

Localización del hongo *Metarhizium* spp. en su asociación con la planta *Sorghum vulgare*

Herrera Gutierrez Luz Janeth (1), Padilla Guerrero Israel Enrique (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [luz.janeth.herrera@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ie.padillaguerrero@ugto.mx]

Resumen

El hongo *Metarhizium* es un entomopatógeno que puede interactuar con las plantas, colonizando las raíces en forma de micorriza y endofítica, llevando a cabo una simbiosis con las plantas que estimula el crecimiento de la raíz, traslada nutrientes a las raíces, como es el caso de nitrógeno que obtiene de parasitar insectos, estimula el sistema inmune de las plantas y confiere resistencia activa a los factores abióticos tales como la salinidad. La planta *Sorghum vulgare* pertenece a la familia de las gramíneas, se cultiva principalmente para la ganadería, debido a su importancia económica es ampliamente cultivado en México, siendo el tercer mayor productor del mundo y el estado de Guanajuato es el segundo productor a nivel nacional. En este trabajo monitoreamos *in situ* las interacciones en la raíz mediante una cinética entre *Sorghum vulgare* y *Metarhizium* etiquetado con el gen mCherry, crecidos en condiciones *in vitro* mediante microscopía de fluorescencia.

Abstract

The fungus *Metarhizium* is a entomopathogen which can interact with plants, colonizing the roots in mycorrhizal and endophytic way, carrying out a symbiosis with plants which stimulates root growth, translocate nutrients to the roots as is the case of nitrogen which obtains from the insect parasitized, stimulate the immune system of plants and active resistance to abiotic factors such as salinity. The *Sorghum vulgare* plant belongs to the grass family, is grown primarily for livestock use, due to its economic importance is widely grown in Mexico, being the third largest producer in the world and the state of Guanajuato is the second producer nationally. We monitored *in situ* root interactions using one line time between *Sorghum vulgare* and cherry-tagged *Metarhizium* strain grown in *in vitro* conditions by fluorescence microscopy.

Palabras Clave

Sorghum, *Metarhizium*, Micorriza y Fluorescencia

INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Metarhizium* son patógenos de más de 200 especies de insectos, pero inocuos para el hombre, animales y plantas, tiene una distribución mundial desde el Ártico hasta los Trópicos y coloniza una impresionante gama de ambientes incluyendo bosques, sabanas, pantanos, zonas costeras y desiertos [1].

Recientemente el impacto ecológico del género *Metarhizium*, y su potencial como agente biológico ha sido reforzado con los reportes que describen que el hongo *Metarhizium spp.* realiza más funciones en el ambiente con aplicaciones biotecnológicas, entre las cuales destacan su interacción con las plantas, colonizando las raíces de las plantas de manera micorrízica y endofítica, llevando a cabo una simbiosis con las plantas lo que estimula el crecimiento de las raíces [2], que transfiere nutrientes del suelo a las raíces como es el caso del nitrógeno el cual obtiene de los insectos que parasita [3], que activa el sistema inmune de las plantas y que activa la resistencia a factores abióticos como salinidad [2,3,6].

La planta *Sorghum vulgare* (nombre común: sorgo) pertenece a la familia de las gramíneas la cual produce el grano de sorgo, el cual es el grano a nivel industrial más comercializado en el mundo, México es el tercer productor mundial [4] y el estado de Guanajuato el segundo productor a nivel nacional [5], por otra parte es importante mencionar que México es el primer importador de sorgo a nivel mundial. Este grano es la principal fuente de alimento para el uso pecuario, fuente de alcohol, butanol y acetona [4]. Lo que lo convierte en una importante materia prima para la industria mexicana.

La utilización de microorganismos benéficos de cultivos es una opción para disminuir el uso de compuestos químicos y/o utilizarlos para la producción de cultivos orgánicos [7]. Su utilización no solo es un beneficio para el medio ambiente, sino que para el productor también, ya que utiliza menos compuestos químicos y a su vez el mercado de cultivos orgánicos está a la alza en la demanda a nivel internacional como nacional, lo que genera que los precios de estos productos sean mayores y por ende el productor tiene una mayor ganancia [7].

Previamente nosotros reportamos que la interacción entre la planta *Sorghum vulgare* y el hongo *Metarhizium* en condiciones *in vitro* y utilizando tierra de uso agrícola, favorece el crecimiento de la planta, observando un mayor crecimiento de la raíz, mayor desarrollo de raíces secundarias, incremento en el tamaño y densidad de pelos radiculares y mayor follaje, en comparación con las plantas que no estuvieron en contacto con el hongo [10].

