

EFECTO DEL HONGO METARHIZIUM EN EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS

de León Cáceres Cristy Adriana (1), Durón Castellanos Areli (2), Piña Torres Iván Horacio (2),
Torres Guzmán Juan Carlos (2), Padilla Guerrero Israel Enrique (3)

1 [Ingeniería Agronómica en Sistemas de Producción Agrícola, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala] |[dleonadriana@gmail.com]

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] |[ie.padillaguerrero@ugto.mx]

Resumen

Metarhizium es reconocido por sus múltiples funciones como un hongo entomopatógeno usado en el control biológico de plagas de insectos y por realizar simbiosis con las plantas, se ha demostrado el potencial que *Metarhizium* tiene en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales, pues *Metarhizium* coloniza las raíces de las plantas endófitamente; esta interacción planta-hongo genera un intercambio de nutrientes, propicia tolerancia a condiciones adversas en la planta como sequía, enfermedades causadas por microorganismos, entre otros. En el presente trabajo, se realizaron interacciones en condiciones de invernadero e *in vitro* para determinar el efecto en el crecimiento de la planta *Amaranthus hypochondriacus* con hongos del género *Metarhizium*, observando que al exponer las plántulas de amaranto a las cepas del hongo *Metarhizium*, sí existe una interacción hongo-planta, pero que no afecta el crecimiento de la planta *Amaranthus hypochondriacus* en condiciones de invernadero.

Abstract

Metarhizium is recognized for its multiple functions as an entomopathogenic fungus used in biological control of insect pests and for symbiosis with plants, it has been demonstrated the potential that *Metarhizium* has in the growth and development of plant, since *Metarhizium* colonizes the roots of the plants endophytically; this plant-fungus interaction generates an exchange of nutrients, promotes tolerance to adverse conditions in the plant such as drought, diseases caused by microorganisms, among others. In the present work, interactions were carried out in greenhouse and *in vitro* conditions to determine the effect on the growth of the *Amaranthus hypochondriacus* plant with fungi of the genus *Metarhizium*, we observed that when exposing the amaranth seedlings to the *Metarhizium* fungus strains, there is a fungal-plant interaction, but it does not affect the growth of the *Amaranthus hypochondriacus* plant under greenhouse conditions.

Palabras Clave

Metarhizium, Simbiosis, Rizósfera, Amaranto, Agricultura.

INTRODUCCIÓN

Metarhizium fue el primer hongo en el mundo que se produjo en masa y se utilizó para el control de plagas de insectos [1]. Este es un hongo del suelo con distribución mundial [2], es conocido mayormente por ser agente de control por su capacidad para matar insectos plaga, dando poca consideración a su asociación con las plantas o con la ecología de la rizósfera [3]. *Metarhizium* es un género de hongos ascomicetos (Hypocreales: Clavicipitaceae) clasificado como entomopatógeno-micorrízico y esto se debe a que realiza una simbiosis mutualista con las plantas la cual estimula el crecimiento de las raíces y translocación de nutrientes para ambos organismos [4]. Los hongos endófitos ascomicetos, por ejemplo, han sido frecuentemente reportados como agentes protectores contra patógenos y plagas de plantas. *Metarhizium spp.* coloniza la rizósfera y se adhiere a la superficie de las raíces de las plantas [5,6].

