

SEGUIMIENTO DE PEROXISOMAS DE *METARHIZIUM* EN LA INTERACCIÓN HONGO BENÉFICO-PLANTA Y/O HONGO ENTOMOPATÓGENO- INSECTO

Flores Estrada Guadalupe (1), González Hernández Gloria Angélica (2), Juan Carlos Torres Guzmán (2), Israel Padilla Guerrero (2), Karla Cervantes Quintero (2), Araceli López Andrade (2)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [floresestradag@gmail.com]

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

Resumen

El género *Metarhizium* se ha estudiado por sus diversas características, como agente entomopatógeno en el control de plagas en la agricultura; y recientemente por la simbiosis que tiene con las plantas, donde la secreción de sustancias del hongo, dentro de la rizosfera, estimulan el crecimiento y promueven su protección contra agentes patógenos. En la interacción hongo benéfico-planta, no se han descrito los peroxisomas, (organelos encargados de la desintoxicación celular) por lo que en este trabajo se enfocó en visualizar la distribución de los peroxisomas dentro de las hifas de *Metarhizium* al momento de interactuar con las sustancias secretadas por las raíces de las plantas, y del mismo modo cuando interacciona con el hongo fitopatógeno *Fusarium spp.* Para ello se utilizó una cepa transformante de *Metarhizium* cuyos peroxisomas se encuentran etiquetados con la proteína reportera GFP.

Abstract

The genus *Metarhizium* has been studied for its various characteristics, as an entomopathogenic agent in pest control in agriculture; and recently, because of the symbiosis with plants, where the secretion of substances from the fungus, within the rhizosphere, stimulate the plant growth and promote their protection against pathogens. In the beneficial interaction fungus-plant, peroxisomes have not been described, (organelles in charge of cell detoxification) so in this work we focused on visualizing the distribution of the peroxisomes within the hyphae of *Metarhizium* at the time of Interaction with the substances secreted by the roots of plants; and in the same way when interacts with the fungus *Fusarium spp.* To this, a strain of *Metarhizium* was used, whose peroxisomes were labeled with the protein GFP reporter.

Palabras clave

Metarhizium; *Fusarium*; peroxisomas; rizosfera.

INTRODUCCIÓN

Las raíces de muchas especies de malezas y cultivos contribuyen con productos químicos biológicamente activos en el medio ambiente, conocidos como exudados de las raíces. Se sabe que los exudados de las raíces influyen en el crecimiento y el establecimiento de las especies de cultivos y malezas, estos se liberan de los sistemas de raíces vivas [1]. La exudación de raíz incluye la secreción de iones, oxígeno libre y agua, enzimas, mucílagos y una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios que contienen carbono [2].

Asociación hongo-planta dentro de la rizosfera

La rizosfera es una zona estrecha de suelo sujeta a la influencia de las raíces vivas, donde los exudados de las raíces estimulan o inhiben las poblaciones microbianas y sus actividades. La cantidad y composición de exudados de raíz que ingresan al suelo depende de la especie de la planta, la edad de la planta y el estado de los nutrientes [3]. Las interacciones de la rizosfera mediadas por la raíz se clasifican como positivas o negativas para la planta (Fig. 1). Las asociaciones micorrízicas entre los hongos y las raíces son claramente positivas, siendo esenciales para la supervivencia de ambos. Mientras que el hongo obtiene carbohidratos como la glucosa y la sacarosa (productos finales de la fotosíntesis), la planta se beneficia del aumento en la absorción de agua y nutrientes, incluyendo nitrógeno y fósforo [4]. Se ha descubierto recientemente que las especies de *Metarhizium* se asocian a la planta dentro de la rizosfera. Debido a su abundancia, *Metarhizium* podría tener un enorme impacto ambiental, con implicaciones co-evolutivas [5].

Peroxisomas

Los peroxisomas son orgánulos que contienen varias enzimas, incluidas las que contribuyen a la β -oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de lípidos y la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno a través de la catalasa [6]. Una característica de los peroxisomas es su capacidad de proliferar y multiplicarse, o ser degradados en respuesta a estímulos nutricionales o ambiente extracelular [7].

