

INTERACCIÓN DEL HONGO *Metarhizium robertsii* EN LA ASOCIACIÓN CON LA PLANTA *MEDICAGO SATIVA*

Ruiz Aguilar Isay (1), Durón Castellanos Areli (2), Piña Torres Iván Horacio (2), Torres Guzmán Juan Carlos (2), Padilla Guerrero Israel Enrique (3).

1 [Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [i.ruizaguilar@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato]

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

Resumen

El género del hongo *Metarhizium* se encuentra entre los más abundantes hongos aislados de suelos. Además se sabe que es un agente de biocontrol de plagas de insectos, y recientemente se ha asociado a la rizosfera de las plantas. En el caso de la alfalfa (*Medicago sativa*) se han descrito asociaciones simbióticas con bacterias, pero aún no se ha reportado su asociación con hongos. En trabajos previos del grupo de trabajo se ha demostrado que *Metarhizium* coloniza la raíz de *Medicago sativa*, por lo que ahora en este trabajo se busca conocer si ésta asociación tiene algún efecto sobre el crecimiento de las plantas de *M. sativa*, para lo cual se realizaron interacciones con 6 diferentes cepas del hongo en condiciones *in vitro* y de invernadero.

Abstract

The genus of the fungus *Metarhizium* is among the most abundant fungi isolated from soils. It is also known to be an agent of biocontrol of insect pests, and has recently been associated with the rhizosphere of plants. In the case of alfalfa (*Medicago sativa*) symbiotic associations with bacteria have been described, but its association with fungi has not yet been reported. In previous works we demonstrated that *Metarhizium* colonizes the root of *Medicago sativa*, so in this work we look if this association has any effect on the growth of *M. sativa* plants, for which interactions were carried experiment under *in vitro* and greenhouse conditions using 6 different strains.

Palabras Clave

Metarhizium, Alfalfa, Micorriza, Simbiosis, Agricultura.

INTRODUCCIÓN

La rizósfera es una zona del suelo directamente influenciada con secreciones de las raíces. Este es un sitio de interacciones complejas entre plantas, bacterias, hongos, protistas, nemátodos e insectos. Los hongos, en particular, pueden favorecer el crecimiento de las plantas o pueden ser fitopatógenos. El género del hongo *Metarhizium* se encuentra entre los más abundantes hongos aislados de suelos con títulos que alcanzan 10^6 conidias por gramo de suelo en pastizales. Este género ha sido conocido por décadas como agentes que controlan las plagas de insectos, pero su uso se ha expandido desde el concepto simple de biocontrol y agentes que pueden matar las plagas de insectos a su más recientemente papel establecido como asociado de la rizósfera de la planta [1]. Se ha descubierto recientemente que especies de *Metarhizium* se asocian a plantas en la rizósfera y además son patógenos de insectos. *Metarhizium* debido a su abundancia en la rizósfera podría tener un enorme impacto en el desarrollo con implicaciones co-evolutivas [1].

Entre las plantas con las que podría establecer *Metarhizium* una asociación se encuentra la Alfalfa, cuyo nombre científico es *Medicago sativa*, y es una especie de planta herbácea perteneciente a la familia de las fabáceas o Leguminosae, y es considerada la principal especie forrajera que se cultiva en el mundo, en México, el área que se cultiva es alrededor de 338,000 ha con rendimiento promedio nacional de 75.6 t de forraje verde por hectárea por año [2] [3].

Dentro del grupo de trabajo se ha demostrado que los hongos del género *Metarhizium* estimulan el crecimiento de la planta *Medicago sativa*, la cual pertenece a la familia de las fabáceas o leguminosas; para el caso de la familia de las leguminosas está ampliamente descrito que éstas se asocian simbióticamente a bacterias fijadoras de nitrógeno formando nódulos en sus raíces, pero no hay nada descrito respecto al tipo de asociación que forman con hongos de la especie *Metarhizium robertsii* [3].

