

TOLERANCIA A CROMO DE PLANTAS QUE INTERACCIONAN CON HONGOS MICORRÍZICOS: SOBREVIVENCIA DE *ARABIDOPSIS THALIANA* Y *SORGHUM VULGARE*

Lapham, Casey Marie(1), González-Hernández, Gloria Angélica(2), Torres-Guzmán, Juan Carlos(2), Ramírez-Zúñiga, María del Rosario(2)

1 [Bachillerato de Estudios Ambientales, Juniata College] | [laphacm13@juniata.edu]

2 [Departamento de Biología, DCNyE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [angelicagonzalez@live.com.mx]

Resumen

Varios hongos micorrízicos tienen la habilidad absorber y reducir metales pesados y también protegen contra los metales las plantas con quienes tienen una relación simbiótica. Este experimento investiga los efectos del hongo *Beauveria bassiana* y cinco cepas del hongo *Metharizium anisopliae* en la germinación y el crecimiento de las plantas *Arabidopsis thaliana* y *Sorghum vulgare* en ambientes con el cromo. Plantas de *A. thaliana* se crecieron en cajas de Petri con y sin división, con cromo y con o sin el hongo en el extremo opuesto de la división o placa. Semillas de *S. vulgare* impregnadas con conidios del hongo se crecieron en un invernadero en tierra esterilizada. Los resultados sugieren que estas especies de hongo tienen un efecto protector por las plantas de *A. thaliana* en un ambiente con cromo, pero con la mayoría de las cepas es necesario que el hongo tenga contacto directo con la planta. También, estos hongos tienen un impacto positivo en el desarrollo de las plantas de *S. vulgare* en ambientes sin cromo, pero en la presencia de cromo tienen un impacto negativo.

Abstract

Various micorrhizal fungi are able to absorb and reduce heavy metals as well as protect plants with which they have a symbiotic relationship from the toxic effects of metals. This experiment investigates the effects of the fungus *Beauveria bassiana* and five strains of the fungus *Metharizium anisopliae* on the germination and growth of the plants *Arabidopsis thaliana* and *Sorghum vulgare* in environments contaminated with chromium. Plants of *A. thaliana* were grown in Petri dishes with and without a division, with chromium, and with conidia of a strain of fungus. Seeds of *S. vulgare* impregnated with micorrhizal fungi conidia were grown in a greenhouse in sterile soil. The results suggest that these species of fungi have a protective effect on *A. thaliana* in environments with chromium, but with the majority of the strains it is necessary for the fungus to have direct contact with the plant. Also, the fungi had a positive impact on the development of *S. vulgare* in environments without chromium, but in the presence of the metal they had a negative impact.

Palabras Clave

Cromo; *Beauveria bassiana*; *Metharizium anisopliae*

INTRODUCCIÓN

Investigaciones recientes sugieren que los hongos micorrízicos tienen una gran importancia en la salud de las plantas y que puedan protegerlas contra las toxinas ambientales. Los hongos micorrízicos, como los de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, tienen una relación mutualista con las plantas, en cual reciben fuente de carbono de éstas, y dan a las plantas acceso a algunos nutrientes inorgánicos y las protegen de la desecación y los metales tóxicos (1).

La contaminación de los suelos, el agua y el aire por los metales pesados, que son usados comúnmente en los procesos industriales, es un problema de nivel mundial. El cromo, específicamente, es un contaminante industrial común, y usualmente ocurre en el ambiente en la forma de Cr(VI), que es tóxica y soluble con alta movilidad, o Cr(III) que es menos soluble y menos móvil. Investigaciones pasadas encontraron que los hongos tienen el potencial de aumentar la resistencia de las plantas al cromo, y que pueden cambiar Cr(VI) a Cr(III) y absorber varios metales pesados. El hongo *Glomus intraradices* incrementó la habilidad de las plantas de *Helianthus annuus* (girasol) de acumular el cromo, y redujo los impactos negativos en las plantas (2). Se encontraron resultados similares con los hongos *Rhizophagus irregularis* y género *Glomus* y las plantas *Taraxacum platyepidum* (diente de león) y *Solanum lycopersicum* (jitomate) respectivamente (3,4). Se ha descrito que el hongo *Rhizophagus irregularis* reduce el Cr(VI) al Cr(III) con el uso del fósforo y posiblemente algunas sustancias extracelulares poliméricas (5). También, el hongo *Metarhizium anisopliae* ha mostrado tener una capacidad de absorción máxima de 44.22 ± 0.13 mg/g por Cd(II) y de 66.66 ± 0.28 mg/g por Pb(II) en las soluciones acuosas. *Beauveria bassiana* tiene una capacidad de absorción máxima de 46.27 ± 0.12 mg/g por Cd(II) y de 83.33 ± 0.85 mg/g por Pb(II) (6). Las habilidades de absorción y reducción que tienen los hongos les dan un gran potencial por usarlos como un biorremediador económico, representando una alternativa a los sistemas mecánicos y químicos.

