

LOCALIZACIÓN DEL HONGO *Metarhizium* EN SU ASOCIACIÓN CON LA PLANTA *Medicago sativa*.

Lugo Pérez Andrea Patricia (1), Piña Torres Iván Horacio (2), González Hernández Gloria
Angélica (2), Padilla Guerrero Israel Enrique (2).

¹[Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [andysp93@hotmail.com]

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

Resumen

Desde el momento de la germinación hasta su senescencia todas las estructuras de las plantas son colonizadas por distintos microorganismos como hongos, bacterias o nematodos. Los hongos del género *Metarhizium* son entomopatógenos, pueden interactuar con las plantas colonizando las raíces e intercambiar de nutrientes. La planta *Medicago sativa* es considerada la principal especie forrajera que se cultiva en el mundo y en México. En el presente trabajo se realizaron interacciones en condiciones *in vitro* para determinar el nivel de asociación entre la planta *Medicago sativa* y el hongo *Metarhizium* utilizando una cepa de *Metarhizium brunneum* etiquetada con la proteína fluorescente mCherry.

Abstract

From germination to senescence all plant structures are colonized by different microorganisms such as fungi, bacteria or nematodes. The genus *Metarhizium* are entomopathogenic fungi, which can colonize the plant roots and establishing an exchange of nutrients. *Medicago sativa* plant is considered the main forage species cultivated in the world and in Mexico. In the present work *in vitro* interactions were performed to determine the level of association between the *M. sativa* plant and the fungus *Metarhizium* using a *M. brunneum* strain labeled with the mCherry fluorescent protein.

Palabras Clave

Interacción; *Metarhizium*; *Medicago sativa*; Fluorescencia; Micorriza.

INTRODUCCIÓN

Las interacciones bióticas son aquellas relaciones que se establecen entre al menos dos organismos de una o más especies de las cuales se puede obtener un beneficio, ser perjudicados o simplemente no ser afectados [1]. La mayoría de las plantas forman simbiosis con los hongos del suelo y estas interacciones han evolucionado a lo largo de 400 millones de años [2]. La asociación establecida entre las raíces de las plantas y algunos grupos de hongos es conocida como micorriza y es una de las simbiosis más exitosas de la naturaleza [1].

Por ejemplo, en el caso de los hongos del género *Metarhizium* estos son capaces de establecer asociaciones con las raíces de las plantas para establecer un intercambio de nutrientes, en donde la planta recibe nutrientes limitantes del suelo por parte del hongo y este a su vez recibe de la planta algunas moléculas con carbono [3]. Una característica del hongo *Metarhizium* es que es un hongo entomopatógeno, el cual es capaz de transferir el nitrógeno obtenido directamente de los insectos que infectan hacia las plantas [4] [5] [6].

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 [7].

En este trabajo con la finalidad de conocer el nivel de asociación del hongo *M. brunneum* con las raíces de la planta de *M. sativa*, se utilizó microscopía de fluorescencia, utilizando la cepa CARO19 etiquetada con la proteína fluorescente mCherry, lo cual nos permitió identificar el nivel de asociación en la raíz de la planta de alfalfa en condiciones *in vitro* e identificar cambios morfológicos en la raíz de *M. sativa* durante su asociación con la cepa CARO19.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Utilizadas.

El género, especie y cepa empleada en este estudio se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Cepa de *Metarhizium* utilizada en este trabajo.

Cepa	Genero y Especie	Referencia
CARO 19-mCherry	<i>Metarhizium brunneum</i>	Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato, México.

Semillas de Alfalfa.

Se empleó la variedad de *Medicago sativa* variedad San Miguelito (Semillas Berentsen®). San Miguelito es la alfalfa criolla más popular en centro de México. Es muy persistente en el campo y produce buenos rendimientos de forraje de excelente calidad nutritiva.

Obtención de Conidias.

