

Implementación de la Agrotransformación del hongo *Metarhizium guizhouense*.

Iván Horacio Piña-Torres^{1*}, Areli Durón-Castellanos¹, Juan Carlos Torres-Guzmán¹, Gloria Angelica González-Hernández¹, Israel Enrique Padilla-Guerrero^{1**}.

¹ Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, CP 36050, Guanajuato, Mexico.

Palabras clave: Agrotransformación, micorriza, antagonista.

Introducción. Los hongos del genero *Metarhizium* han sido ampliamente estudiados, dado su potencial como biocontrolador de insectos plaga, sin embargo, recientemente se ha reportado que el impacto ecológico del hongo *Metarhizium* es más amplio, que ser solamente un hongo entomopatógeno. Existen reportes en donde *Metarhizium* interactúa con las plantas estableciendo una relación simbiótica de una manera micorrízica y endofítica, donde se promueve el crecimiento de la planta, coloniza la raíz de las plantas, activa su sistema de defensa, transfiere nutrientes como nitrógeno proveniente de insectos y produce fitohormonas tipo auxinas [1]. Dentro del genero una especie poco conocida es *Metarhizium guizhouense*, la cual es la especie con mayor número de genes y cluster de producción de metabolitos secundarios [2]. Se tienen pocos reportes de esta especie, dentro del grupo de trabajo Davila-Berumen [3], aisló una cepa de *M. guizhouense*, la cual promueve el crecimiento vegetal del sorgo, además es antagonista del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* var. *Lycopersicum*. En condiciones de invernadero esta cepa protegió las raíces del sorgo y del jitomate de la infección. Por lo anterior es importante el estudio de los mecanismos moleculares del hongo *Metarhizium guizhouense* en sus diferentes interacciones y el primer paso para estudiar estos mecanismos es el implementar métodos de transformación genética para su manipulación e identificar aquellos genes involucrados en las asociaciones ecológicas de dicho hongo.

Metodología. Se determinó la concentración letal de los antibióticos de selección; glufozinato de amonio (PPT), Nourseotricina (NTC) e higromicina (HYG) en *M. guizhouense*. Se realizó la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con los vectores binarios pPK2-BAR-mCherry y pPK2-BAR-eGFP para la resistencia a glufozinato y pPK2-NTC-eGFP para la resistencia a Nourseotricina (figura 1 [1]) y se determinó la eficiencia de la transformación como se reporta [1]. Mediante microscopia con focal se observaron los conidios y micelio de transformantes de *M. guizhouense*, expresando la proteína eGFP y mCherry

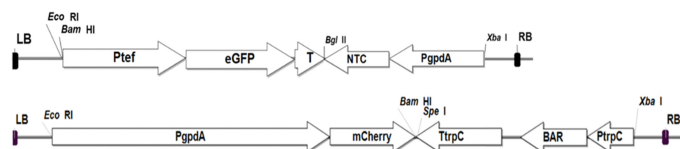


Fig. 1. Mapa del T-DNA de los vectores de transformación. A) T-DNA en el vector pPK2-NTC-eGFP para la resistencia a nourseotricina usando fluorescencia verde para selección visual. B) T-DNA en el vector pPK2-BAR-mCherry para la resistencia a nourseotricina usando fluorescencia roja para selección visual.

Resultados.

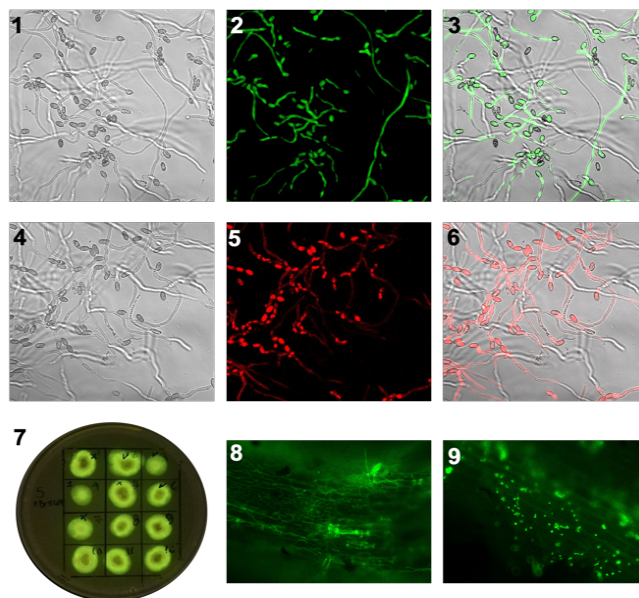


Fig. 2. Imágenes de microscopia confocal de los transformantes.

1 y 4; imágenes de microscopia en campo claro de las conidios y el micelio. 2 y 5; *M. guizhouense* expresando la proteína verde fluorescente y cherry fluorescente respectivamente. 7; colonias de *M. guizhouense* eGFP en medio M100 observadas en transiluminador UV. 8 y 9; Raíz de *Shorgum vulgare* colonizada por *M. guizhouense* eGFP.

Conclusiones. Se obtuvieron las transformantes del hongo *Metarhizium guizhouense*, expresando las proteínas verde y mCherry, lo que indica la correcta integración de la construcción. El establecimiento de un sistema de transformación eficiente nos permite la manipulación genética para evaluar el estilo vida multifacético de *Metarhizium*, en interacción con las plantas, insectos u otros hongos.

Agradecimientos. A la Convocatoria Institucional de Investigación Científica 98/2018 de la Universidad de Guanajuato. Al soporte financiero del CONACYT PDCPN2014-248622 y Proyecto de Ciencia básica 220780.

Bibliografía.

1. Padilla-Guerrero, I. E., & Bidochka, M. J. (2017). *Mycobiology*, Vol. 45(2), 84-89.
2. Hu, X. *et al.*, (2014). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 111(47), 16796-16801.
3. Davila-B. Fabiola. 2017. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato.
4. Goettel, M. S., *et al.*, (1990). *Curr. Genet.* Vol. 17(2), 129-132.