Fusarium spp

Fusarium es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica y que a la vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance [8]. Tiene una larga historia aparente de reproducción asexual predominante, tal vez exclusiva, invade las raíces y puede causar enfermedades de marchitez a través de la colonización del tejido del xilema [9]. Estudios recientes han demostrado que *Metarhizium* spp. con virulencia frente a insectos plaga, presenta antagonismo contra patógenos de plantas como *Fusarium* spp. [10].

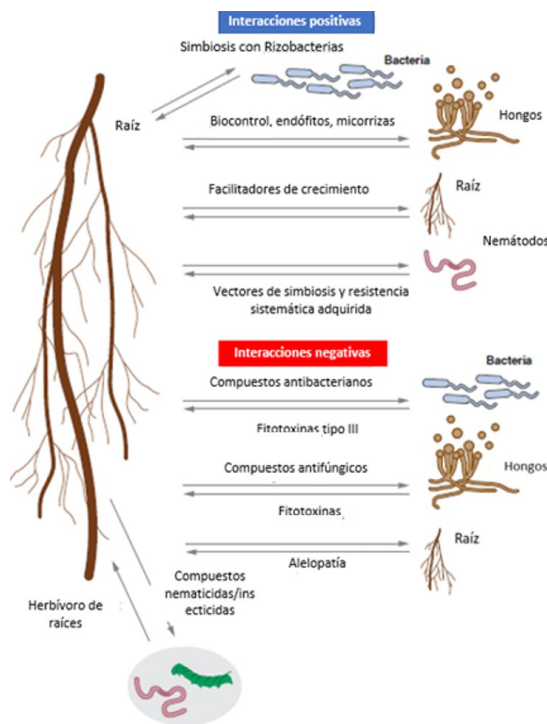


Figura 1. Interacciones rizosféricas mediadas por los exudados de raíz (tomada y modificada de: Bais et al, 2006).

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Debido a la importancia y funciones de los peroxisomas, se puede pensar que éstos están implicados en la interacción de *Metarhizium* con las raíces de las plantas y/o otros hongos incluyendo fitopatógenos, por lo que en este trabajo se utilizó una cepa de *Metarhizium* cuyos peroxisomas están etiquetados con la proteína GFP para observar si existe algún cambio en la distribución o en la cantidad de peroxisomas al momento de la interacción con el exudado de raíz y el hongo fitopatógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Conidios frescos de *Metarhizium brunneum* GFP se obtuvieron al crecer el hongo en medio M100, las placas se incubaron a 28 °C por 7 días hasta obtener la conidiación completa, los conidios se recolectaron con Tritón X-100 al 0.1 %, se cuantificaron y conservaron a 4 °C.

Las raíces utilizadas fueron obtenidas al germinar semillas de sorgo (*Sorghum vulgare*). Las semillas de sorgo se esterilizaron mediante tratamiento con hipoclorito de sodio, y lavados abundantes con agua destilada estéril. Las semillas estériles se guardaron a 4 °C por una noche para sincronización.

Para obtener conidios frescos de *Fusarium* se inocularon una solución de conidios de *Fusarium* spp. en medio líquido de papa y dextrosa (PD) y se incubaron a 180 rpm por 72 h a 28 °C. Posteriormente los conidios fueron obtenidos por filtración y conservados a 4 °C.

Obtención del exudado de raíz

Se prepararon cajas de Petri con un papel filtro estéril y dentro se colocaron las semillas de sorgo. Se humedeció el papel con agua estéril y se incubaron a 28 °C. El papel se mantuvo húmedo durante todo el experimento. Una vez germinadas las semillas, se incubaron 4 días más. En seguida, en esterilidad, se colectó el líquido de la placa en un tubo estéril. Se bañó el papel con 5 mL de agua y se selló la placa, se agitó 20 min y se recuperó el líquido. Este proceso se repitió una vez más para reunir el exudado de la placa en un solo tubo y conservar a -70 °C para su uso posterior.

Interacción hongo-exudado de raíz

En placas de medio M100, se inocularon conidios frescos de *Metarhizium*-GFP y se incubaron a 28 °C. Se agregaron 5 mL de exudado de raíz por placa, se selló y se agitó a 30 rpm por 3 h. Se retiró el exudado y se prepararon las muestras de micelio para observar en el microscopio de fluorescencia.

