



IV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS AGRARIAS

“Conocimiento e innovación para el desarrollo sostenible”

LIBRO DE RESÚMENES

19, 20 y 21 / Abril / 2017
Campus UNA
San Lorenzo, Paraguay



Universidad Nacional de Asunción
Facultad de Ciencias Agrarias

Congreso Nacional de Ciencias Agrarias. (4a. : 2017 abr. 19-21; San Lorenzo, Paraguay).
Libro de resúmenes / editores Enrique Asterio Benítez León, Guillermina Macchi
Leite, Alba Liz González. – San Lorenzo, Paraguay: FCA/UNA, 2017.
1 pendrive ; capacidad 116 Mb.

Incluye tablas, figuras, bibliografías.

1. Producción agrícola. 2. Producción animal. 3. Producción forestal. 4. Economía.
5. Desarrollo rural. 6. Bosques. 7. Medio ambiente. 8. Suelos. 9. Ingeniería agrícola. 10.
Protección Vegetal. 11. Biotecnología. I. Benítez León, Enrique Asterio, ed. II. Macchi Leite,
Guillermina, ed. III. González, Alba Liz, ed. IV. Título.

CDD : 630

Diseño editorial e interactividad: ERVAZ Arte Digital - Tel. 021 420 844
Colaboración: Lourdes Monserrat Mora Insfrán

Fotos de tapa: Lourdes María González Soria, Jorge Daniel Caballero Mascheroni,
Gloria Arminda Resquín Romero, Enrique Asterio Benítez León, Luis Dario Macchi Leite.

ISBN: 978-99967-831-3-5



9 789996 783135 5

Morfoanatomía de la colonización de los hongos entomopatógenos endófitos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium brunneum*) en plantas de melón

Gloria Resquín-Romero^{1,2*}, Inmaculada Garrido-Jurado², Enrique Quesada-Moraga^{2*}

¹Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad de Córdoba, Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, ETSIAM, Córdoba, España.

* Autores para correspondencia: gioresqx@hotmail.com , cr2qumoe@uco.es

Introducción

En sentido amplio, los endófitos son microorganismos que viven en los tejidos vegetales durante todo o parte de su ciclo de vida, sin causarles síntomas aparentes (Schulz y Boyle 2005). No fue hasta finales del siglo XX cuando se observó por vez primera el establecimiento de *Beauveria bassiana* en el interior de tallos de maíz (*Zea mays* L.), y su desarrollo para la protección sistémica frente al barrenador *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Bing y Lewis 1992, Wagner y Lewis 2000). Este hecho impulsó el interés por la función de los hongos entomopatógenos (HE) como endófitos, más allá de la interacción directa con los insectos, que se ha ido ampliando con el tiempo a un gran número de especies vegetales y fúngicas (Quesada-Moraga et al. 2014; Resquín-Romero et al. 2016). La colonización de la planta por parte de los HE podría ocurrir a partir de los conidios depositados en el filoplano y en otros casos del suelo a través de las raíces. De hecho, tanto *Beauveria* como *Metarhizium* forman asociaciones íntimas con una gran variedad de plantas y han demostrado ser capaces de movilizar nitrógeno y de recibir carbono (carbohidratos) de las plantas hospedantes (Behie et al. 2012, 2013, Sasan y Bidochka 2012).

El objetivo de este trabajo incluye la capacidad de colonización de endófitos y el estudio morfoanatómico de los hongos entomopatógenos endófitos en plantas de melón.

Metodología

Cepas y suspensiones fúngicas. Para los ensayos se utilizaron tres cepas de *Beauveria bassiana* y una de *Metarhizium brunneum*, pertenecientes a la colección de la micoteca del Departamento de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba, España. Este trabajo se realizó entre 2015 y 2016. Cada una de estas cepas fueron repicadas en tubos de ensayo sobre medio de cultivo malta agar (MA; Biocult, Madrid, España), a 25°C en la oscuridad y se almacenaron a -4°C. Las suspensiones de hongos se prepararon raspando conidios en una solución acuosa estéril Tween 80 al 0,1%, que posteriormente se filtró a través de un visillo. Las suspensiones de conidios utilizadas para los ensayos se ajustaron diluyendo con Tween 80 al 0,1% (v/v) a una concentración final de $1,0 \times 10^8$ conidios mL⁻¹ utilizando un hemocitómetro Malassez (Quesada-Moraga et al. 2006).

