



# **Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

## **TESIS**

**Influencia de la asociación entre *Phaseolus vulgaris* y dos microorganismos sobre la tolerancia a estrés salino**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
Especialista en Biotecnología

## **PRESENTA:**

Leisy Mariela Arévalo Galán

## **DIRECTORA:**

Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

## **ASESOR:**

Dr. Octavio Loera Corral

Ciudad De México, junio 2018

Ciudad de México a 27 de junio del 2018.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la Idónea Comunicación de Resultados:

**INFLUENCIA DE LA ASOCIACIÓN ENTRE *PHASEOLUS VULGARIS* Y DOS  
MICROORGANISMOS SOBRE LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO**

Presentada por la alumna:  
Leisy Mariela Arévalo Galán

Comité tutorial:

**Directora:**

---

**Dra. Tania L. Volke Sepúlveda**  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

**Lector:**

---

**Dr. Octavio Loera Corral**  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

## *Agradecimientos*

- ❖ Antes que nada, a mi MADRE, porque aun cuando no siempre tenemos las mismas opiniones, siempre me ha apoyado en todo incondicionalmente.
- ❖ A mis tías, quien han llenado mi vida de buenos momentos y los mejores ejemplos.
- ❖ A mis hermanas, porque, aunque nos siempre nos vemos, siempre disfrutamos los momentos que pasamos juntas.
- ❖ A mi directora de tesis, la Dra. Tania L. Volke Sepúlveda, quien con mucha paciencia, consejos y observaciones a guiado mis pasos nuevamente en este camino de conocimientos, aciertos, errores, más errores, descubrimientos personales, educativos y demás.
- ❖ A mi asesor y lector, el Dr. Octavio Loera Corral, por sus observaciones y comentarios para concretar este proyecto de vida.
- ❖ Al Dr. Mariano y a Beti, por su apoyo, sabios consejos y buen humor.
- ❖ A la Universidad Autónoma Metropolitana y al laboratorio de Residuos sólidos, por permitirme desarrollarme académicamente en sus instalaciones.
- ❖ A los amigos que he hecho desde que llegue a la CDMX: Liz, Memo, Cali, Pau, Nemi, Daniel, Aleja, Sina, Néstor, Pepe, Víctor, Ale, Viri, Dra. Gloria, Dennisse, Payan, Allan, Luisa, Benji, Maddie, Juan y los que me faltaron aquí...por las aventuras, los chismes, los chistes, los altares, las tragaderas y el camino “todo derecho”.
- ❖ A los cuates de mi vida: Mago, Beni, Karen y Jazz, que siempre están ahí por teléfono, mail o cuando se puede de cuerpo presente echándome porras o dándome consejos.
- ❖ Gracias a las personas que, aunque no están nombradas aquí, forman parte de mi vida y vida diaria, honrándome con su amistad y apoyo.

## RESUMEN

El cultivo del frijol común *Phaseolus vulgaris* es sensible a diversos factores bióticos y abióticos, entre ellos la salinidad. A nivel mundial, la salinización de los suelos es un factor muy importante en la degradación de los suelos agrícolas el cual continua en aumento debido a malas prácticas agrícolas. El uso de organismos endófitos, definidos como microorganismos que colonizan tejidos vegetales inter y/o intra-celularmente sin causar síntomas aparentes de enfermedad, ha ido aumentando en las últimas décadas debido a que se ha comprobado que pueden mejorar el crecimiento de su hospedero, conferir resistencia a algunas plagas y patógenos y mejorar la tolerancia a diversos factores abióticos como la salinidad.

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la asociación endófito del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* y la bacteria metilótrofa *Methylobacterium oryzae* sobre el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* bajo condiciones de estrés salino. Por lo cual, este trabajo se dividió en dos etapas. La primera, para promover el crecimiento de *P. vulgaris* se probaron medios de cultivo con dos concentraciones de sales Murashige-Skoog (50 y 100%) con (5 g/L) y sin sacarosa como fuente de carbono. Se evaluó también, el efecto de las condiciones nutrimentales sobre el establecimiento de las asociaciones planta-hongo y planta-bacteria. Se encontró que los medios de cultivo que incluyeron sacarosa favorecieron el crecimiento de *P. vulgaris*, siendo el medio con sales Murashige-Skoog al 50% con 5 g. de sacarosa ( $\frac{1}{2}$ MS5) el medio seleccionado para los ensayos bajo condiciones salinas. También se corroboró que la asociación es con ambos microorganismos es carácter endófito y pueden establecerse, en el medio  $\frac{1}{2}$ MS5, a partir de los 10 días días de contacto tanto para *M. anisopliae* como para *M. oryzae*, encontrando los mayores índices de colonización en tallos y en menor porcentaje en raíz. En hojas, las asociación solo se presento con *M. anisopliae*.

La segunda etapa consistió en la evaluación del efecto de la asociación sobre el crecimiento *in vitro* de *P. vulgaris* bajo condiciones de estrés salino, adicionando 30 mM de NaCl al medio  $\frac{1}{2}$ MS5. Pudo observarse que el estrés salino afectó negativamente el crecimiento de *P. vulgaris*, reflejando algunos de los síntomas comunes de las plantas bajo estrés salino como el enrollamiento, clorosis y necrosis en hojas, tricomas glandulares y pérdida de turgencia en las plantas. También pudo corroborarse la asociación de *M. anisopliae* y *M. oryzae* con *P. vulgaris* bajo condiciones salinas. Se encontró que la asociación endófito con *M. anisopliae* y *M. oryzae* tienen un efecto neutro sobre el crecimiento de *P. vulgaris* bajo condiciones salinas. La importancia de los efectos de las asociaciones endófitas con cultivos de interés para la alimentación humana radica en que, estas asociaciones, no solo pueden promover el crecimiento y producción de los cultivos, sino que al mismo tiempo pueden ayudar a las plantas a mitigar algunos tipos de estrés biótico o abiótico a los que se ven sometidas durante el tiempo del cultivo.

## CONTENIDO

1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	1
1.1	<i>Phaseolus vulgaris</i> .....	1
1.2	Efectos de la salinidad en plantas .....	5
1.3	Mecanismos de tolerancia a salinidad en plantas .....	7
1.4	<i>P. vulgaris</i> bajo estrés salino .....	9
1.5	Microorganismos endófitos .....	10
1.6	Efecto de los microorganismos endófitos en plantas bajo estrés salino .....	15
2	JUSTIFICACIÓN .....	16
3	HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	17
4	OBJETIVOS .....	17
4.1	General .....	17
4.2	Específicos .....	17
5	MÉTODOS Y MATERIALES .....	18
5.1	Estrategia experimental .....	18
5.2	Material biológico .....	19
5.3	Ensayos <i>in-vitro</i> .....	21
5.4	Evaluación del crecimiento .....	22
5.5	Pruebas de asociación con <i>P. vulgaris</i> .....	23
5.6	Análisis estadístico .....	24
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
6.1	Prueba de viabilidad .....	25
6.2	Efecto de las condiciones nutrimentales sobre el crecimiento de <i>P. vulgaris</i> .....	26
6.3	Efecto de la asociación con <i>M. anisopliae</i> y <i>M. oryzae</i> sobre el crecimiento de <i>P. vulgaris</i> .....	28
6.4	Pruebas de asociación .....	32
6.5	Influencia de asociaciones endófitas en el crecimiento de <i>P. vulgaris</i> bajo estrés salino .....	38
6.6	Asociación entre <i>P. vulgaris</i> y ambos microorganismos bajo condiciones salinas .....	43
7	CONCLUSIONES .....	46
8	RECOMENDACIONES .....	47
9	BIBLIOGRAFÍA .....	48

# 1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A nivel mundial, las plantas en su ambiente natural se enfrentan con diversos tipos de estrés y a través de diversas adaptaciones fisiológicas regulan su metabolismo usando mecanismos para detectar y adaptarse al estrés en cuestión (Rodríguez *et al*, 2009). Sin embargo, los cultivos agrícolas no necesariamente poseen estas características. La sequía, salinidad y temperaturas extremas son los principales tipos de estrés que causan efectos adversos en el crecimiento y productividad de los cultivos (Martínez *et al*, 2011). A nivel mundial, una quinta parte de las tierras de cultivo se encuentran afectadas por la salinidad y se estima que para el 2050, la mitad de los suelos agrícolas podrían estar desertificados (FAO, 2015).