Interacción hongo benéfico-hongo fitopatógeno

Placas de medio PDA se inocularon con 20 µL de una solución conidios de *Metarhizium* y en dirección opuesta se inoculó a *Fusarium*. Las placas se incubaron a 28 °C por 16 días. Se tomó muestra de *Metarhizium* y de *Fusarium* en la zona de interacción para observar por microscopía de fluorescencia.

Microscopía

La microscopía de fluorescencia se realizó en un microscopio Nikon OPTIPHOT-2 y el programa SPOT Advanced software versión 4.6. También se utilizó el estereomicroscopio Carl ZEISS Axio Zoom.V16 y el programa Zen Pro 2012.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como menciona Salceda Sacanelles [7], “una característica de los peroxisomas es su capacidad de proliferar y multiplicarse, o ser degradados en respuesta a estímulos nutricionales o ambiente extracelular”, debido a esto es de nuestro interés observar el efecto que tienen las interacciones de *Metarhizium* con los exudados de raíz y hongos fitopatógenos, en su distribución y cantidad de peroxisomas. En este trabajo se utilizó la microscopía de fluorescencia para determinar de manera cualitativa los cambios en los peroxisomas después de la interacción.

En la Figura 2e, se muestran hifas de la cepa de *Metarhizium* GFP y se observan los peroxisomas en las hifas sin estar expuestos a interacciones. En las Figuras 2a y 2b se observa como a pesar de que *Fusarium* crece mas rápido que *Metarhizium* ocupando dos tercios de la superficie nunca llega a tocar a éste último. Al comparar la fluorescencia de las hifas de *Metarhizium* en el área de interacción con el fitopatógeno (Figuras 2c y 2d), se observa un punteado mucho mas pequeño que el observado en la misma cepa de *Metarhizium* creciendo libre del fitopatógeno (Fig. 2e).

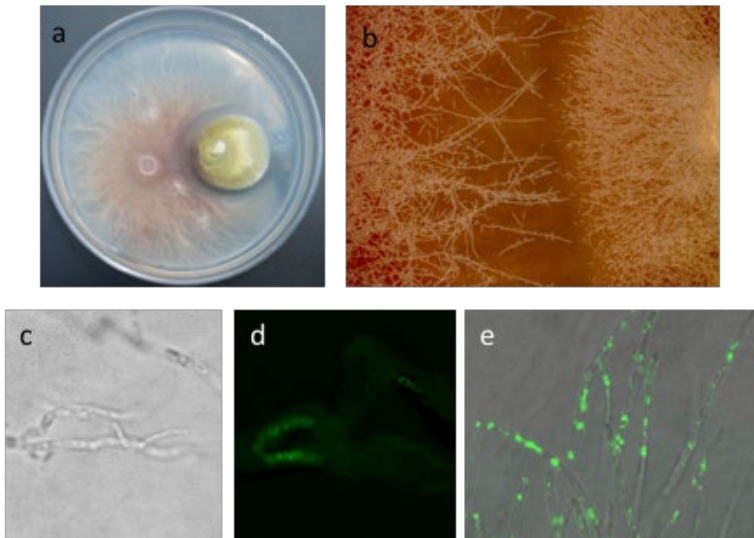


Figura 2. Interacción de *Metarhizium* con el fitopatógeno *Fusarium* spp. a, Enfrentamiento de *Metarhizium* y *Fusarium* en medio PDA; b, acercamiento del área de interacción; c, campo claro de hifas de *Metarhizium* del área de interacción; d, epifluorescencia; y e, empalme de campo claro y microscopía de fluorescencia de hifas de *Metarhizium* crecidas en ausencia de hongos o de algún otro reto.

Por otra parte en la interacción de *Metarhizium* con el exudado de las raíces de sorgo, al observar las hifas al microscopio de epifluorescencia (Figura 3) los cúmulos de fluorescencia son mucho mayores, al contrario de lo observado en la interacción del hongo benéfico con el hongo fitopatógeno (ver figura 2d), incluso comparando con el hongo crecido en ausencia de interacción (ver Figura 2e).