Substrato y proceso de la colonización de tejidos vegetales por hongos entomopatógenos

Para el ensayo fueron utilizadas plantas de melón (*Cucumis melo* L.), sembradas sobre sustratos desinfectados en tres oportunidades y luego inoculados con suspensiones fúngicas de $1,0 \times 10^8$ conidios mL⁻¹ de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium brunneum* cuando las plantas contaban con 10 hojas verdaderas. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 5 tratamientos y 10 repeticiones. Control utilizado fue control medio y control absoluto, agua con Tween 80 (0,1%). La evaluación fue realizada cada 24 h en cuatro oportunidades.

Estudio histológico y morfoanatómico de las plantas colonizadas por hongos endófitos

Las suspensiones fúngicas de las diferentes cepas estudiadas se aplicaron sobre las superficies de las hojas de melón a una concentración $1,0 \times 10^8$ conidios mL^{-1} cuando las plantas contaban con 10 hojas verdaderas. Luego, las superficies de las hojas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% y aclarada tres veces con agua autoclavada. Se seleccionaron al azar tres pequeñas secciones de tallos, hojas y raíces por tratamiento al igual que el control. Estos, se fijaron por inmersión en formalina al 10% (Fisher Scientific, Ltd., Leicestershire, UK) durante 24 horas y después se procesaron para análisis histológico por inclusión en parafina (Garrido et al. 2016). Las muestras se cortaron a un espesor de $3 \mu\text{m}$ con un micrótopo, se tiñeron con Acido Peryódico-Schiff (PAS) y se examinaron bajo un microscopio óptico (Figura 1). Para este ensayo, fueron seleccionadas plantas colonizadas a 72 h para ambos hongos (*B. bassiana* y *M. brunneum*). La identificación de los diferentes tejidos se

realizó de acuerdo con Landa et al. (2013).

Detección de metabolitos secundarios en plantas colonizadas

Las hojas de melón inoculadas con la cepa EAMb 09/01-Su de *M. brunneum* se procedieron a la extracción e identificación del compuesto bioactivo a través del análisis cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa (HPLC-MS) con base a la metodología propuesta por Skrobek et al. (2008) adaptadas con modificaciones para determinar el contenido de destruxina A (dtx A). Para la misma se utilizaron el siguiente procedimiento: 1,5 g de plantas colonizadas con *Metarhizium brunneum* liofilizadas y centrifugadas a 27.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se desechó. A continuación, se añadió el mismo volumen de acetato de etilo y se dejó evaporar en cámara extractor. Finalmente, se añadieron 0,5 mL de acetonitrilo: agua (1:1). Las muestras fueron almacenadas a -4°C (Figura 1).

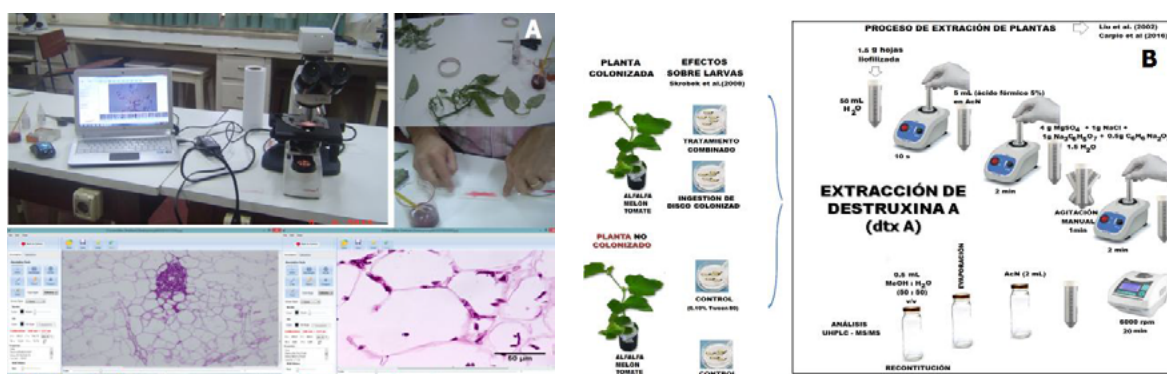


Figura 1. Proceso de: A) Corte histológico y tinción de los tejidos de plantas colonizadas por hongos endófitos. B) Extracción de metabolitos secundarios de plantas colonizadas.