El objetivo de nuestro experimento es investigar los efectos del hongo *Beauveria bassiana* 252 y

las cepas C19, E6, AR5F 2575 y C11 del hongo *Metarhizium anisopliae* en la sobrevivencia y el crecimiento de las plantas *Arabidopsis thaliana* y *Sorghum vulgare* (sorgo) en presencia de Cr(VI). En base a las investigaciones pasadas, proponemos la hipótesis de que el efecto protector de un hongo con capacidad micorrízica va a incrementar la tolerancia al cromo de ambas especies de planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos in vitro con *Arabidopsis thaliana*

Preparación de los conidios

Para obtener una cantidad suficiente de los conidios, conidios de cada cepa se sembraron en dos cajas de medio M-100. Se incubaron por ocho días a 28°C. Para recolectar los conidios, se cubrieron con una solución de agua destilada con 0.1% tritón y los conidios se despegaron con una espátula de vidrio. Las suspensiones de los conidios se transfirieron a tubos Corning con malla y se centrifugan por cinco minutos a 300 rpm. Para limpiar los conidios, se lavaron por centrifugación dos veces, utilizando cada vez 30 ml de una solución de agua destilada con 0.01% tritón. Se preparó una dilución de 1:100 y se contaron los conidios al microscopio en una cámara de Neubauer.

Preparación de las semillas de *A. thaliana*

Para esterilizar las semillas, se lavaron en tubos endorph con 1 ml del etanol absoluto tres veces por dos minutos cada vez. Después, se lavaron con 1 ml de una solución de tritón 0.1%, hipoclorito de sodio 20% y agua destilada por dos minutos. Finalmente, se lavaron con 1 ml de agua destilada cuatro veces, por dos minutos cada vez. Se colocaron diez semillas en cada caja de Petri sin división, y siete semillas en las cajas con división con un espacio de 0.5 cm entre cada semilla.

Inoculación de las placas con el hongo

Se inoculó cada caja de Petri con una gota de 20 μL de tritón 0.01% conteniendo 1×10^9 conidios a una distancia de 5 cm de las semillas. Se incubaron las cajas por 16 días a 26°C con periodos de luz de 18 horas y oscuridad de 6 horas. Se tomaron fotografías de las cajas en los días 8, 14 y 17 con el uso de un microscopio estereoscópico Zeiss Axio Zoom. V16 y un Gene Genius Bio Imaging System.

Las placas usadas en el experimento contenían medio MS 0.2X-Sacarosa suplementado con una solución de cromo a 20 ppm. En el experimento se usó una caja dividida y una no-dividida con los conidios de cada cepa, con o sin cromo; una caja control dividida y no dividida con el cromo y sin los hongos; y una caja control sin división, sin el cromo y sin hongo. El experimento se hizo por triplicado.

En suelo con *Sorghum vulgare*

Preparación de la tierra

Para preparar la tierra, se cernió con un colador plástico, se colocaron aproximadamente 400g en cada bolsa y se esterilizó tres veces. Posteriormente, se llenaron 12 macetas plásticas de 15x5 cm con la tierra de una bolsa en cada una, y se llenaron 12 macetas más con 2/3 de tierra. El otro tercio se pre humedeció con la agua destilada y se mezcló con 30 ml de una solución de 20 ppm de cromo en agua destilada antes de añadirlo a la maceta. Cada maceta se saturó con el agua destilada.