Existen métodos físicos, químicos y biológicos para recuperar los suelos afectados por sales, entre los que destacan la adición de abonos orgánicos para mejorar la estructura y permeabilidad del suelo, el uso de enmiendas químicas, como las sales cálcicas de alta solubilidad que intercambian el sodio por calcio, el lavado de las sales solubles con aguas de baja salinidad y la construcción de obras de drenaje para contribuir a la rehabilitación del suelo (FAO, 1988). Sin embargo, en países donde no se tiene acceso a la tecnología necesaria para solventar la problemática, o bien, al recuso económico para obtenerla, el desarrollo de técnicas agrícolas que permitan reducir los efectos adversos en el ambiente y la generación de productos seguros para consumo humano es un reto para las prácticas agrícolas actuales.

Las semillas de muchas plantas hospedan a una gran diversidad de microorganismos que pueden ser transmitidos a la planta durante su desarrollo (Parsa *et al*, 2016). Los endófitos, sean bacterias u hongos, se definen como microorganismos que colonizan tejidos vegetales inter y/o intra-celularmente sin causar síntomas aparentes de enfermedad (Wilson, 1995). Algunos endófitos tienen la capacidad de mejorar el crecimiento de su hospedero, así como la tolerancia a diversos factores abióticos o conferir resistencia a algunas plagas y patógenos. Por esta razón, el interés por los organismos endófitos ha ido aumentando para su aplicación en la agricultura (Waqas *et al*, 2012), además de que se ha demostrado que pueden establecerse a través de diversos métodos de inoculación (Parsa *et al*, 2016).

## 1.1 *Phaseolus vulgaris*

El frijol común, *Phaseolus vulgaris*, perteneciente al orden de los *Fabales* y a la familia *Fabaceae* (De Simone y Failde de Calvo, 2002) y su cultivo es uno de los más antiguos ya que se siembra desde hace más de 4000

años (Miranda, 1967; Hernández *et al*, 2013). El cultivo es muy sensible a factores climáticos como humedad del suelo, temperaturas, vientos fuertes, además de ser altamente susceptible a enfermedades y plagas (De Simone y Failde de Calvo, 2002). Sin embargo, es la leguminosa de mayor importancia en el consumo humano a nivel mundial, mismo que se realiza principalmente en los países en desarrollo. En México es el tercer cultivo en importancia, por la superficie que ocupa, después del maíz y el sorgo (FIRA, 2016).

A nivel mundial se han descrito alrededor de 150 especies de frijol, de las cuales, 52 especies son del género *Phaseolus*, alrededor de 40 son originarias de México (Miranda, 1966). Entre las cinco especies cultivadas del género, se encuentran el frijol común (*P. vulgaris* L.) y el frijol ayocote (*P. coccineus* L.), que junto con el maíz (*Zea mays* L.), son elementos importantes en la alimentación de los pueblos nativos de América. Algunas exploraciones botánicas realizadas en México han mostrado que las variedades silvestres de *Phaseolus vulgaris* L., crecen a lo largo de la Sierra Madre Occidental, en una franja de transición ecológica situada entre los 500 y los 2700 metros sobre el nivel del mar (msnm), aunque la mayor parte de estas variedades se presentan alrededor de los 1200 msnm. En esta misma área donde crecen diferentes especies del género *Phaseolus*, existe una gran diversidad genética, tanto de *P. vulgaris* como de algunos microorganismos que lo parasitan. También se han encontrado variedades silvestres de *Phaseolus vulgaris* en Guatemala y al noroeste de Argentina; sin embargo, por los antecedentes que se han mencionado, se infiere que esta especie tiene su centro de origen primario en la zona occidental del área México-Guatemala (Miranda, 1966). En la actualidad es posible encontrar en estas especies un gran número de variantes morfológicas, en cuyo desarrollo han intervenido tanto la adaptación a diferentes ambientes como la participación de los diversos grupos humanos (Castillo *et al*, 2006).

El desarrollo de la planta de frijol comprende de manera general dos fases sucesivas: la vegetativa y la reproductiva. La fase vegetativa (Figura 1) se inicia en el momento en que la semilla dispone de condiciones favorables para germinar, y termina cuando aparecen los primeros botones florales; en esta fase se forma la mayor parte de la estructura vegetativa que la planta necesita para iniciar su reproducción.

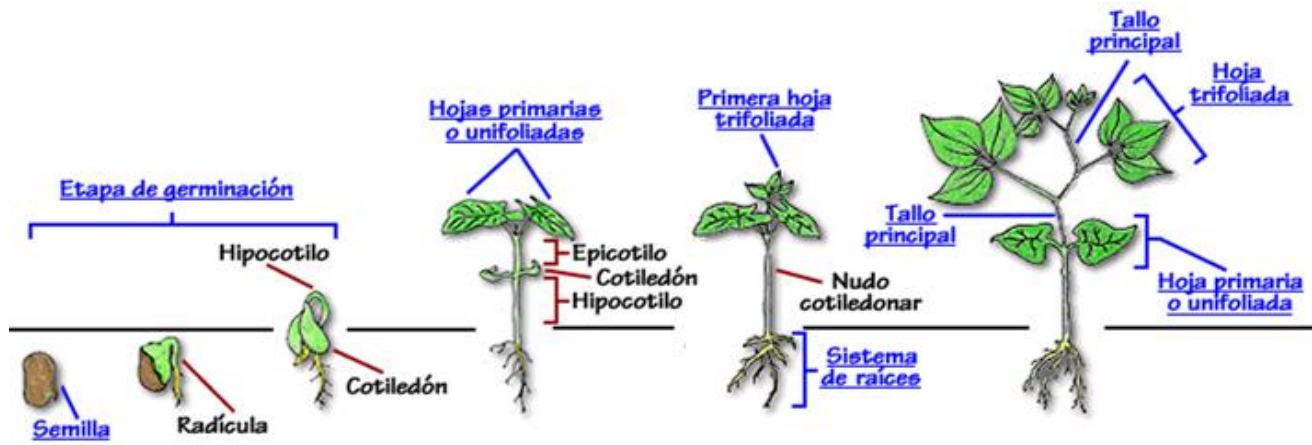


Figura 1. Etapas de desarrollo del frijol en fase vegetativa  
[http://www7.uc.cl/sw\\_educ/cultivos/legumino/frejol/bibliogr.htm](http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/legumino/frejol/bibliogr.htm)

La fase reproductiva (Figura 2) inicia con la aparición de los primeros botones o racimos florales y termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la cosecha; a pesar de ser esta fase eminentemente reproductiva durante ella las variedades indeterminadas continúan, aunque con menor intensidad produciendo estructuras vegetativas (Fernández *et al*, 1986).

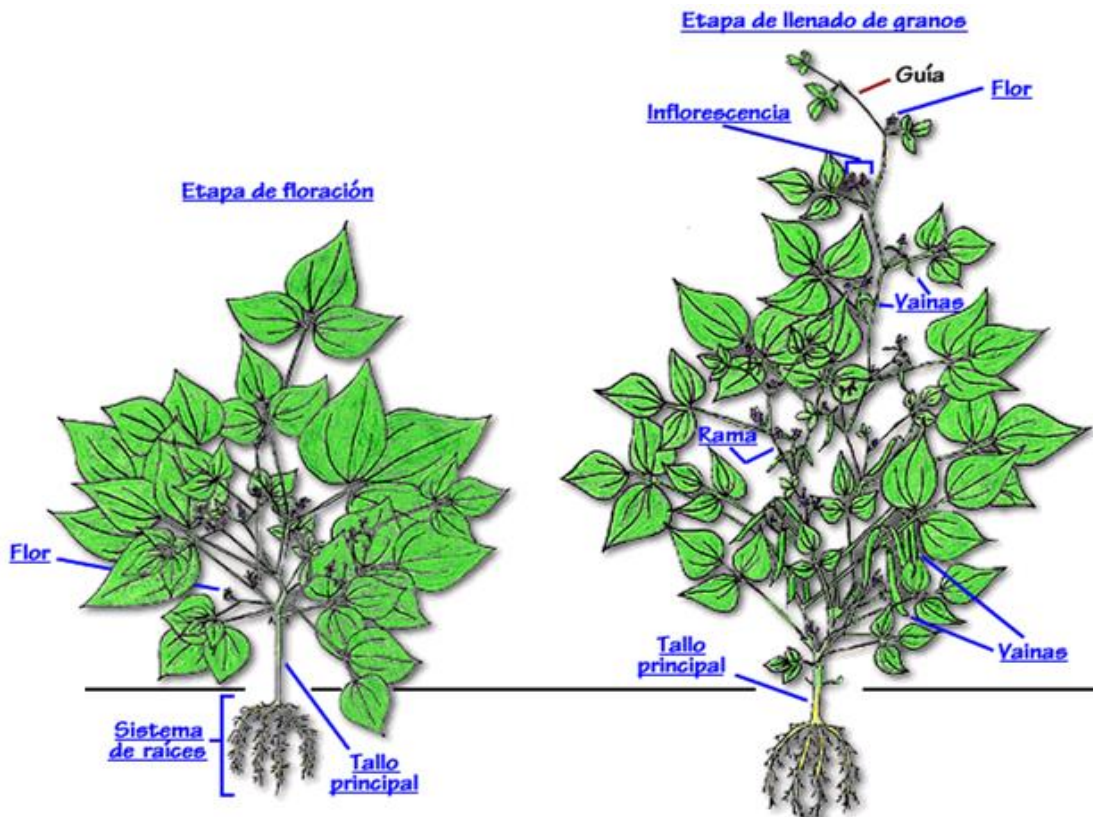


Figura 2. Etapas de desarrollo del frijol en fase reproductiva  
[http://www7.uc.cl/sw\\_educ/cultivos/legumino/frejol/bibliogr.htm](http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/legumino/frejol/bibliogr.htm)