Los aislados de *Metarhizium* a utilizar en los experimentos se crecieron en medio M-100 a 28°C de 7-10 días. Para coleccionar las conidias se utilizó una solución de Tritón X-100 al 0.1% (Sigma-Aldrich®) se tomaron las conidias crecidas en caja Petri con una pipeta Pasteur estéril, se filtró con malla de fibra sintética para eliminar micelio y se realizaron 3 lavados con Tritón X-100 al 0.01% y se determinó la concentración de conidios/mL mediante un hemocitómetro (Hausser Scientific®).

Interacción directa de *Metarhizium brunneum* con *Medicago sativa* (alfalfa).

Se realizaron dos tipos de interacciones para determinar el nivel de asociación de la planta *M. sativa* con la cepa CARO 19 perteneciente a la especie *M. brunneum*.

La primera interacción se realizó en cajas Petri con medido MS suplementado con sacarosa, en donde se inoculó 50 µL de una suspensión de conidios 1x10⁸ conidios/mL (de la cepa CARO 19-mCherry), realizando una línea a lo largo de la caja Petri de aproximadamente 1cm de ancho, posteriormente

fueron colocadas 10 semillas de alfalfa en línea recta sobre el hongo previamente inoculado para posteriormente observar el nivel de colonización al séptimo y catorceavo día. En la segunda asociación se utilizaron plántulas de *M. sativa* que fueron sumergidas en una solución de 1×10^8 conidios/mL de la cepa CARO19-mCherry por 30 segundos, para posteriormente colocarlas en cajas Petri con medio MS suplementado con vitaminas, en donde se colocaron 4 plántulas tratadas por caja Petri. Los tiempos de evaluación fueron de 6, 8, 12 y 48 horas.

Microscopia de fluorescencia y campo claro

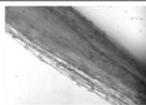
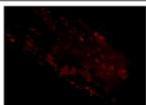
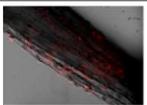
Se utilizó el microscopio Nikon OPTIPHOT-2 equipado con iluminación fluorescente y el programa SPOT Advanced software versión 4.6. El estereoscópico Zeiss AX10 Zoom.V16 con iluminación fluorescente y el programa Zen Pro 2012 para la localización del hongo en las raíces. [8]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las raíces de las plantas de alfalfa con interacción directa de *Metarhizium brunneum* fueron observadas al microscopio y estereoscopio para determinar el nivel de colonización.

Durante las 6 h y 8 h (Tabla 2) se observó la presencia de conidias en la raíz de la planta, lo cual se atribuye a los reportes de que el hongo *Metarhizium* cuanta con proteínas de adherencia específicas para colonizar de las raíces de las plantas [9].

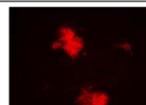
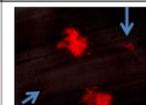
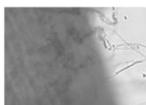
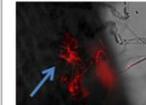
Tabla 2: Nivel de asociación del hongo *Metarhizium* con la planta *Medicago sativa* durante las primeras 6 y 8 horas.

Tiempo	Campo Claro	Fluorescencia	Colocalización
6 horas 40x			
8 horas 200x			

Posteriormente a las 12 horas se identificó la germinación de las conidias, (Tabla 3, señalado

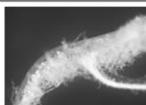
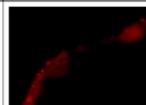
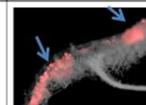
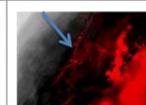
con flechas azules), estimulado por los exudados de la planta [8]. Después de 48 horas se observa que existe una mayor colonización del hongo en la planta por la evidente presencia del micelio. (Tabla 3, señalado con flechas azules).

Tabla 3: Nivel de asociación del hongo *Metarhizium* con la planta *Medicago sativa* a las 12 y 48 horas.

Tiempo	Campo Claro	Fluorescencia	Colocalización
12 horas 200x			
48 horas 200x			

Al séptimo y catorceavo día (Tabla 4), se observa una colonización a lo largo de la raíz de *M. sativa*, lo que nos indica que la cepa CARO19 de *M. brunneum* tiene la capacidad de colonizar de manera micorrizica las plantas de *M. sativa*.