Hay evidencia de que la existencia de la simbiosis planta-hongo endófito se estableció desde hace varias decenas de millones de años y es probable que, durante la evolución biológica, esta asociación se haya originado muchas veces, independientemente, tanto en los trópicos como en las zonas templadas [8]. En todo el mundo, se ha reportado micobiota endofítica en varias plantas huéspedes. Entre las definiciones propuestas para el término endófito: es un hongo que coloniza tejido vegetal vivo sin causar efectos negativos a la planta [9]. Los hongos endófitos son organismos que viven en asociación con plantas en la mayor parte o en todo su ciclo de vida, y se encuentran en varios órganos de éstas (colonización sistémica interna). La interacción planta-endófito se identifica por su carácter asintomático, la planta provee al hongo alimento, hospedaje y protección [10]. La utilización de microorganismos benéficos para las plantas ha tenido una amplia expansión en los últimos años, debido a su efecto positivo sobre el rendimiento de muchos cultivos en distintas situaciones y a la posibilidad de permitir desarrollar una agricultura orgánica [11]. Los hongos endófitos como lo es *Metarhizium*, estudios han reportado que aporta beneficios como colonizador de la rizósfera, promueven el crecimiento vegetal, mejoran la nutrición en las plantas, incrementan el desarrollo de las raíces y mejoran la tolerancia ante un estrés ambiental [6,12,13]. Como ejemplo de sus beneficios se encuentra el estudio de *Metarhizium robertsii* que mejora el crecimiento de raíces y la absorción de nutrientes en pastizales y habichuelas [14]. Las plantas cuyas raíces están colonizadas por endófitos a menudo crecen más rápido que las no colonizadas [15].

La planta *Amaranthus* es una especie anual, herbácea o arbustiva de diversos colores que van del verde al morado o púrpura, con distintas coloraciones intermedias [16]. La raíz es pivotante con abundante ramificación y múltiples raicillas delgadas que se extienden rápidamente después de que el tallo comienza a ramificarse facilitando la absorción de agua y nutrientes [17]. La semilla y estructuras vegetativas contienen proteína de alto valor nutritivo para el consumo humano [18]. La planta de amaranto se adapta a muchos ambientes con adecuadas condiciones para crecer vigorosamente o adversas donde aprovecha en forma eficaz la fotosíntesis por el método C4, siendo más eficiente en temperaturas elevadas y requiriendo la mitad de agua en comparación a otras plantas, por sus características fisiológicas el amaranto se adapta a diferentes climas [19]. *Amaranthus hypochondriacus* es una importante especie para producción de granos y es originaria de México, las semillas de coloración clara son las que más comúnmente se utilizan para granos. En la actualidad, la semilla se utiliza para elaborar granola y cereal; se obtiene harina para preparar galletas, pastas, pan y tamales, a un costo bajo para la población. El amaranto se cultiva en varios países del mundo y, en México, los principales estados productores son Morelos, Tlaxcala, Distrito Federal y Puebla [20].

La finalidad del trabajo es conocer la asociación del hongo *Metarhizium* con la planta *Amaranthus hypochondriacus* y su efecto en el crecimiento, se utilizó microscopía de fluorescencia utilizando la cepa PCP2 etiquetada con la proteína fluorescente mCherry *in vitro* y en condiciones de invernadero donde se utilizaron 6 cepas del hongo *Metarhizium robertsii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Tabla 1: Cepas de *Metarhizium* utilizadas en el proyecto.

Organismo: <i>Metarhizium robertsii</i>						
Referencia: Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato, México.						
Cepas	PCP2	ECLC2	CU2-1	AT-25	CU-3	AT1-1

Metodología *in vitro* asociación con todas las cepas

Semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*): Las semillas fueron esterilizadas utilizando etanol absoluto, dos lavados de 20 minutos, para su almacenamiento en esterilidad. Posterior a esto, fueron colocadas 10 semillas de amaranto en línea en cajas Petri, utilizando 5 placas por cepa, seguidamente fueron inoculadas realizando una línea a lo largo de la caja Petri debajo de las semillas utilizando una suspensión de 1×10^8 conidias/ml con cada cepa. Éstas fueron llevadas a incubación a 28°C durante 10 días. Pasado este tiempo fueron observadas en un transiluminador de luz blanca comparando cada una de las cepas con el control, seleccionando la mejor cepa que mostró una notoria asociación con la radícula de las plántulas. Se utilizó un estereoscopio Zeiss AX10 zoom. V16 para la toma de fotografías y el programa Zen Pro para la localización de la colonización en las raíces de las plántulas *A. hypochondriacus in vitro* de la cepa del hongo seleccionada.