Preparación y siembra de las semillas de sorgo

Se esterilizaron las semillas por 24 horas en una solución de 100 ml de hipoclorito de sodio y 3.5 ml ácido clorhídrico, que reaccionó para crear gas cloro. Posteriormente, se colocaron 72 semillas en cada uno de seis tubos, y se añadió una solución de agua destilada con sacarosa. Cinco de los tubos recibieron 50 μL de una solución con 1×10^6 conidios de una de las cepas de hongo. Las semillas se secaron por 12 horas en cajas de petri, y posteriormente se sembraron 18 en cada maceta de tierra. Se regaron diariamente por 12 días con 50-100ml del agua destilada. En el día final se contó el número de las semillas que germinaron en

cada maceta y se tomaron fotografías de las macetas.

Se colocaron tres macetas en cada charola metálica. Se usaron cinco macetas de control sin cromo y con inoculación de una de las cepas y una maceta más sin hongo. En el grupo experimental, se usaron cinco macetas con el cromo y uno de los hongos, y una maceta sin hongo. El experimento se hizo por duplicado. Los controles fueron cinco macetas sin cromo, sembrando las semillas tratadas con las cepas de hongos y un control sin cromo ni hongos. En el grupo experimental, se usaron cinco macetas con cromo y semillas tratadas con el hongo, y una maceta con cromo y semillas sin hongo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos in vitro con *Arabidopsis thaliana*

En algunas placas con cromo no creció el hongo, y en otras fue menos crecimiento que el esperado del hongo y la planta. Es posible que este patrón fuera debido a un nivel demasiado alto de cromo o al agotamiento de la glucosa. Las cepas C11 y E6 crecieron en todas las cajas. La cepa C19 creció en una caja sin división y en dos con división. *B. bassiana* solo creció en una caja de ambos tipos y la AR5F 2575 no creció visiblemente en ninguna caja.

Efecto del hongo en la tolerancia de *A. thaliana* al Cromo.

En las placas de control sin cromo u hongo todas las 30 semillas germinaron y tuvieron un crecimiento avanzado. En las placas de control con cromo, 26 de las semillas germinaron. En las placas con hongo C11 tuvieron la germinación más alta, con 29 semillas germinadas. Germinaron 28 semillas en las placas de E6, *B. bassiana* y AR5F 2575. Y sólo germinaron 24 semillas en las placas con C19 (ver figura 1). Sugiriendo una pequeña protección del hongo hacia *A. thaliana* favoreciendo la germinación a pesar de la presencia de cromo.

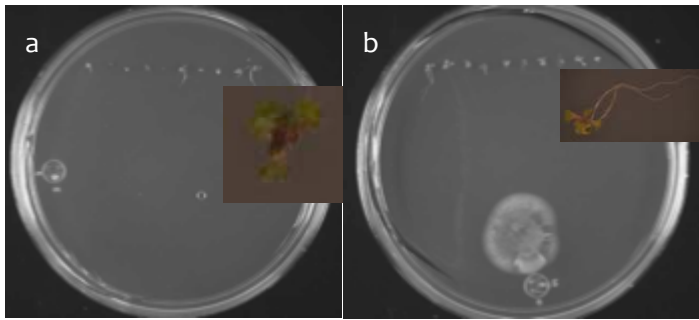


FIGURA 1. Germinación y crecimiento de *A. thaliana* en cromo. En ausencia (a) y presencia de la cepa C11 (b). En los recuadros se aprecia una ampliación de las plántulas de *A. thaliana*.

Efecto de volátiles en la tolerancia a Cromo

En las placas control con cromo, 19 de las 21 semillas germinaron. De las placas con un hongo, C19 y AR5F 2575, mostraron un número de semillas germinadas más alto, con 20 cada una. Sin embargo con *B. bassiana*, C11 y E6, sólo 17 semillas germinaron en las placas.

Estos resultados muestran que en casi todas las placas sin división la presencia de un hongo micorrízico aumentó la germinación de las plantas en ambientes con cromo. La cepa C11 tuvo el efecto más positivo en la germinación de las plantas, mientras la cepa C19 apareció reprimir la germinación en comparación con el control con cromo. En las placas divididas las cepas C19 y AR5F 2575 tuvieron un impacto positivo en la germinación de las plantas, mientras *B. bassiana*, C11 y E6 bajaron el número de semillas germinadas en comparación con el control dividido. Esto indica que C19 y AR5F 2575 pueden apoyar las plantas sin contacto directo, debido a compuestos volátiles, mientras *B. bassiana*, C11 y E6 no tienen esta habilidad o posiblemente hacen procesos que dañan las plantas sin contacto directo.

Tolerancia de *Sorghum vulgare* en suelo, al cromo.