Resultados y discusión

Estudio histológico y morfoanatómico de las plantas colonizadas por hongos endófitos

El examen histológico y morfoanatómico de los tejidos foliares inoculados con las cepas EABb 01/33-Su y EAMb 09/01-Su de *B. bassiana*

y *M. brunneum*, respectivamente, revelaron estructuras fúngicas teñidas positivamente por PAS, inclusive en la raíz zona no inoculada. Sin embargo, tanto las hojas, tallos y raíces del control mostraron una estructura normal bajo microscopía. El hongo *B. bassiana* colonizó de forma profusa las hojas por la vía del apoplasto. Diferentes investigaciones realizadas al respecto,

afirman que la penetración de los HE en los tejidos de las plantas se realiza a través de los estomas o por medio de la penetración directa mediante la actuación de la enzima MAD2 que permite la adhesión a la planta (Wang y St. Leger 2007). Posteriormente el movimiento se produce

en los espacios intercelulares siguiendo la vía del apoplasto (Landa et al. 2013) como lo demuestra en las imágenes tomadas en el laboratorio de Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, España (Figura 2).

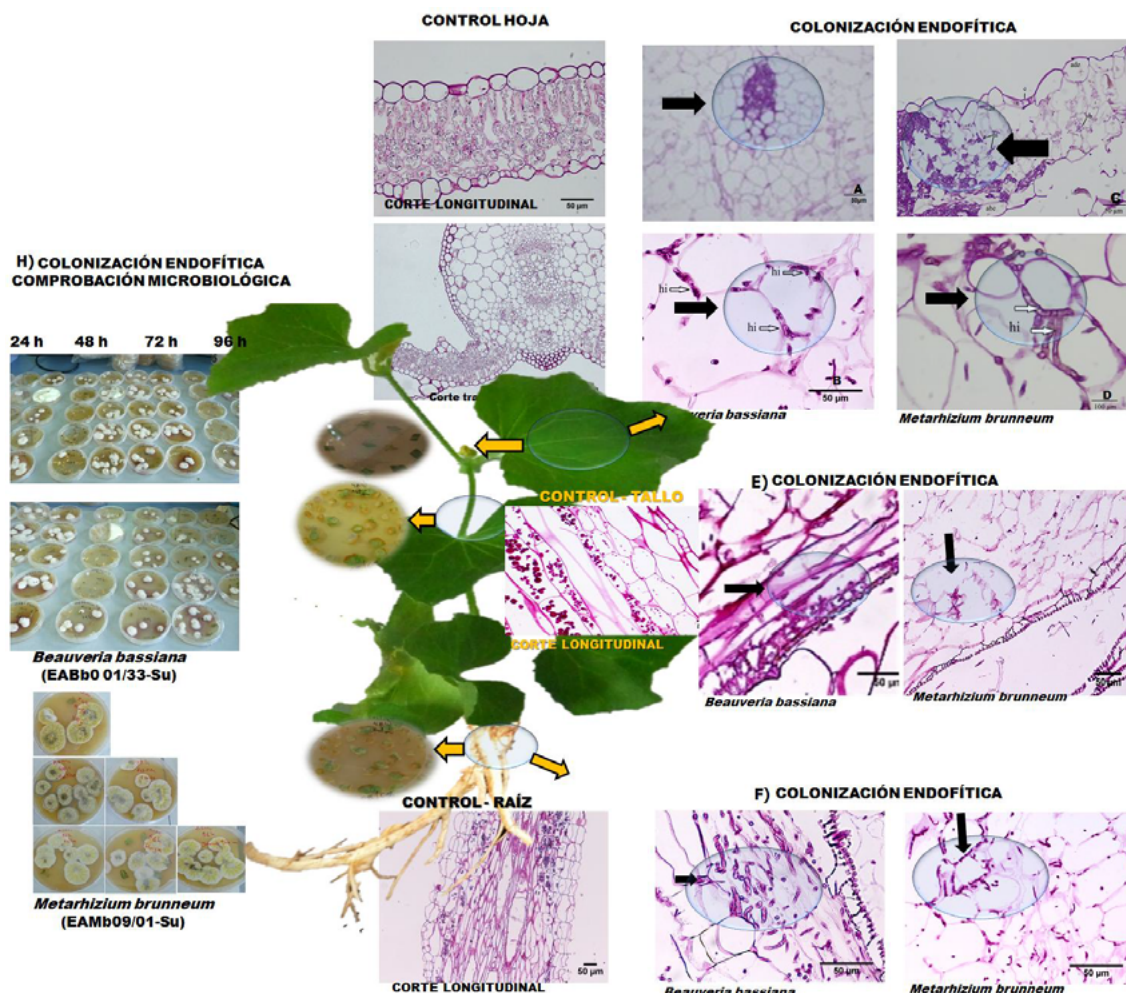


Figura 2. Resumen gráfico de la comprobación microbiológica e histopatológica, morfoanatómica de la colonización de las plantas de melón (hoja, tallo y raíz) inoculadas con hongos endófitos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium brunneum*) con sus respectivos controles (hoja, tallo y raíz sin inocular). A) Penetración y colonización de estomas (bar, 50µm). B) Hifas de *B. bassiana* en los espacios intercelulares (bar, 50µm). C, D) Hifas de *M. brunneum* en los espacios intercelulares (bar, 50µm). E, F) Hifas de *B. bassiana* y *M. brunneum* endofítica en los espacios intercelulares del tallo y raíz del melón (bar, 50µm). H) Comprobación microbiológica de la colonización endofítica (bar, 50µm).

Detección de metabolitos secundarios en plantas colonizadas endofíticamente

En las hojas colonizadas endofíticamente por la cepa EAMb 09/01-Su de *Metarhizium brunneum*, se detectó 0,0011ppb. destruxina A. En trabajos

inéditos realizados por Garrido et al. (2016) y Resquin-Romero et al. (2016) comprueban la existencia de una interacción entre hongo-planta-insecto para el control de fitófagos chupadores succionadores (*Bemisia tabaci*) y masticadores (*Spodoptera littoralis*).

Conclusiones