Metodología microscopia de fluorescencia

Se utilizaron semillas de amaranto (*A. hypochondriacus*) previamente esterilizadas, las semillas se colocaron a germinar en agar-agua durante 3 días a 28°C con la finalidad de obtener plántulas. Posteriormente la raíz de las plantas de *A. hypochondriacus* fueron sumergidas en una solución de 1×10^7 conidioa/ml de la cepa PCP2-mCherry de *Metarhizium* durante 10 segundos, para posteriormente colocarlas en cajas Petri con medio agar-agua, las raíces de las plantas se observaron en un microscopio de fluorescencia marca NIKON a las 48 h.

Metodología condiciones de invernadero

Se realizó la recolección de conidios de todas las cepas utilizadas con una solución de Tritón X-100 al 0.1%, realizando el raspado de conidias de cajas Petri, la solución de las conidias se filtró con malla de fibra sintética para eliminar el micelio y se realizaron 3 lavados con Tritón X-100 al 0.01%, centrifugando a 3,000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en 10 ml de Tritón X-100 al 0.01%, sucesivamente se determinó la cantidad de conidias/ml. Para realizar el experimento en condiciones de invernadero se preparó el sustrato (Kekkilä) en charolas de aluminio para esterilizarlo en autoclave 3 veces, sucesivo a esto se colocó el sustrato en cubetas plásticas para hacer una mezcla con una proporción de 3 partes de sustrato y 1 parte de vermiculita a la cual se le adicionaron 800 ml de agua destilada. Se utilizó una bandeja de germinación de duroport con la mezcla previamente preparada, se realizó la siembra colocando 1 semilla esterilizada por cavidad y la misma se inoculó con cada una de las cepas utilizando una suspensión de 1×10^8 conidias/ml. La bandeja fue llevada al invernadero ubicado en la sede de la División de Ciencias Naturales y Exactas, las plántulas fueron regadas diariamente con 5 ml de agua destilada, el tiempo de crecimiento fue de 3 semanas.

Metodología del análisis de las plántulas

Pasadas las 3 semanas en condiciones de invernadero las plántulas fueron retiradas de la bandeja de germinación, seguidamente se lavaron las raíces para quitar el suelo de éstas. Se procedió a tomar fotografías con una cámara Nikon de cada una de las cepas y control para observar diferencias cualitativas, posterior a esto, cada una de las plántulas se colocaron en papel aluminio, las cuales se introdujeron en

frascos de vidrios para secarlas en un horno a 50 °C durante 3 días. Pasado este tiempo se pesó cada una de las plántulas en una balanza analítica obteniendo el peso seco en gramos de las plántulas de las cepas y control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la interacción *in vitro* de las 6 cepas de *Metarhizium* con las plántulas de amaranto (*A. hypochondriacus*), se realizaron comparaciones entre las cepas y el control, encontrándose que no había diferencia en cuanto a tamaño de radícula o el desarrollo de las raíces, pero se pudo observar con el estereoscopio Zeiss AX10 zoom. V16 con iluminación que la cepa PCP2 mostraba una mayor colonización que las otras cepas a lo largo de las raíces de las plántulas de amaranto. Por lo que ésta cepa fue seleccionada para realizar el segundo experimento *in vitro*.

Tabla 2: Asociación del hongo *Metarhizium* con la planta amaranto (*A. hypochondriacus*).