MATERIALES Y MÉTODOS

- Esterilización de semillas: se utilizaron semillas de *Medicago sativa* (variedad San Miguelito), las cuales fueron esterilizadas con ácido fosfórico en agitación con vórtex durante cinco minutos, posteriormente se realizaron ocho lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar en esterilidad para su posterior uso.
- Esterilización peat moss: se esterilizó la tierra tres veces junto con vermiculita.
- Medio de cultivo para la interacción *in vitro*: se utilizó medio agar agua, se esterilizó y se vació en cajas Petri estériles, se almacenaron a 4 °C, para su posterior uso.
- Preparación de medios para condición semi controlado (invernadero): se mezcló el peat moss estéril con la vermiculita y substrato peat moss, se puso a una relación 1:3 respectivamente.
- Cepas de *Metarhizium*: se trabajó con seis cepas diferentes de *M. robertsii* en condiciones *in vitro* y semi-controladas, las cuales fueron CU3, AT25, PCP2, AT1-1, ECLC2, CU2-4.
- Interacción *in vitro*: Para las interacción *in vitro* se utilizaron semillas de *Medicago sativa* previamente estériles y se sincronizaron poniéndolas en agua estéril a 4 °C durante una noche, éstas semillas se pusieron dentro de cajas Petri las cuales contenían medio agar-agua, dentro de la caja Petri se colocaron 10 semillas acomodadas en línea y a una distancia de 2 cm de las semillas se inoculó una concentración de 1×10^7 conidias de cada una de las cepas del hongo, estos experimentos se incubaron durante 15 días a 26°C, en fotoperiodo 16h luz / 8h oscuridad. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa y el control.
- Interacción en condiciones semi controladas (invernadero): en una charola de unicel para germinación se colocó el sustrato previamente esterilizado y se sembró una semilla estéril a 0.5 cm de profundidad, posteriormente se inocularon 1×10^8 conidias de las cepas de *Metarhizium* utilizadas. Se utilizaron 14 semillas por cepa y el control. La charola se colocó dentro del invernadero, se regó y se mantuvo en condición semi-controlada durante 15 días.

- Determinación de la promoción de crecimiento de *Medicago sativa*: se determinó el peso seco de cada plántula. Todos los datos fueron analizados mediante el programa estadístico Prism 6, con un valor de $\alpha=0.05$.
- Interacción hongo-planta con cepas de *Metarhizium* fluorescentes: se preparó una solución a una concentración de 1×10^7 conidias de la cepa PCP2 que expresa la proteína fluorescente mCherry, se sumergió la raíz alfa durante 10 segundos, pasado este tiempo se colocó en medio fresco agar-agua y se incubó durante 48 hrs. A 26°C , en fotoperiodo 16h luz / 8h oscuridad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interacción *in vitro*

Se observó la interacción hongo-planta en un estereoscopio Zeiss AX10 zoom V16 donde se puede ver una clara interacción y colonización de la raíz de la planta por las cepas de *Metarhizium robertsii* (Figura 1).

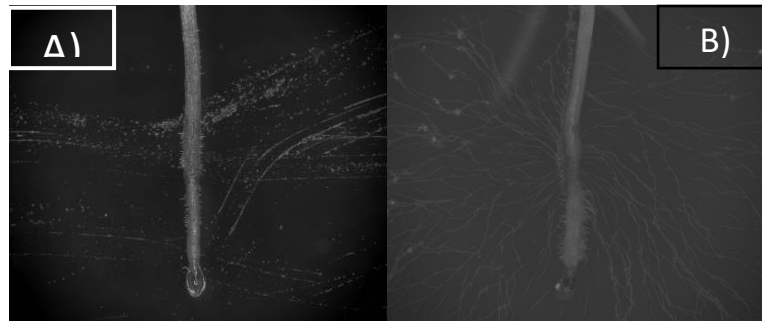


Figura 1: Interacción *in vitro* de *Medicago sativa* A) plántula sin hongo B) plántula con interacción con la cepa AT1-1 de *Metarhizium robertsii*. Con un zoom 70x en estereoscopio Zeiss AX10

Interacción en condiciones semi-controladas

En estas condiciones se utilizó una charola de unicel con tierra y se llevó a cabo la interacción directa hongo-planta durante 15 días en el invernadero, pasado el tiempo de incubación, se extrajeron las plántulas para determinar el peso seco de cada planta individualmente. A los datos obtenidos se les realizó un análisis estadístico con el programa Prism 6, se realizó una prueba ANOVA de una vía en la cual se compararon los tratamientos contra el control, el resultado de esta prueba da un valor de $p=0.3588$, lo cual nos indica que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con el hongo y el control ya que para esto, el valor debería ser menor $p=0.05$ (Figura 2).