El frijol tiene una gran adaptabilidad y variabilidad morfológica y se cultiva tanto en el trópico como en zonas templadas. Su ciclo vegetativo puede variar de 80 días en las variedades precoces, hasta 180 en las trepadoras. Sus métodos de cultivo son muy diversos, pues puede cultivarse como monocultivo, en asociación o en rotación. La sucesión y duración de la emergencia, la floración y la madurez fisiológica están determinadas genéticamente en cada variedad, y pueden verse afectadas en cierto grado por la temperatura, la humedad y la duración e intensidad de la luz, principalmente (Fernández *et al*, 1986; Treviño y Rosas, 2013). Destaca por su importancia socioeconómica y por la superficie destinada para su producción. Este se consume principalmente como grano maduro, aunque también como semilla inmadura o como vegetal (hojas y vainas). Existen otros factores que hacen que el frijol tenga importancia socioeconómica, uno de los cuales es su composición nutricional, ya que es una fuente de proteínas y minerales, como el zinc y el hierro. La semilla contiene entre 20% y 25% de proteína, sobresaliendo por su abundancia la faseolina, que posee un alto contenido de aminoácidos esenciales, como la lisina y el triptófano (Treviño y Rosas, 2013).

Independientemente de la variedad, la producción del frijol común en México está comprometida por una serie de factores bióticos y abióticos. Los principales factores bióticos que merman la producción incluyen las enfermedades causadas por hongos y, en menor grado, las producidas por bacterias, virus, gusanos, plagas y malezas (CESAVEG, 2011). Entre los principales factores abióticos que afectan al cultivo, se encuentran la temperatura, la disponibilidad de agua y la salinidad de los suelos (Moreno, 1998).

En México, el frijol se produce en los ciclos agrícolas primavera-verano y otoño-invierno. Se ha observado que en el ciclo otoño-invierno la producción es más baja (INEGI, 2015). Esto puede deberse a que el cultivo de frijol es sensible a la salinidad y las bajas condiciones de humedad residual. En condiciones de humedad bajas, los efectos de la salinidad incrementan, debido a que la evapotranspiración excede la precipitación, por lo que la concentración salina aumenta y las sales de menor solubilidad precipitan (Ayers y Westcot, 1987; Martínez *et al*, 2011; Chulim *et al*, 2014).

La problemática de la distribución y extensión de suelos con problemas de salinidad en México se ha incrementado en áreas de riego en las zonas áridas (Martínez *et al*, 2011). De manera simultánea, la calidad del agua de riego en estas áreas se deteriora progresivamente debido al exceso de sales y como consecuencia del mal manejo del agua y del suelo, así como también el no tomar en cuenta factores que promueven la acumulación de sales, el proceso de salinización de suelos se acelera y se agrava, conduciendo a un deterioro progresivo de los suelos por salinización y como consecuencia genera una disminución en el rendimiento y la calidad de las cosechas (Carter, 2002).

## 1.2 Efectos de la salinidad en plantas

El estrés salino, junto con el estrés hídrico, son los principales factores abióticos que afectan la productividad agrícola, debido a que la mayoría de las plantas cultivadas son sensibles a estas condiciones (Martínez *et al*, 2011). La salinización de los suelos es el proceso de acumulación de sales solubles en agua. Esto puede ocurrir de forma natural, asociado a condiciones climáticas de aridez y en presencia de materiales originales ricos en sales, o tener origen antropogénico, causado por el riego prolongado con aguas con elevado contenido de sales, bajo climas secos o con una baja precipitación (Carter 2002; Martínez *et al*, 2011). Para propósitos de definición, un suelo salino es aquel que tiene una conductividad eléctrica mayor a 4 decisiemens por metro (dS/m) a 25°C (Richards, 1954). Este valor es comúnmente citado alrededor del mundo. Sin embargo, debido a que la salinidad también depende de la distribución de las sales en el suelo, el contenido de agua y las prácticas agrícolas, incluido los métodos de irrigación, el comité de terminología de la Sociedad de la Ciencia del Suelo de América (SSSA, por sus siglas en inglés) redujo el límite a 2 dS/m (FAO, 1988).

Muchos procesos en las plantas se ven afectados por el estrés salino, tales como la germinación, el crecimiento, la fotosíntesis, la producción de pigmentos fotosintéticos, lo que puede derivarse en un desbalance nutrimental, estrés oxidativo e incluso la muerte de la planta (Parihar *et al*, 2015). Los efectos del estrés salino están divididos en tres categorías que interactúan entre sí (Figura 3): efectos en la relación hídrica, efectos nutricionales y efectos en el balance de energía. Además, estos efectos pueden variar de una especie a otra, así como en una misma especie dependiendo de las condiciones ambientales (Pasternak, 1987).

El principal efecto del estrés salino sobre la relación hídrica en plantas se ve reflejado sobre la reducción de la capacidad de absorción de agua de la planta. Esta se puede manifestar en la reducción de la expansión foliar y pérdida de turgencia, es decir, una célula vegetal expuesta a un medio salino equilibra su potencial hídrico perdiendo agua, lo que produce la disminución del potencial osmótico (Leidi y Pardo, 2002).

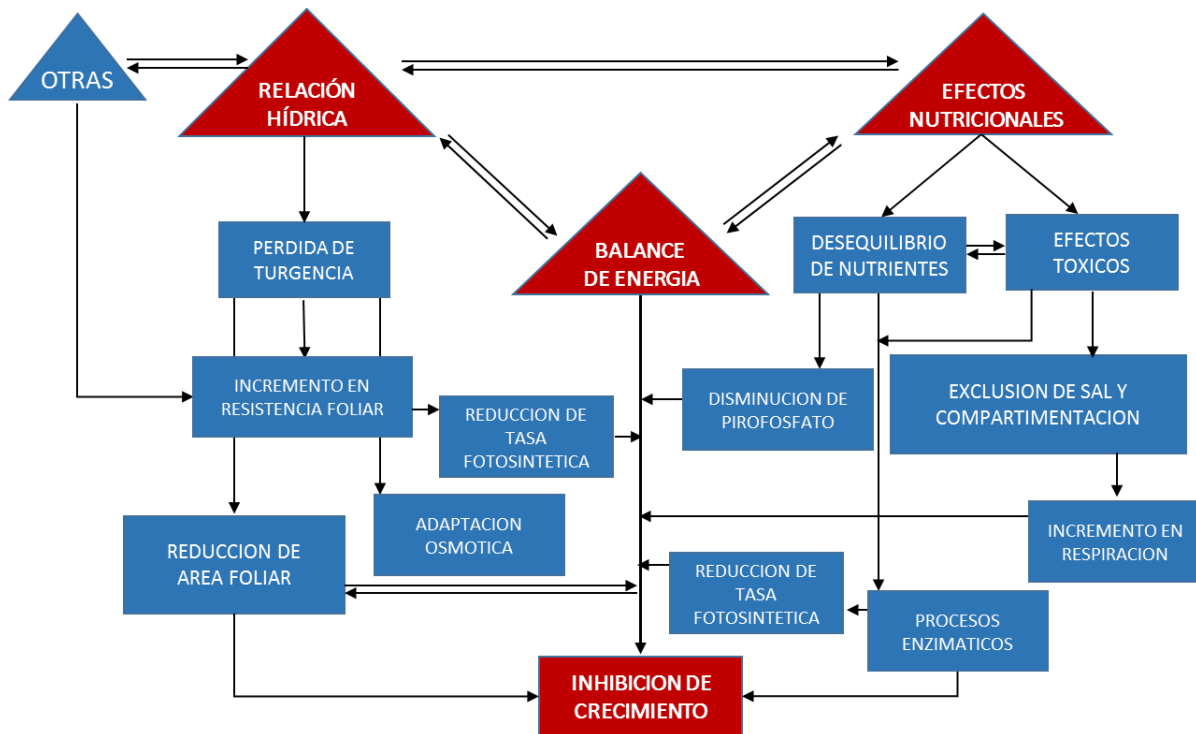


Figura 3. Efectos de del estrés salino en las plantas (Tomada de Pasternak, 1987)

