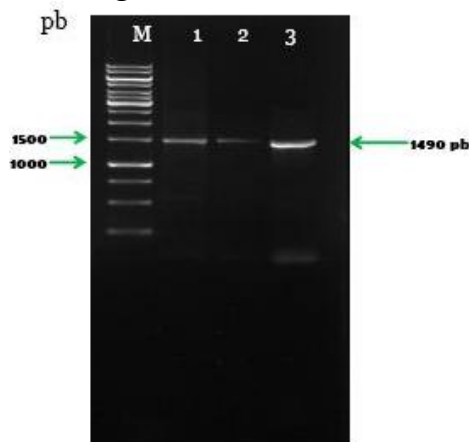
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Extracción de DNA genómico de *Fusarium oxysporum*. Como puede verse en la Figura 3 el DNA genómico obtenido (carriles 1 y 2) aparece como una sola banda de mayor peso molecular que los marcadores, lo cual indica que es de muy buena calidad.



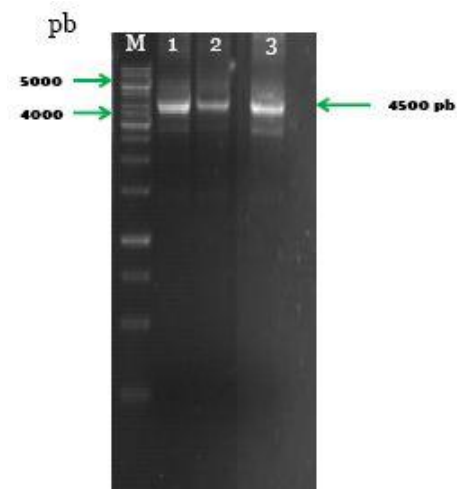
Figura 3.- DNA genómico obtenido del micelio de *F. oxysporum*. El DNA genómico obtenido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. En el gel se aplicaron 4 μ L de muestra del DNA genómico y 1 μ L de buffer de carga (carriles 1 y 2) y Marcadores de tamaño de DNA de 1 kpb (carril M).

PCR de doble fusión. Como se muestra en la Figura 4 los fragmentos amplificados de F1 y F2 presentan un tamaño esperado de 1490 pb y el de la higromicina de 1500 pb,. Al realizar la PCR de fusión de estos fragmentos debemos obtener uno de un tamaño 4480 pb $\sim$ 4500 pb, tal como se muestra en la Figura 5.



M: marcadores
Carril 1: F1
Carril 2: F2
Carril 3: *hph*

Figura 4.- Amplificación Fragmentos F1, *hph* y F2



M: marcadores
Carril 1-3: Fusión

Figura 5.- Amplificación de la fusión (F1-*hph*-F2)

Obtención de protoplastos *Fusarium oxysporum*. Como se describió en la parte experimental de germinulas de 12 h de crecimiento en 200 mL de medio PDB se obtuvieron 2.375×10^7

protoplastos, los cuales se repartieron en 2 tubos eppendorf teniendo así una concentración de 1.1875×10^7 protoplastos en cada tubo. Estos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Transformación de *Fusarium oxysporum*. Como puede verse en la Figura 6 (que es una de las cuatro cajas de transformantes) hay colonias que crecieron en el medio con higromicina confirmando que se obtuvieron mutantes *parp::hyg* de *Fusarium oxysporum*.

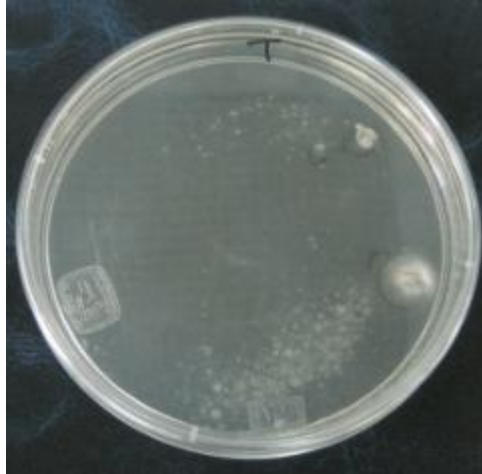


Figura 6.- Mutantes *parp::hyg* obtenidas de *Fusarium oxysporum*.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron colonias transformantes aisladas de *Fusarium oxysporum* que crecieron en el medio con higromicina que deben llevar la mutación *parp::hyg*. A estas mutantes falta comprobar si la integración *parp::hyg* fue homóloga o ectópica pues el que haya crecido en el medio con higromicina no quiere decir que haya una delección en el gen *parp*, que en *Fusarium* la integración homóloga no es del 100%.

También quedaría por averiguar si aumentando la concentración de higromicina a 100 $\mu\text{g/mL}$, las mutantes continúan creciendo confirmando que las colonias que tenemos no hayan crecido solo por la baja concentración de higromicina añadida (66 μg).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brock. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. “Biología de los microorganismos”, Prentice hall/Pearson, **2006**.

Ferrel Cano, L. E. “Análisis comparativo de la expresión de los genes *parp* y *parg* de cultivos obtenidos bajo condiciones normales y de estrés oxidativo del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*”. Tesis en proceso Maestría en Ciencias (Biología). Universidad de Guanajuato, México. **2010**.

Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A. y Oakley, B.R. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. Nature Protocols 1: 3111 – 3120, **2007**.