Tabla 4: Nivel de asociación del hongo *Metarhizium* con la planta *Medicago* al séptimo y catorceavo día.

Tiempo	Campo Claro	Fluorescencia	Colocalización
7 días 7x			
14 días 200x			

También se observó que durante esta simbiosis la estimulación del crecimiento de las raíces secundarias y de los pelos radiculares, en comparación de las plantas control. Este tipo de estímulo en las plantas por parte de los hongos del género *Metarhizium* ha sido reportado anteriormente en las raíces de las plantas de frijol y pasto [10].

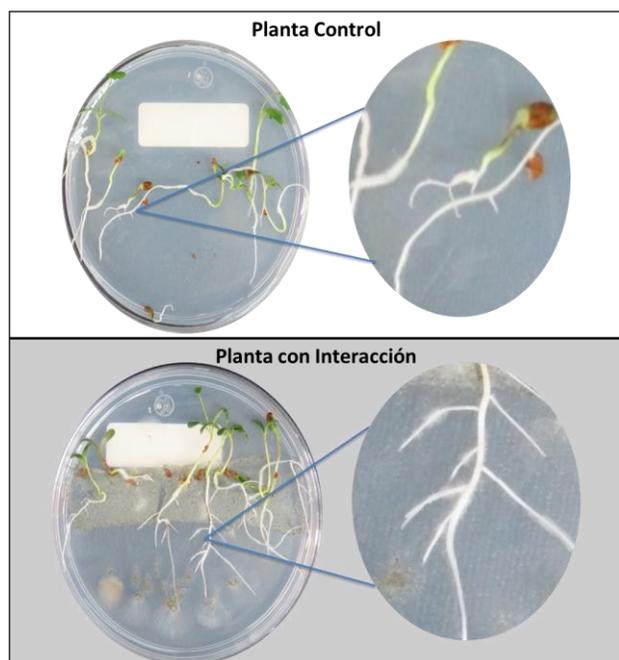


IMAGEN 1. Crecimiento de las raíces secundarias y pelos radiculares estimulados por la presencia del hongo *Metarhizium* en asociación con la planta *Medicago sativa*.

CONCLUSIONES

La cepa CARO19 de *Metarhizium brunneum* tiene la capacidad de colonizar las raíces de las plantas de *Medicago sativa*, lo cual estimula el desarrollo y crecimiento de raíces secundarias, así como de los pelos radiculares.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al programa de Veranos de la Investigación Científica de la Universidad de Guanajuato por la beca a la estudiante L. P. A. P., como al soporte financiero del CONACyT (PDCPN2014-248622) y Universidad de Guanajuato (CIFOREA 89/2016) para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

[1] Del Val, E., & Boege, K. (2012). Ecología y evolución de las interacciones bióticas, México, Fondo de Cultura Económica.

[2] Behie, S. W., Moreira, C. C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P. M., & Bidochka, M. J. (2017). Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nature communications*, 8, 14245.

[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), 1576-1577

[4] Sasan, R. K., Bidochka, M. J. Antagonismo of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2013; 35(3), 288-293.

[5] Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. M. et al. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* 2012; 17(9), 10754-10773.

[6] Roberts D.W., St Leger R.J. (2004). *Metarhizium spp.*, Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol* 54:1-m70

[7] Montemayor Trejo, J. A., Aguirre Aguiluz, H. W., Olague Ramirez, J., Román López, A., Rivera González, M., Preciado Rangel, P., ... & Yescas Coronado, P. (2010). Uso del agua en la alfalfa (*Medicago sativa*) con riego por goteo subsuperficial. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(2), 145-156.

[8] Gutierrez, L. J. H., & Guerrero, I. E. P. (2015). Localización del hongo *Metarhizium spp.* en su asociación con la planta *Sorghum vulgare*. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 1(2), 489-492.

[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] Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*, 99(1), 101-107.