En relación con los efectos causados por el estrés salino sobre la nutrición de las plantas, se observan dos efectos: la absorción excesiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con la absorción de los nutrientes esenciales que requiere la planta (Stoeva y Kaymakanova 2008; Quintana *et al*, 2016). La toxicidad metabólica del sodio está asociada con perturbaciones en la membrana celular y con la competencia por los sitios del enlace del potasio (K), esencial para el metabolismo. Una alta concentración de sodio desplaza los iones de calcio de los sitios de enlace de la membrana celular en la raíz y altera su permeabilidad, lo que causa una salida de potasio de las células y favorece la entrada del sodio (Leidi y Pardo, 2002). Al deteriorarse la selectividad de la membrana por efecto del sodio, se favorece la acumulación pasiva del mismo en raíces y tallos. Por consecuencia, las elevadas concentraciones de sales en el suelo inhiben el crecimiento de las plantas por causa de una acumulación de iones en cantidades tóxicas y la reducción de la disponibilidad de nutrientes (Garzón y García, 2011).

La adaptación de las plantas bajo estrés salino tiene como consecuencia la reducción del crecimiento de las plantas, esto debido principalmente a una alteración en la tasa fotosintética y en el metabolismo de los carbohidratos y su posterior distribución. La reducción de las tasas fotosintéticas en plantas sometidas a

estrés salino se produce debido a la pérdida del potencial hídrico, así como también y a la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los cloroplastos, a un aumento en la actividad de la enzima clorofilas, afectando la síntesis de clorofilas (Argentel *et al*, 2009).

Además del impacto directo de la salinidad, la exposición de una planta a altos niveles salinos desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Parihar *et al*, 2015). El estrés salino puede conducir al cierre de estomas, lo cual reduce la disponibilidad del dióxido de carbono en las hojas e inhibe la fijación de carbono, exponiendo a los cloroplastos a una excesiva energía de excitación que en consecuencia incrementa la producción de ERO, como el superóxido, hidroxilo y peróxido, que causan la peroxidación de los lípidos de la membrana, la oxidación de las proteínas y daño a los ácidos nucleicos (Gama *et al*, 2007; Quintana *et al*, 2016).

### 1.3 Mecanismos de tolerancia a salinidad en plantas

Se ha observado que, bajo condiciones salinas, muchas plantas presentan mecanismos que les permiten tolerar la salinidad. Recientemente Munns y Tester (2008), mencionan que, a nivel general, la respuesta de las plantas a la salinidad puede ser descrita de dos fases principales:

La primera se basa en el impedimento de la entrada de sales a la planta, mientras que la segunda minimiza la concentración de sales dentro de la planta a través de diferentes mecanismos. A grandes rasgos, la primera fase es independiente del ion salino, ocurre en minutos o días, y está relacionada a la detección y señalización del  $\text{Na}^+$ . En esta primera fase, los efectos del  $\text{Na}^+$  en las relaciones hídricas son importantes ya que causa el cierre de estomas y la inhibición de la expansión foliar. La segunda fase, es una respuesta dependiente al ion salino, se desarrolla en un periodo más largo (días a semanas) e involucra la acumulación de iones en las plantas a concentraciones tóxicas, particularmente en hojas maduras, causando una senescencia prematura y reduciendo el rendimiento de la planta o causando la muerte. Asimismo, algunos de los mecanismos utilizados en estas fases se describen brevemente a continuación:

**Toma de sodio en raíces.** Las raíces son el primer sitio de contacto con las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  del suelo y, por consiguiente, de su toma o absorción. El  $\text{Na}^+$  entra a la raíz en forma pasiva desde el medio ambiente externo al citoplasma de las células epidérmicas y del córtex. La entrada pasiva de  $\text{Na}^+$  a la raíz depende del gradiente de concentración y la diferencia de potencial a través de la membrana plasmática.

Las células epidérmicas constituyen la primera barrera para el movimiento de iones en la raíz. Esta barrera permite a la mayoría de las plantas excluir alrededor del 98% de las sales en la solución del suelo, permitiendo que sólo el 2% de las sales entren al xilema. Posteriormente, el  $\text{Na}^+$  es transportado hacia el xilema de la raíz por la vía del apoplasto y el simplasto. Una vez en el xilema, es transportado hacia los brotes por la corriente de transpiración y flujo del xilema (Munns y Tester, 2008; Parihar *et al*, 2015)

**Acumulación de solutos compatibles.** Uno de los mecanismos para mantener estables las condiciones intracelulares bajo condiciones de estrés salino o hídrico, es incrementar el potencial osmótico de la planta a través de la acumulación de osmolitos tales como: azúcares (fructosa, sucrosa y glucosa), polialcoholes (manitol, glicerol e inositol), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa, otros), y algunos aminoácidos o derivados de aminoácidos (prolina, glicina-betaína, alanina-betaína ), los cuales conducen a diversas respuestas adaptativas relacionadas al uso eficiente del agua y mantener la turgencia celular (Mass, 1990; Kaymakanova y Stoeva, 2008).

**Distribución y transporte de sodio a larga distancia.** La translocación de  $\text{Na}^+$  de las raíces a las hojas es una importante estrategia de las plantas bajo estrés salino. La exclusión de sales en la planta previene la acumulación de sales en los tejidos fotosintéticos a través del control del transporte del  $\text{Na}^+$  en el xilema de la raíz. En las plantas, la vía apoplástica, permite el movimiento de iones de  $\text{Na}^+$  hacia xilema a través de la pared celular y espacios intercelulares sin atravesar la membrana plasmática. Mientras que por la vía simplástica involucra proteínas integrales de membranas como los transportadores de  $\text{K}^+$  de alta afinidad (HKT) (Parihar *et al*, 2015).

**Compartimentación de sodio.** Un mecanismo para mantener niveles bajos de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma es su secuestro dentro de vacuolas. La compartimentación celular puede estar asociada con la succulencia, para proveer de un gran volumen a las vacuolas en donde el  $\text{Na}^+$  pueda ser almacenado. Durante este proceso, el sodio es acumulado y depositado en un gradiente a lo largo de su eje de crecimiento, con la mayor concentración depositada en las partes jóvenes de las hojas, donde es secuestrado dentro de la gran vacuola central de las células (Flowers y Yeo, 1986).

Otros mecanismos se relacionan con cambios anatómicos como respuesta para contrarrestar los efectos negativos de las sales. Como la formación de tricomas glandulares (Garzón y García, 2011) que se cree tienen un papel en la secreción del exceso de sales, así como, células “vejiga” que funcionan como reservorios de

agua para las células fotosintéticas (mesófilo) que se encuentran dentro de la hoja (Barkla *et al*, 2007).

#### 1.4 *P. vulgaris* bajo estrés salino

Se ha reportado que la salinidad afecta no solo a cultivos de interés alimenticio, sino también a muchos otros tipos de plantas (FAO, 1988). En este aspecto, el cultivo de frijol ha sido identificado como sensible a la salinidad, demostrándose que diferentes concentraciones de sales afectan la etapa y tasa de germinación, la longitud del tallo y el tamaño de las hojas (Chulim *et al* 2014), observándose que la variabilidad de la respuesta se amplía más entre especies y variedades (Kaymakanova, 2008).