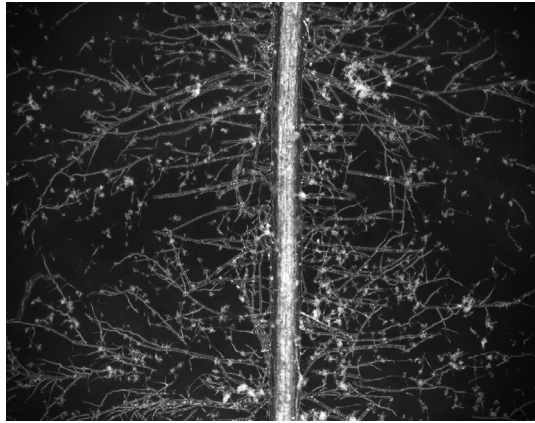

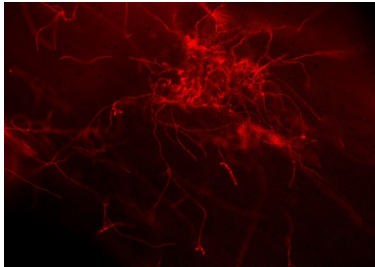
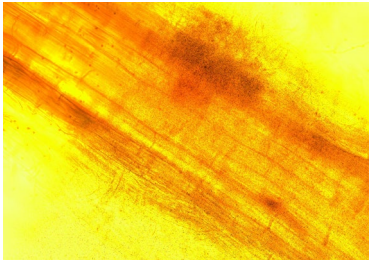
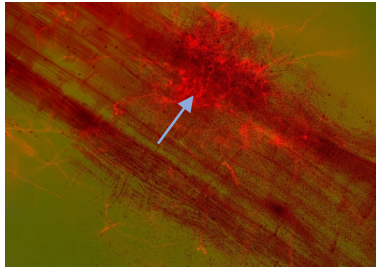
Tiempo	Campo claro	
10 días		

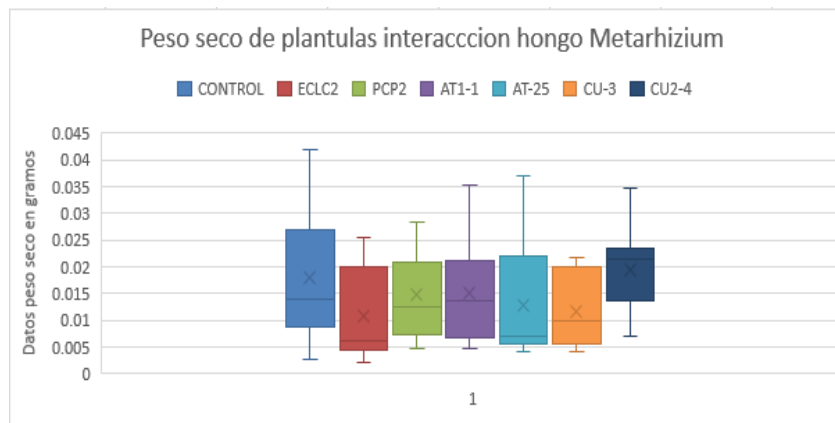
Tabla 3: Asociación del hongo *Metarhizium* cepa PCP2-mCherry con la planta amaranto (*A. hypochondriacus*).

Tiempo	Fluorescencia	Campo claro	Colocalización
48 hrs.			

La interacción *in vitro* de la cepa PCP2-mCherry de *M. robertsii* con las plántulas de amaranto (*A. hypochondriacus*), se observó con éxito utilizando microscopía de fluorescencia con un aumento 200X, se observa que el hongo coloniza a lo largo de la raíz de la plántula de *A. hypochondriacus*, pues se puede notar la presencia de micelio en la (imagen 1, tabla 3), la planta carece de fluorescencia por lo que es más fácil apreciar la fluorescencia (roja) del hongo (imagen 3, tabla 3), de manera que en efecto el hongo *Metarhizium*

tiene la capacidad de colonización, mas no tiene ningún efecto observable en el crecimiento de las plántulas de amaranto.

IMAGEN 1: Peso seco de plántulas en interacción con cepas del hongo *Metarhizium* en condiciones de invernadero.



Para el análisis de los datos de peso seco de las plantas crecidas en invernadero, se realizó un análisis estadístico con el programa Prism 6, primero se realizaron las pruebas de normalidad de D'Agostino & Pearson omnibus normality test y Shapiro-Wilk normality test, dando como resultados que los datos obtenidos tienen una distribución normal. Posteriormente se realizó un ANOVA de una vía obteniendo una $p=0.2724$, mayor a $p>0.05$, por lo que no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, este resultado nos indica que la asociación de *M. robertsii* con las plantas de *A. hypochondriacus*, no tiene un efecto sobre el crecimiento, análisis de la interacción en suelos con diferentes características de nutrientes se tendrán que realizar posteriormente para corroborar nuestros resultados.