Las aplicaciones foliares de los hongos entomopatógenos *M. brunneum* y *B. bassiana* conducen a la colonización endofítica transitoria de los tejidos de la planta de melón. Los hongos entomopatógenos son capaces de colonizar temporalmente las plantas y muestran una colonización en los espacios intercelulares vía apoplasto. Las plantas colonizadas endofíticamente secretan compuestos bioactivos como la destruxina A, metabolitos secundarios. De esta manera, las nuevas funciones ecológicas de los hongos entomopatógenos (Ascomycetes mitospóricos; Hypocreales) deben ser tenidas en cuenta no solo para el desarrollo de nuevas estrategias de control de plagas, sino para la correcta evaluación de su eficacia.

Referencias bibliográficas

- Behie, SW; Zelisko, PM; Bidochka, MJ. 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336:1576-1577.
- Bing, LA; Lewis, LC. 1992. Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lep, Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*. *Entomophaga* 37:525-536.
- Behie, SW; Padilla-Guerrero, IE; Bidochka, MJ. 2013. Nutrient transfer to plants by phylogenetically diverse fungi suggests convergent evolutionary strategies in rhizospheric symbionts. *Communicative and Integrative Biology* 6:0-4.
- Garrido-Jurado, I; Resquín-Romero, G; Amarilla, SP; Ríos-Moreno, A; Carrasco, L; Quesada-Moraga, E. 2016. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Pest Science* 90:319.
- Landa, BB; Lopez-Diaz, C; Jimenez-Fernandez, D; Montes-Borrego, M; Munoz-Ledesma, FJ; Ortiz-Urquiza, A; Quesada-Moraga, E. 2013. In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* 114:128-138.
- Quesada-Moraga, E; Maranhao, EAA; Valverde-García, P; Santiago-Álvarez, C. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological control* 36:274-287.
- Quesada-Moraga, E; Herrero, N; Zabalgogea, I. 2014. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In Verma, VC; Gange, AC. (Eds.) *Advances in endophytic research*. India, Springer. p. 85-99.
- Resquín-Romero, G; Garrido-Jurado, I; Delso, C; Ríos-Moreno, A; Quesada-Moraga, E. 2016. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 136:23-31. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.03.003>
- Sasan, RK; Bidochka, MJ. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany* 99:101-107.
- Schulz, B; Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109:661-686.
- Skrobek, A; Shah, FA; Butt, TM. 2008. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *Biocontrol* 53:361-373.
- Wagner, BL; Lewis, LC. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3468-3473.
- Wang, C; St Leger, RJ. 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* 6:808-816.



Universidad Nacional de Asunción
Facultad de Ciencias Agrarias



Bayer CropScience



INSTITUTO
FORESTAL
NACIONAL

Solidaridad