En el aspecto agrícola, la producción de biomasa y relación raíz/follaje son criterios comúnmente utilizados para seleccionar individuos con tolerancia a la salinidad, ya que el efecto inhibitorio que causa el estrés salino sobre estas variables de crecimiento es más notable en cultivos sensibles a la salinidad, que en los tolerantes de la misma especie (Moreno 1998; Gama *et al*, 2007). Argentel *et al* (2009), menciona que un cultivo puede clasificarse como sensible a salinidad como consecuencia de una drástica disminución en el peso seco al tener una concentración arriba de 20 mM de NaCl. Como se mencionó previamente, el cultivo de frijol es sensible a la salinidad ya que puede reducir su rendimiento hasta en un 50%, cuando se presenta una conductividad eléctrica (CE) del suelo  $\geq 2$  dS/m, equivalente a 20 mM de NaCl (Quintana *et al*, 2016). Sin embargo, tanto en este como en otros cultivos, las adaptaciones estructurales ante el estrés salino varían entre especies y genotipos de una misma especie. En el caso de *P. vulgaris*, existen estudios (França *et al*, 2007; Chulim *et al*, 2014) que han mostrado que concentraciones de sales mayores que 50 mM de cloruro de sodio (NaCl) afectan la capacidad de germinación de las semillas, así como también, la longitud de tallo, el peso fresco y seco de la plántula, los cuales disminuyen conforme aumenta la concentración de sales (Gama *et al*, 2007). Diversos estudios (González *et al*, 2006; França *et al*, 2007; Chulim *et al*, 2014) han demostrado diferentes grados de afectación debido al estrés salino, dependiendo de la variedad de *P. vulgaris* (Tabla 1).

Strogonov (1964) y Mass (1990), coinciden en que el efecto más común de la salinidad en *P. vulgaris* es el retraso general del crecimiento de la planta. Cuando la concentración de sales aumenta arriba del nivel límite de tolerancia (2 dS/m), la velocidad del crecimiento y el tamaño de la mayoría de las variedades decrecen progresivamente.

Tabla 1. Porcentaje de germinación (%) en diversas variedades de *P. vulgaris* bajo estrés salino.

Variedad de <i>P. vulgaris</i>	Concentración de NaCl	
	50 mM	100 mM
Azufrado <sup>a</sup>	75	70
Negro <sup>a</sup>	66	52
Pinto <sup>a</sup>	59	46
Carioca <sup>b</sup>	33	22
Mulatinho <sup>b</sup>	22	66
Canario-60 <sup>a</sup>	18	17
Pinto-Villa <sup>a</sup>	17	33

Tomada de González *et al*, 2006<sup>a</sup>; França *et al*, 2007<sup>b</sup>; Chulim *et al*, 2014<sup>c</sup>.

### 1.5 Microorganismos endófitos

El término endófito fue acuñado por Anton de Bary en 1886, para describir “microorganismos que colonizan los tejidos internos de brotes y hojas (Wilson, 1995). Esta definición fue revisada posteriormente para especificar que las infecciones causadas por los endófitos son asintomáticas. Éstos pueden colonizar todos los tejidos internos de su hospedero, sin dañar o provocar una respuesta en los sistemas de defensa, además de que los endófitos pueden no permanecer como tal durante todo su ciclo de vida (Porrás y Bayman, 2011).

Los microorganismos endófitos han sido aislados de casi todas las plantas conocidas hasta la fecha. De acuerdo con sus estrategias de vida, los microorganismos endófitos se han clasificado como obligados o facultativos, sin causar daño alguno a la planta. Los primeros dependen estrictamente de la actividad de la planta para su sobrevivencia y crecimiento, mientras que los endófitos facultativos son aquellos que, en una etapa de su ciclo de vida, pueden existir fuera de la planta hospedera, principalmente en el suelo, para luego ingresar en la planta por las grietas existentes en las uniones de las raíces laterales (Nair y Padmavathy, 2014; Hardoim *et al*, 2015).

Este tipo de microorganismos exhiben interacciones complejas y se ha demostrado que tienen la capacidad de conferir potencial adaptativo a las plantas hospederas como: (i) la promoción del crecimiento vegetal por efecto de la producción de reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, citocininas y giberelinas (Kumar *et al*, 2016; Waqas *et al*, 2012); (ii) la mitigación de diversos tipos estrés vegetal, como el estrés

hídrico o salino (Kumar *et al*, 2016; Khan *et al*, 2012); (iii) el suministro de nutrientes por la fijación o movilización de nitrógeno o fósforo (Nóbrega *et al*, 2015; Kumar *et al*, 2016); así como, (iv) la capacidad de conferir protección contra insectos y patógenos mediante la inducción de mecanismos de defensa, por antagonismo o parasitismo, (v) la producción de metabolitos secundarios y (vi) la inducción del sistema de defensa del hospedero (Porrás y Hayman, 2011; Reinhold y Hurek, 2011).

### **1.5.1 Hongos endófitos**

Aunque actualmente solo se han descrito alrededor de 100,000 especies de hongos, probablemente existen muchos más, estimándose alrededor de 1,500, 000 aun por describir. Los hongos asociados a plantas usualmente se encuentran divididos en cinco grupos funcionales: micorrizas, patógenos, epífitos, endófitos y saprofitos (Porrás y Bayman, 2011). Los hongos endófitos poseen una gran biodiversidad, ya que han sido encontrados en prácticamente todas las plantas leñosas examinadas (Saikkonen *et al*, 2004), así como también en especies de importancia agrícola, pudiéndose encontrar hasta 90 especies diferentes de endófitos en una sola hoja de un árbol tropical (Bayman, 2006) y hasta 50 géneros relacionados en raíces y tallos. Sin embargo, algunos endófitos son específicos de algunos tejidos u hospederos (Rodríguez *et al*, 2009; Behie *et al*, 2015).

La aplicación de hongos que se asocian con plantas, sean endófitos o no, puede tener efectos directos e indirectos sobre el crecimiento de su hospedero. Entre los efectos directos, se encuentra la formación de metabolitos, como hormonas de crecimiento y una mayor transferencia de minerales hacia la rizósfera (Sasan y Bidochka, 2012). De manera indirecta, los hongos pueden ser responsables de la inducción de los mecanismos de defensa de la planta (Rodríguez *et al*, 2009). Otro mecanismo importante para la promoción del crecimiento vegetal por hongos es contrarrestar microorganismos nocivos asociados a la rizósfera (Sasan y Bidochka, 2013).

En general, se han reconocido dos tipos principales de hongos endófitos, reflejando esta clasificación las diferencias en su relación evolutiva, taxonomía, plantas hospederas y funciones ecológicas: los endófitos clavicipitaceos, que infectan pastos, y los endófitos no clavicipitaceos, que pueden ser recuperados de tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodríguez *et al*. 2009). Las investigaciones de los efectos de los hongos endófitos se han concentrado en los efectos que estos tienen sobre los insectos herbívoros y algunos patógenos (Sasan y Bidochka, 2013). Algunos endófitos

pertenecen a diversos géneros que incluyen a hongos entomopatógenos, los cuales han sido aislados de diferentes tipos de plantas, así como también, inoculados al depositar una suspensión de las esporas del hongo en la radícula de la planta a infectar posterior a la germinación (Vega *et al*, 2008). Aunque muchas publicaciones relacionadas con este tema involucran a *Beauveria bassiana* como un hongo endófito, se ha demostrado que otros entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *Cladosporium sp* pueden ser bifuncionales, es decir, pueden actuar como patógenos de insectos, así como también ser endófitos de plantas, confiriéndoles protección contra diferentes tipos de estrés biótico o abiótico (Bonilla, 2012).

En este aspecto, el género *Metarhizium* es el micoinsecticida más intensamente estudiado en la familia de los *Clavicipitaceae*, el cual ha sido usado a gran escala en diferentes países (Padilla *et al*, 2000). El amplio rango de insectos que son afectados por el género *Metarhizium* lo hace comercialmente atractivo como agente de control biológico (García *et al*, 2013). Entre los órdenes afectados están Coleóptero, Hemíptera, Lepidóptera, Ortóptera, así como también algunas especies de arañas y camaleones (Kepler *et al*, 2014). *Metarhizium anisopliae*, antes conocido como *Entomophthora anisopliae*, está clasificado en el reino Fungi, phylum *Ascomycota*, clase *Sordariomycetes*, orden *Hypocreales*, familia *Clavicipitaceae*. Es capaz de prosperar en el suelo o sobrevivir de forma latente en espera de un hospedero susceptible. Es un hongo con reproducción asexual a través de conidios. Los conidios son ovalados a cilíndricos, truncados en ambos extremos, con un tamaño que varía entre 3.5 y 9  $\mu$  de largo, las colonias del hongo exhiben formas variadas y matices de color verde (Kepler *et al*, 2014). La evidencia del ataque de *M. anisopliae* sobre insectos, en condiciones naturales, ha sido descrita como “muscardina verde” en más de 200 especies de insectos, exhibiendo diferentes grados de especificidad, la cual está influenciada por las características del patógeno y de la cutícula del hospedero. Esto es debido a que este hongo entomopatógeno produce alrededor de 27 tipos de destruxinas, swainsonina y citocalasina C, que son compuestos con actividad biológica contra un amplio rango de insectos (García *et al*, 2013). Durante la patogénesis, *M. anisopliae* secreta enzimas que pueden degradar los polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina), permitiendo el aprovechamiento de nutrimentos para su crecimiento (Padilla *et al*, 2000; Behie *et al*, 2015). También se ha reportado que *Metarhizium spp.* presenta antagonismo contra algunos microorganismos patógenos y puede colonizar las raíces de las plantas (Sasan y Bidochka, 2012). Pero *M. anisopliae* no solo funciona como un agente de control biológico. Recientes estudios han demostrado que una característica de este hongo como organismo endófito es conferirles a las plantas hospederas tolerancia a condiciones de estrés como salinidad (Khan *et al*, 2012), altas temperaturas y radiación UV (Rangel *et al*, 2008).