Por lo anterior con la finalidad de conocer el nivel de asociación de *Metarhizium* con las raíces de las plantas de sorgo, realizamos en el presente trabajo microscopia de fluorescencia, utilizando una cepa de *Metarhizium* etiquetada con la proteína fluorescente mCherry, lo que nos permitirá conocer el nivel de asociación con la raíz de la planta de sorgo en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa utilizada de *Metarhizium*

Se utilizó la cepa de *Metarhizium brunneum* C19-mCherry, que expresa la proteína fluorescente mCherry bajo el promotor fuerte constitutivo *gpdA*. Proveniente del laboratorio de Genética Molecular de Hongos del Departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato.

La cepa C19-mCherry fue crecida en medio mínimo sólido a 28°C por 8 días. Las conidias fueron recolectadas del agar con Tritón al 0.01% para posteriormente ajustar la concentración a 1×10^6 conidias/ml.

Crecimiento y variedad de planta.

Se utilizaron las semillas de *Sorghum vulgare* variedad CB-115, las cuales fueron esterilizadas con gas cloro por 24 horas, para almacenarlas de manera estéril. Posterior a esto las semillas se germinaron en agar Murashige & Skoog con vitaminas, esto con la finalidad de obtener plántulas, lo cual se realizó incubando durante 120 horas a 28°C con fotoperiodos luz-obscuridad de 12 horas.

Asociación *Sorghum vulgare*-*Metarhizium*

Para evaluar el grado de asociación se utilizaron las plántulas de *Sorghum vulgare* obtenidas, de las

cuales se sumergió la raíz en una solución de 1×10^6 conidias/ml de la cepa C19-mCherry de *Metarhizium* durante 20 segundos, para inmediatamente colocarlas en cajas petri con medio sólido Murashige & Skoog con vitaminas, se colocaron 5 plántulas tratadas por caja petri.

Microscopia de fluorescencia y campo claro.

Se monitoreo la asociación, crecimiento y localización de *Metarhizium* en la plántula, a las 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Empleando dos microscopios: microscopio Nikon OPTIPHOT-2 equipado con iluminación fluorescente y el programa SPOT Advanced software versión 4.6; y, el microscopio estereoscópico Zeiss AX10 Zoom.V16 con iluminación fluorescente y el programa Zen Pro 2012 para la localización del hongo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha descrito para *Metarhizium* que este es capaz de colonizar raíces de plantas de importancia económica como lo es el frijol, maíz, soya y pasto de forraje [2]. La rizósfera es relativamente rica en nutrientes ya que alrededor de un 40% de los productos de la fotosíntesis de las plantas se puede perder por las raíces. [8]

Las raíces de las plantas de sorgo con interacción de *Metarhizium* fueron observadas microscópicamente como se observa en la Imagen 1, 2, 3. Una vez inoculadas las raíces de sorgo con conidias de *Metarhizium* se puede observar a las 4 horas que estas se encuentran adheridas a la raíz de sorgo (Imagen 1), se ha descrito que *Metarhizium* cuenta con proteínas de adherencia específicas para planta como lo es la proteína MAD2 [9]. Posterior a la adhesión de las conidias estas comenzaron a germinar a las 8 horas (fotos no mostradas), esto posiblemente debido inducción por los nutrientes secretados en los exudados de la planta.

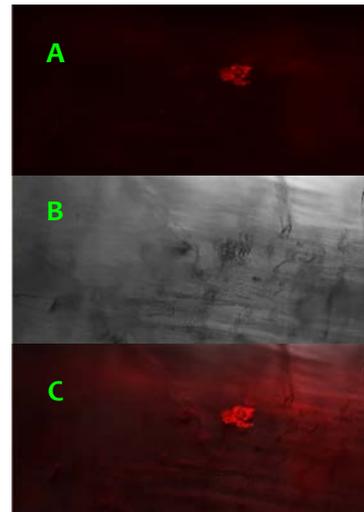


Imagen 1: 4 horas de interacción de *Metarhizium* en la raíz de *Sorghum vulgare* (A. Fluorescencia 20X) (B. Campo claro 20X) (C. sobreposición de las imágenes A y B) Se observa conidias adheridos a la raíz de sorgo.