Las semillas de sorgo tuvieron una germinación y un crecimiento limitado a causa de múltiples días nublados y frescos, y por eso el experimento continuó más de los 12 días para darles a las plantas una oportunidad de madurar. A pesar de esto, los datos coleccionados en el día 12

muestran algunos patrones significativos en el crecimiento de las plantas. En el ensayo control sin cromo y sin el hongo solo 13 de las 36 semillas de sorgo germinaron. Con las cepas C11 y C19 germinaron 16 semillas, con E6 germinaron 13, con AR5F 2575 germinaron 12 y con *B. bassiana* germinaron 15. En el ensayo donde se utiliza cromo, en el control sin hongo germinaron 16 semillas de sorgo. Con la cepa C11 germinaron 13, con C19 germinaron 11, con E6 germinaron 8, con AR5F 2575 germinaron 5 y con *B. bassiana* germinaron 6. En general, las plantas en las macetas sin cromo estaban más altas que las plantas con cromo (ver figura 2).

Estos datos indican que las plantas sobreviven y crecen menos en los ambientes con cromo. En ambientes sin el cromo las cepas C11, C19 y *B. bassiana* aumentaron la germinación de las semillas, mientras AR5F 2575 se reprimió la germinación, y E6 no tuvo un efecto. En las macetas con cromo las semillas germinaron más en la ausencia de un hongo. Esto sugiere que en un ambiente con cromo *Metharizium* y *Beauveria* pueden tener un efecto dañino en el sorgo, en vez del efecto positivo que ya había sido descrito en suelos no contaminados con cromo.

CONCLUSIONES

Los hongos micorrízicos *Beauveria bassiana* y *Metharizium* tienen un efecto protector en las plantas de *Arabidopsis thaliana* en los ambientes con cromo, pero con la mayoría de las cepas es necesario el contacto directo con la planta. Con *Sorghum vulgare* los hongos tienen un efecto positivo en ambientes sin cromo, pero en los suelos con cromo afectan negativamente el desarrollo de la planta.



FIGURA 2. Efecto de hongos micorrizicos en la germinación y crecimiento de *S. vulgare* en presencia o ausencia de cromo en el suelo. Donde a, control sin cromo y sin hongo; b, sin cromo y con la cepa C11; c, sin cromo y la cepa C19; d, control con cromo y sin hongo; e, con cromo y la cepa C11; f, con cromo y la cepa C19.

AGRADECIMIENTOS

La estudiante Casey M Lapham fue participante de intercambio del Verano de la Investigación Científica edición 2016.

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento a los proyectos por parte de: Ciencia Básica SEP-CONACYT, convenio 220780; Apoyo al Fortalecimiento de la Excelencia Académica 2014 y 2015, modalidad Infraestructura, convenios 005 y 003.

Se agradece la asesoría y apoyo de la MC Rosario Ramírez.

REFERENCIAS

- [1] Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156, pp. 609-643. doi: 10.1099/mic.0.037143-0.
- [2] Davies, F.T. Jr., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N., Saravia Grossi, J.A. (2001) Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology*, 158(6), pp. 777-786. doi: 10.1078/0176-1617-00311.
- [3] Bai-Hui, R., Song-Lin, W., Bao-Dong, C., Zhao-Xiang, W., Xin, Z. (2015) Cr Stable Isotope Fractionation in Arbuscular Mycorrhizal Dandelion and Cr Uptake by Extraradical Mycelium. *Pedosphere*, 25(2), pp. 186-191. doi: 10.1016/S1002-0160(15)60003-0.
- [4] Carreón-Abud, Y., Beltrán-Nambo, M.A., Martínez Trujillo, M. (2013) Efecto protector de los hongos micorrizicos arbusculares en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) expuestas a Cr(VI). *FYTON*, 82, pp. 127-134.
- [5] Songlin, W., Xin, Z., Yuqing, S., Zhaoxiang, W., Tao, L., Yajun, H., Jitao, L., Gang, L., Zhensong, Z., Jing, Z., Lirong, Z., Xiangjun, Z., Baodong, C. (2016) Chromium immobilization by extra- and intraradical fungal structures of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Journal of Hazardous Materials*, 316, pp. 34-42. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.17.
- [6] Hussein, K.A., Hassan, S.H.A., Jin Ho, J. (2011) Potential capacity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the biosorption of Cd²⁺ and Pb²⁺. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 57, pp.347-355.