### 1.5.2 Bacterias endófitas

Al igual que los hongos endófitos, las bacterias endófitas habitan dentro de los tejidos de las plantas al menos durante una parte de su ciclo de vida sin causar daño alguno a su hospedero. Desde los primeros reportes de bacterias endófitas, se han reportado más de 200 géneros de 16 divisiones, los cuales incluyen bacterias cultivables y no cultivables. Sin embargo, las bacterias endófitas más predominantes y estudiadas pertenecen a tres divisiones: *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Reinhold y Hurek, 2011). Muchos géneros pertenecientes a estas divisiones son comunes en el suelo/rizósfera y tienen la capacidad de colonizar diferentes tipos de tejido, como el espacio intracelular de la pared vegetal y el xilema, así como también órganos reproductores, como flores, frutos y semillas en donde producen diversos compuestos como antibióticos y metabolitos secundarios (Reinhold y Hurek, 2011). Estos compuestos pueden promover el crecimiento vegetal, actuar como un agente de biocontrol sobre una gran cantidad de fitopatógenos (Chanratana *et al*, 2017), mejorar la eficiencia de los procesos de fitorremediación de compuestos tóxicos en la rizósfera, mejorar la fijación de nitrógeno y balancear el ciclo del carbono (Nair y Padmavathy, 2014), además de la posibilidad de su uso como bioinoculantes, una alternativa ambientalmente amigable al uso indiscriminado de fertilizantes químicos y plaguicidas (Kumar *et al*, 2016).

Existe un grupo importante de bacterias, denominado metilótrofos, compuesto por bacterias Gram negativas que, generalmente poseen una pigmentación color rosa debido a la síntesis de carotenoides. Debido a esto, a estas bacterias se les conoce como metilótrofos facultativos rosas. Los metilótrofos están clasificados en tres subgrupos, en función del sustrato que utilizan: 1) metilótrofos que usan compuestos de un carbono (C1), llamados obligados, 2) metilótrofos que usan un rango limitado de compuestos de más de un carbono, denominados facultativos, y 3) metilótrofos capaces de crecer en un amplio rango de compuestos carbonados complejos pero que son menos restrictivos que los facultativos. Estas bacterias son capaces de penetrar en la planta, generalmente a través de las raíces y colonizar al hospedero (Omer *et al*, 2004; Rekadwad *et al*, 2014). Debido a su gran plasticidad fenotípica, los miembros de este género pueden establecerse en diferentes hábitats como el suelo, la superficie de las hojas, nódulos, semillas y en el aire (Nóbrega *et al*, 2015), sin mostrar actividad fitopatógena (Meena *et al*, 2012), y pueden asociarse con diversas funciones (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la asociación endófitas de bacterias metilótrofas con diversos cultivos

Cultivo	Metilótrofo asociado	Fuente	Efecto
Trigo	<i>Methylobacterium oryzae</i>	Filósfera	Producción de ácido indolacético (AIA)
Arroz	<i>M. extorquens, M. fujisawaense</i>	Filósfera	Producción de AIA
Caña de azúcar	<i>M. oryzae</i>	Rizósfera	Producción de AIA, actividades promotoras de crecimiento vegetal
Arroz	<i>M. oryzae</i> CBMB-20, <i>M. oryzae</i>	Rizósfera	Fijación de N <sub>2</sub>
	<i>M. suomiense</i>	Rizósfera	Colonización de raíces
Pimiento rojo	<i>M. oryzae</i>	Filósfera	Producción de AIA y citocininas
	<i>M. oryzae</i>	Rizósfera	Biofertilizante
Tomate	<i>M. suomiense</i>	Rizósfera	Colonización de raíces
Soya	Metilótrofo facultativo pigmentado de color rosa	Filósfera	Producción de AIA
Maní	Metilótrofo facultativo pigmentado de color rosa	Filósfera	Producción de AIA
Frijol mungo	<i>M. organophilum</i>	Suelo	Biofertilizante
Frijol mungo	Metilótrofo facultativo pigmentado de color rosa	Filósfera	Biofertilizante

Modificada de Kumar *et al*, 2016.

Varios estudios han demostrado los efectos positivos en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y el aumento a la tolerancia de algunos metales pesados al utilizar *Methylobacterium* spp (Nóbrega *et al*, 2015). Algunos de los mecanismos por medio de los cuales *Methylobacterium* spp. estimula el crecimiento vegetal, están relacionados a la disponibilidad de nutrientes originados de procesos, como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, el amortiguamiento del estrés mediante la modulación en la expresión de ACC desaminasa, la producción de fitohormonas, entre otros (Kumar *et al*, 2016), además de que estos mecanismos también influyen en la iniciación floral y promueven el establecimiento y crecimiento de frutos (Nóbrega *et al*, 2015). Un ejemplo de esto es *Methylobacterium oryzae*, la cual se ha encontrado formando asociaciones endófitas con más de 70 especies de plantas, colonizando activamente raíces, tallos y hojas (Kumar *et al*, 2016). Presenta algunos beneficios como la promoción del crecimiento vegetal, debido a la producción de hormonas vegetales como auxinas y citocininas, así como a su capacidad para fijar nitrógeno (Patt *et al*, 1976; Omer *et al*, 2004).

## 1.6 Efecto de los microorganismos endófitos en plantas bajo estrés salino.

Poco se conoce sobre el mecanismo de acción de los microorganismos endófitos contra el estrés salino. Khan *et al.* (2012) reportan que plantas asociadas con *M. anisopliae* bajo condiciones de estrés salino contrarrestan los efectos de la salinidad, incrementando el largo del explante y área foliar, a través de la síntesis de bajas concentraciones de ácido abscísico y altas de ácido jasmónico, el cual actúa como una molécula señalizadora de la respuesta de las plantas a condiciones de estrés como la exposición a ozono, sequía y el ataque por patógenos y plagas. Otro mecanismo de *M. anisopliae* contra el estrés salino es el aumento de la producción de prolina, la cual funciona como un antioxidante, estabilizando las estructuras celulares y permitiendo un ajuste en el potencial osmótico; lo anterior mantiene niveles bajos de malondialdehído, lo cual se traduce en una mejor integridad membranal (Turkal y Demiral, 2009; Azad y Kaminskyj, 2016).

Estudios recientes (Giri *et al.*, 2013; Chanratana *et al.*, 2017) han demostrado que, aunque en general *Methylobacterium* spp. no crece bien bajo condiciones de estrés salino, su desempeño varía de acuerdo con la concentración de NaCl a la que se expone. Chanratana *et al.* (2017) encontraron que en concentraciones entre 50mM y 100 mM de NaCl, *M. oryzae* tiene una supervivencia significativamente alta en comparación con los controles (0 mM), aun en exposiciones prolongadas (más de 72 horas). Este resultado se atribuyó a que cuando *M. oryzae* es expuesta a concentraciones de hasta 100 mM de NaCl incrementa la producción de exopolisacáridos, ácido polihidroxitúrico, AIA, ACC desaminasa y prolina, así como también la producción de biopelículas. Además, también se ha encontrado que puede formar asociaciones endófitas con algunos cultivos aún bajo condiciones salinas (Lee *et al.*, 2015).

## 2 JUSTIFICACIÓN

La evidencia de los diversos efectos positivos que los microorganismos endófitos tienen sobre sus hospederos ha conducido la búsqueda de vías alternas para mejorar la fertilidad del suelo, la producción de cosechas y la eliminación de enfermedades de manera sostenible.