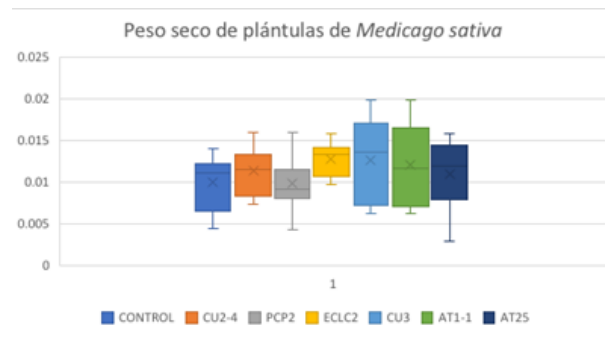


Figura 2: Grafica de cajas y bigotes. Peso seco de las plántulas de *Medicago sativa* con los diferentes tratamientos en condiciones semi-controladas.

Interacción hongo-planta con una cepa reportera de Metarhizium.

Para poder corroborar el tipo de colonización que lleva a cabo el hongo con la raíz se realizó la interacción con la cepa PCP2-mCherry la cual expresa una proteína fluorescente (mCherry), se realizó un corte transversal de la raíz y se observó en un microscopio Nikon de fluorescencia. En el campo de fluorescencia podemos observar conidias e hifas del hongo dando inicio a la colonización de la raíz alfa, el campo claro nos permite observar la raíz y al empalmar ambos campos se observa en qué zona el hongo coloniza la raíz (Figura 3).

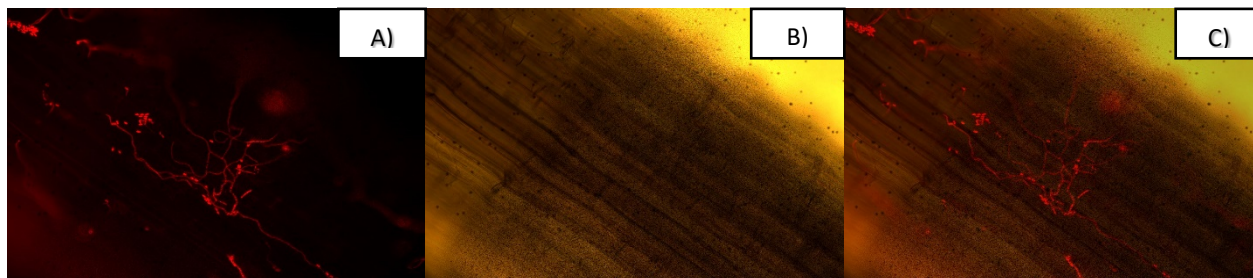


Figura 3: Interacción *in vitro* de *Medicago sativa* con cepa PCP2 expresando mCherry A) Raíz de plántula con fluorescencia B) Raíz de plántula en campo claro C) Empalme de ambos campos. En microscopio Nikon de fluorescencia.

CONCLUSIONES

Por las pruebas llevadas a cabo podemos concluir que existe una clara asociación hongo-planta ya que podemos observar la colonización por parte del hongo en la raíz, esta colonización es de tipo ecto-micorriza; respecto a la promoción del crecimiento, el análisis de peso seco no muestra una diferencia significativa con el control, por lo que una de las perspectivas del trabajo sería cambiar los parámetros del experimento, tales como el tiempo de interacción y el tipo de sustrato utilizado, esto con la finalidad de validar o refutar nuestros resultados.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a los Veranos UG por la oportunidad que dan de aprender y practicar mis conocimientos y poderlos reforzar con este proyecto, además al Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la División de Ciencias Naturales y Exactas.

REFERENCIAS

- [1] Xinggang Liao & Tammatha R. O'Brien & Weiguo Fang & Raymond J. St. Leger (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. Springer, Appl Microbiol Biotechnol (2014) 98:7089–7096.
- [2] www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/21893_sg7.pdf 23/07/2018
- [3] Andrea Patricia Lugo Pérez, Iván Horacio Piña Torres, Gloria Angélica González Hernández, Israel Enrique Padilla Guerrero (2017) LOCALIZACIÓN DEL HONGO *Metarhizium* EN SU ASOCIACIÓN CON LA PLANTA *Medicago sativa*. Vol. 3, Núm. 2 (2017): Verano de Investigación Científica.