CONCLUSIONES

Las cepas del hongo *Metarhizium robertsii* tiene la capacidad de colonizar las raíces de la planta de amaranto (*A. hypochondriacus*) en los experimentos *in vitro*.

Aunque todas las cepas evaluadas colonizaron las raíces de las plántulas, estadísticamente no existe una diferencia significativa en entre los 6 tratamientos de las cepas del hongo *M. robertsii* y el control, sobre un efecto en el crecimiento de las plántulas de amaranto (*A. hypochondriacus*) en condiciones de invernadero.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Guanajuato por promover el interés en la investigación mediante los veranos UG para estudiantes de excelencia del extranjero. A la Universidad de San Carlos de Guatemala por el apoyo brindado para la realización del verano científico.

REFERENCIAS

- [1] Krassiltschik, I. M. (1888). La production industrielle desparasites vegetaux pour la destruction des insects nuisibles. Bull. Sci. France et Belg. 19, 461-472.
- [2] Zimmermann, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology.17 (9): 879-920.

- [3] Vega, F.E.; Posada, F.; Aime, M.C.; Pava-Ripoll, M.; Infante, F. & Rehner, S.A. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46: 72-82.
- [4] Fang, W. y St Leger, R. (2010) Mrt, a Gene Unique to Fungi, Encodes an Oligosaccharide Transporter and Facilitates Rhizosphere Competency in *Metarhizium robertsii*. *Plant Physiology*. 154: 1549 – 1557.
- [5] Schardl, C. L.; Leuchtman, A. & Spiering, M. J. 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* 55: 315-340.
- [6] Hu, G. y R. J. St. Leger (2002) Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* (68):6383-6387.
- [7] BAREA, Jose Miguel; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. En *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. p. 195-212.
- [8] Gamboa-Gaitán, M. 2006. Hongos endófitos tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 18 p.
- [9] Hirsch, G. & Braun, U. 1992. Communities of parasitic microfungi. In W. Winterhoff. (ed.), *Handbook of Vegetation Science*, Vol. 19, Fungi in Vegetation Science. Kluwer Academic Dordrecht. Pp. 225-250.
- [10] Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2-9.
- [11] Caballero Mellado, J. 2004. Uso de *Azospirillum* como alternativa tecnológica viable para cultivos de cereales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone, IE, Miyazaki SS (eds.). *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 45-49.
- [12] Behie S y Bidochka MJ. 2014. Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends in Plant Science* 19: 734–740. doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.007
- [13] Wyrebek M, Huber C, Sasan R, Bidochka, M. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Mycrobiology Society* 157: 2904–2911.
- [14] Sasan R, Bidochka M. 2013. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* F. sp. phaseoli. *Canadian Journal of Plant Pathology* 35: 288–293
- [15] Tudzynski B, Sharon A. 2002. Biosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones. En: Osie H (Eds.) *The Mycota. Industrial Applications*. Berlin: Springer Verlag 10: 183–212.
- 16 Espitia, R. E. 1991. Guía para el cultivo del amaranto en los Valles Altos de la Mesa Central. SARH. INIFAP. Campo Experimental Valle de México. Folletos Para productores No. 18 Chapingo, México.
- 17 Tapia, M. 1997. Cultivos andinos sub-explotado y su aporte a la alimentación. 2a edición. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- [18] Bressani, R., A. Sánchez-Marroquín y E. Morales. 1992. Chemical composition of grain amaranth cultivars and effects of processing their nutritional quality. *Food Rev. Int.* 8: 23-49.
- [19] Trinidad, A, Gomes L. F, y, Suárez R. G., 1986. El amaranto, *amaranthus* spp. Y Su aprovechamiento. p. p. 91-98.
- [20] SAGAR. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 1995. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. México, D.F.