En relación con los microorganismos endófitos utilizados en el presente trabajo, se ha comprobado que diferentes especies de *Metarhizium*, en asociaciones endófitas, pueden mejorar el crecimiento vegetal, la tolerancia a condiciones de estrés salino e hídrico y la resistencia a enfermedades en plantas (García *et al*, 2011; Khan *et al*, 2012; Sasan y Bidochka, 2012). En el caso del género *Methylobacterium*, se ha demostrado la mejora del crecimiento vegetal por medio de la fijación de nitrógeno (Kumar *et al*, 2016) y la producción de fitohormonas como ácido indolacético y citocininas (Meena *et al*, 2012), así como la capacidad de proveer nutrientes en condiciones de estrés por medio de diferentes mecanismos (Rekadwad *et al*, 2014).

Todas estas características, juntas o por separado, hacen que *M. anisopliae* y *Methylobacterium oryzae* puedan promover el crecimiento vegetal de *Phaseolus vulgaris* ante condiciones adversas, como el estrés salino.

### 3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El crecimiento de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino, se verá favorecido a través de una asociación con *Metarhizium anisopliae* y/o *Methylobacterium oryzae* bajo condiciones *in vitro*.

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 General

Determinar la influencia de la asociación endófito entre *Phaseolus vulgaris* y un hongo entomopatógeno o una bacteria metilótrofa sobre el crecimiento vegetal, bajo condiciones de estrés salino.

#### 4.2 Específicos

1. Definir las condiciones nutrimentales que permitan establecer la asociación endófito de *P. vulgaris* con *M. anisopliae* y con *M. oryzae*.
2. Determinar el tiempo del establecimiento de las asociaciones planta-hongo y planta-bacteria y evaluar su naturaleza endófito.
3. Determinar el nivel de colonización de la planta por los microorganismos, en función del tiempo de contacto y de la parte de la planta.
4. Evaluar el efecto de las asociaciones *P. vulgaris*-*M. anisopliae* y *P. vulgaris*-*M. oryzae* sobre el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino.

## 5 MÉTODOS Y MATERIALES

### 5.1 Estrategia experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en dos etapas generales (Figura 4). En la primera etapa, se probaron diferentes condiciones nutrimentales para promover el crecimiento de *P. vulgaris*, e inducir la asociación endófitica con *M. anisopliae* y *M. oryzae*. Esto se realizó bajo condiciones *in vitro*, utilizando medios de cultivo con diferentes concentraciones (50 y 100%) de sales Murashige-Skoog con (5 g/L) y sin sacarosa como fuente de carbono. Con los resultados obtenidos en la primera etapa, se seleccionó el medio de cultivo con los mejores resultados en cuanto a la producción de biomasa y el establecimiento de la asociación. La segunda etapa consistió en la evaluación del efecto de la asociación sobre el crecimiento *in vitro* de *P. vulgaris* bajo condiciones de estrés salino, adicionando 30 mM de NaCl. La variable usada para analizar diferencias de crecimiento en ambos ensayos fue la biomasa en peso seco.

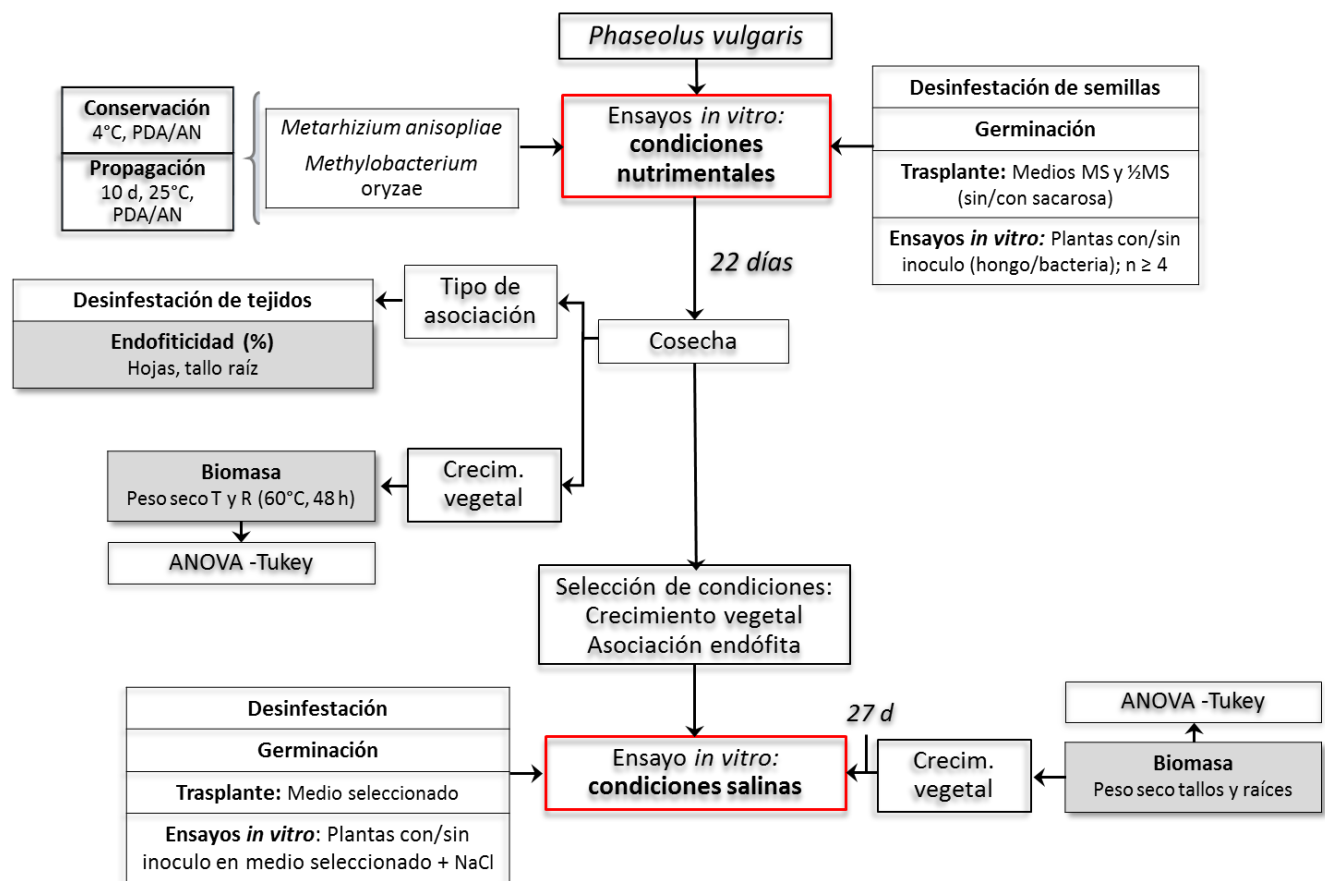


Figura 4. Estrategia experimental general. Los cuadros en rojo muestran las etapas en que se divide el ensayo, los cuadros en gris claro muestran las variables de respuesta.

## 5.2 Material biológico

### 5.2.1 Cultivo de inóculos y conservación de las cepas

***Metarhizium anisopliae*.** El hongo utilizado fue *Metarhizium anisopliae* cepa CP-OAX (Figura 5), que pertenece a la colección de hongos del Colegio de Posgraduados, México. Este hongo se identificó por análisis de secuencia de los genes ribosomales como *Metarhizium anisopliae* var. *Lepidotum* (Tlecuítl-Beristain *et al*, 2010). Para la propagación de la cepa, se utilizaron cajas de Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), las cuales fueron inoculadas por punción utilizando una aguja bacteriológica. Posteriormente, las cajas se incubaron a 25°C por 10 días, hasta la esporulación del hongo. Después de su crecimiento por 10 días, el hongo se almacenó en PDA a 4°C para su conservación.

***Methylobacterium oryzae*.** La cepa de *Methylobacterium oryzae* AMF14 (Figura 5), se aisló de raíces de *Acacia farnesiana* creciendo bajo condiciones *in vitro*. La cepa fue identificada (99% de similitud) como *M. oryzae* mediante el análisis de secuencias de nucleótidos del gen 16S rRNA (Alcántara *et al*, 2018). Para la propagación de la cepa, se utilizaron cajas de Petri con agar nutritivo (AN), las cuales fueron inoculadas por estría. Las cajas se incubaron a 25°C por 10 días. Posterior a los 10 días, la bacteria fue conservada en agar nutritivo a 4°C.