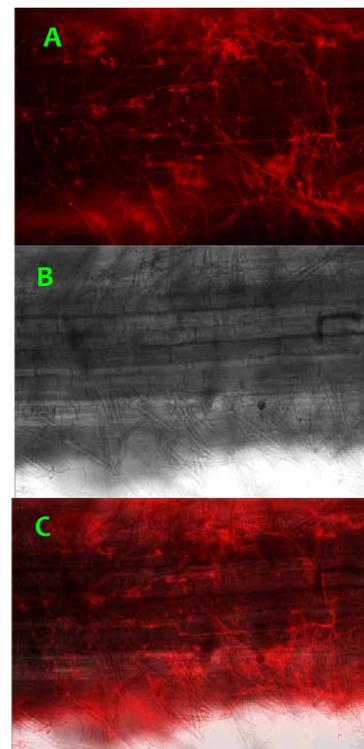


Imagen 2: 48 horas de interacción de *Metarhizium* en la raíz de *Sorghum vulgare* (A. Fluorescencia 20X) (B. Campo claro 20X) (C. Sobreposición de las imágenes A y B) Se observa la colonización de la raíz por parte de las hifas del hongo.

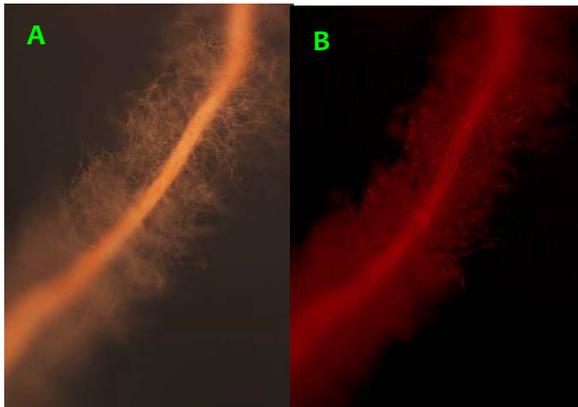


Imagen 3. 72 horas de interacción de *Metarhizium* en la raíz de *Sorghum vulgare* (A. Campo claro 10X) (B. Fluorescencia 10X)

Posteriormente se siguieron examinando secciones longitudinales de las raíces de las plantas en interacción con el hongo, observando un aumento gradual de la densidad de hifas del hongo que van cubriendo y colonizando las plantas de sorgo (Imagen 2 y 3). Esto ha sido reportado previamente en las raíces de las plantas de frijol, jitomate y pasto forrajero dulce, con la finalidad por parte del hongo de establecerse en la rizosfera de las plantas, para realizar el intercambio de nutrientes y ganar el espacio en la raíz a otros microorganismos competidores [2,4].

CONCLUSIONES

Este estudio muestra que *Metarhizium* es un hongo micorrízico con la planta *Sorghum vulgare*, *Metarhizium* es un hongo con múltiples funciones ecológicas, desde la protección de las plantas de plagas hasta la promoción de crecimiento de estas. Se necesita realizar más investigación para elucidar como se lleva a cabo la comunicación coordinada entre el hongo y la planta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT), proyecto 388394 y 220780. Los autores también agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Guanajuato de los proyectos de investigación 415/2014, 641/2015, 511/2015 y de excelencia académica 005/2014. Al igual se agradece el apoyo de beca de verano de

investigación UG de la alumna Herrera Gutiérrez Luz Janeth.

REFERENCIAS

- [1]Roberts D.W., St Leger R.J. (2004). *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol* 54:1-70.
- [2]Sasan RK, Bidochka MJ. (2012) The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Am. J. Bot.* 99(1),101-107.
- [3]Sasan R.K., Bidochka M.J. (2013). Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. phaseoli. *Canadian Journal of Plant Pathology*. DOI: 10.1080/07060661.2013.823114.
- [3]Behie S.W., Zelisko P.M., Bidochka M.J. (2012). Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336(6088):1576-7.
- [4]Geotécnica, agronomía y socioeconomía del sorgo granífero en México. *Demandas del sector*. 2013(2).16-19
- [5]SIAP. *Sorghum vulgare*. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/sorgo-grano/> (23/Ago/14)
- [6]Khan A.L., Hamayun M., Khan S.A., Kang S.M., Shinwari Z.K., Kamran M., Rehman S., Kim J.G., Lee I.J. (2012). Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World J Microbiol Biotechnol* 28(4):1483-94.
- [7]Higa T. and Parr J.F. (1994). Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. *International Nature Farming Research Center, Atami, Japan*. 16 p.
- [8]Contreras C, H. A., Macias R, L., Cortes P, C. and Lopez B, J. (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus enhances biomass production and through an auxin-dependt mechanism in *Arabidopsis*. 149. 1579-1592.
- [9]Wang C., St Leger R.J. (2007). The MAD1 Adhesin of *Metarhizium anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants. *Eukaryotic cell*. p. 808–816.
- [10]Herrera Gutiérrez L. J., Padilla Guerrero I. E., Torres Guzmán J. C. (2014). Análisis de la interacción de cepas mexicanas del hongo *Metharhizium* con *Sorghum vulgare*. *Memorias del 7° verano estatal de investigación Guanajuato*.