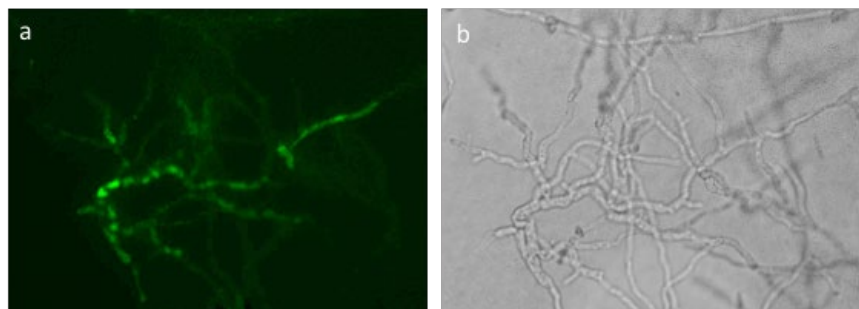


Figura 3. Interacción de *Metarhizium* con exudados de raíces de *Sorghum vulgare*.

La distribución de la fluorescencia difiere entre ambos retos, viéndose fragmentada cuando se enfrenta al fitopatógeno, en contraste cuando se enfrenta al exudado de las raíces de la planta de sorgo, donde se ve un incremento de las manchas de fluorescencia. Aun cuando no conocemos la causa ni el impacto de esta diferencia en la distribución y organización de los peroxisomas en relación con el comportamiento del hongo en la actividad de protección de las plantas, estos resultados sugieren que pueden ser un factor importante en el papel que desempeña *Metarhizium* en el ambiente.

CONCLUSIONES

Gracias a que se contaba con la cepa de *Metarhizium* con peroxisomas etiquetados con la proteína GFP, previamente construida en el laboratorio (Cerde de Loera y Gaytan Esparza 2018) fue posible observar la distribución de los peroxisomas de *Metarhizium* al enfrentarlo a dos retos: al hongo fitopatógeno *Fusarium* spp, o a la planta de sorgo. La distribución y tamaño de estos organelos es diferente si el hongo benéfico *Metarhizium* interacciona con una planta a la cual le ayuda a mejorar su germinación y crecimiento (*Sorghum vulgare*) que cuando se enfrenta a un hongo fitopatógeno (*Fusarium*) de la misma planta a la que es capaz de proteger.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la beca Veranos UG 2018 otorgada por la dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato a Guadalupe Flores Estrada.

Se agradece al MC Ivan Horacio Piña Torres el asesoramiento en el microscopio estereoscópico.

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del CONACYT, proyecto específico 220780.

REFERENCIAS

- [1] Inderjit & Weston, L.A. (2003) Root Exudates: an Overview. In: de Kroon H., Visser E.J.W. (eds) Root Ecology. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), Springer, Berlin, Heidelberg, vol 168, 235-255.
- [2] Bais, H.P., Weir, T. L., Perry, L.G., Gilroy, S. & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- [3] St. Leger, R. J. (2008). Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 271–276. doi: 10.1016/j.jip.2008.01.007
- [4] Pava-Ripoll, M., Angelini, C., Fang, W., Wang, F., Posada, F.J. & St Leger, R. (2011). The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. *Microbiology*, 157, 47–55. doi:10.1099/mic.0.042200-0
- [5] Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W. & St Leger, R. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 7089–7096. doi: 10.1007/s00253-014-5788-2
- [6] Smith, J.J. & Aitchison. (2013). Peroxisomes take shape. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 14, 803-817. doi: 10.1038/nrm3700
- [7] Salceda Sacanelles, R. (2008). Peroxisomas: organelos polifacéticos. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(3), 85-92.
- [8] Retana, K., Ramírez-Coché, J.A., Castro, O. & Blanco-Meneses, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. Sp. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115-126. ISSN:0377-9424 / 2018
- [9] Michielse, C.B. & Rep, M. (2009). *Molecular Plant Pathology*, 10 (3) , 311–324. doi: 10.1111/J.1364-3703.2009.00538.X
- [10] Yun, H.G., KIN, D.J., Gwak, W.S., Shin, T.Y. & Woo, S.D. (2017). *Mycobiology*, 45(3), 192-198. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.3.192>