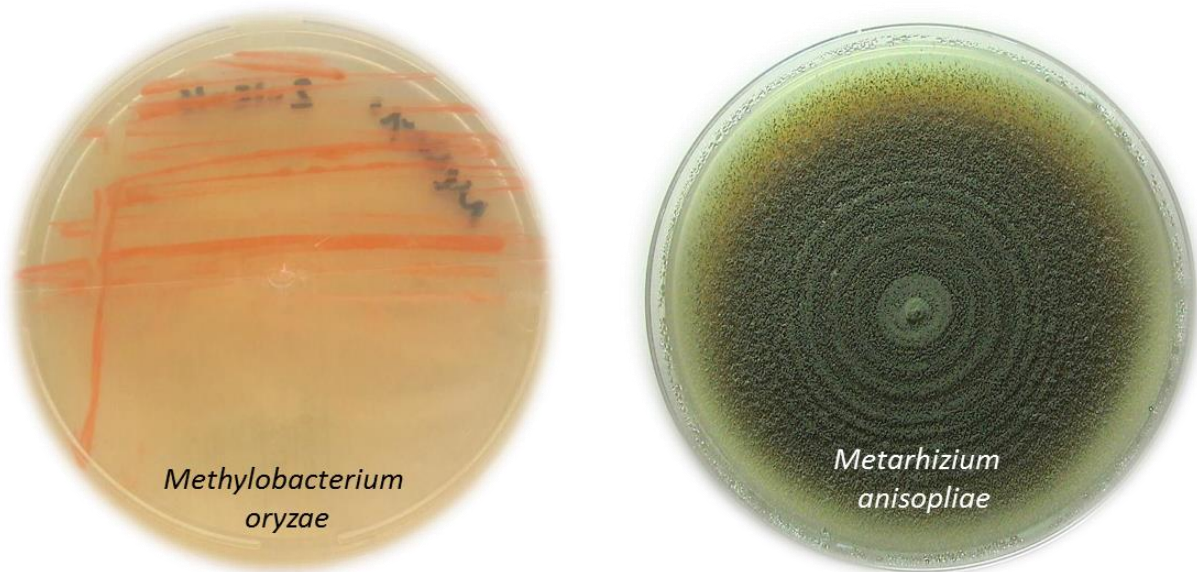


Figura 5. Cepas de *Methylobacterium oryzae* y *Metarhizium anisopliae* usadas en el estudio.

### **5.2.2 *Phaseolus vulgaris***

En el presente estudio se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* que fueron adquiridas de la zona agrícola de Cholula, Puebla y, de acuerdo con algunas de características morfológicas, se identificó como la variedad Amarillo (color amarillo a café claro, peso de 100 semillas: 31.58 g., forma ovalada o arriñonada) (Castillo *et al*, 2006) y se cultiva principalmente en los estados de Morelos, Puebla y el Estado de México. Las semillas fueron conservadas en una bolsa de plástico a temperatura ambiente hasta su uso.

### **5.2.3 Prueba de viabilidad y desinfestación de las semillas**

Previo al inicio del ensayo, se corroboró la viabilidad de las semillas. Esto se realizó mediante una prueba de flotación (FAO, 1991). Se colocó un número determinado de semillas en un vaso de precipitados con 120 ml de agua destilada, el tiempo estimado de hidratación se determinó al exponer las semillas a diferentes tiempos de remojo (10, 20, 40 y 60 min), ya que dejar demasiado tiempo en remojo la semilla, el tegumento que cubre a los cotiledones y al embrión se reblandece, ocasionando el daño del embrión al iniciarse el proceso de desinfestación. Posterior al remojo de las semillas durante 10 minutos, las semillas flotantes fueron eliminadas.

Las semillas seleccionadas mediante la prueba de flotación fueron colocadas en un vaso de precipitados y se desinfestaron de acuerdo con la metodología modificada de Sasan y Bidochka (2012) y Greenfield *et al*, (2016): (i) agitación en solución de detergente comercial marca Roma (4%), 25 min; (ii) agitación en solución de etanol (70%), 2 min; (iii) agitación en solución de hipoclorito de sodio (2%), 50 min. Posterior a cada fase, las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril hasta eliminar completamente el detergente, el etanol o el hipoclorito de sodio.

### **5.2.4 Germinación y selección de plántulas**

Una vez finalizado el proceso de desinfestación, la germinación de las semillas se llevó a cabo en cajas de Petri con agar-agua (8 g/L) y se colocaron cuatro semillas en cada caja. Las cajas de Petri con las semillas fueron colocadas en una cámara de crecimiento a 25° C con un fotoperiodo de 16 h por tres días. Transcurrido este periodo, se seleccionaron las semillas con una radícula mayor a 1 cm, para ser trasplantadas al cuarto día a los medios del ensayo. Se trasplantó una semilla por caja Magenta®.

### 5.3 Ensayos *in-vitro*

#### 5.3.1 Condiciones nutrimentales y asociación endófitas

Con el propósito de definir las condiciones nutrimentales que promovieran el crecimiento de la planta y permitiera establecer una asociación endófitas entre *P. vulgaris-M. anisopliae*, *P. vulgaris-Methylobacterium oryzae* y *P. vulgaris* con ambos microorganismos, se evaluaron cuatro medios de cultivo basados en las sales de Murashige-Skoog (MS) debido a que permite el rápido crecimiento vegetal bajo condiciones *in vitro* y es apto para la mayoría de las especies. Los componentes del medio MS, se listan a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Componentes del medio Murashige and Skoog adquirido en *Sigma-Adrich*

Componente	(mg/L)
Nitrato de amonio	1650.0
Ácido bórico	6.2
Cloruro de calcio (anhidro)	332.2
Cloruro de cobalto • 6H <sub>2</sub> O	0.025
Sulfato cúprico • 5H <sub>2</sub> O	0.025
Disodio-EDTA • 2H <sub>2</sub> O	37.26
Sulfato ferroso • 7H <sub>2</sub> O	27.8
Sulfato de magnesio (anhidro)	180.7
Sulfato de manganeso • H <sub>2</sub> O	16.9
Ácido de molibdeno (sodio sal) • 2H <sub>2</sub> O	0.25
Ioduro de potasio	0.83
Nitrato de potasio	1900.0
Fosfato de potasio monobásico	170.0
Sulfato de zinc • 7H <sub>2</sub> O	8.6
Glicina (base libre)	2.0
Mio-Inositol	100.0
Ácido nicotínico (ácido libre)	0.5
Piridoxina • HCl	0.5
Tiamina • HCl	0.1

Son requeridos 4.4 g del medio para preparar 1 L de solución

sales MS 100% - sin sacarosa (MS); sales MS 50% - sin sacarosa ( $\frac{1}{2}$ MS); sales MS 100% - 5 g/L de sacarosa (MS5); sales MS - 50% - 5 g/L de sacarosa ( $\frac{1}{2}$ MS5). El pH de los medios se ajustó a 5.7 con NaOH 1 M antes de su distribución en cajas Magenta® (75 mL por caja) y su esterilización (121 °C, 20 psi, 20 min). Cada tratamiento se evaluó con cinco replicas.

Cada unidad experimental se colocó en una cámara de crecimiento a 25° C con un fotoperiodo de 16 h por tres días después del trasplante. Una vez desplegadas las hojas primarias, los microorganismos en estudio se inocularon por punción cerca de las raíces, con una aguja microbiológica, bajo condiciones asépticas. Este procedimiento se realizó 2 veces en cada planta. Las plantas se incubaron bajo las mismas condiciones durante 15 días más y se monitorearon cada 48 horas para observar el estado de salud. Como controles, se usaron plantas crecidas bajo las mismas condiciones descritas, pero sin inocular. Se realizaron cinco replicas para cada control.

### **5.3.2 Estrés salino**

Con base en los resultados del ensayo anterior, se seleccionó el medio MS al 50% con 5 g/L ( $\frac{1}{2}$  MS5) de sacarosa para el crecimiento de las plantas y el establecimiento de las asociaciones. El ensayo de salinidad se desarrolló de manera similar al anterior. Sin embargo, cada unidad experimental contenía el medio  $\frac{1}{2}$  MS5 adicionado con 30 mM de cloruro de sodio (NaCl), para inducir el estrés salino.

### **5.4 Evaluación del crecimiento**

Después de 15 días de incubación, se cuantificó el crecimiento de *P. vulgaris* a través de la biomasa seca de tallos y raíces cada plántula. Para lo anterior, cada planta se retiró del medio de cultivo, cuidando obtener toda la zona de la rizósfera. Se realizó un lavado con agua destilada para eliminar posibles restos del medio de cultivo y se secó con un trozo de papel absorbente para eliminar el exceso de agua. Se separó el tallo de la zona de las raíces realizando un corte a 0.5 cm de distancia por encima de la última raíz lateral. Se pesó el tejido fresco de raíz y tallos, además de tomar la longitud total y contabilizar el número de hojas de cada planta. Las plantas (tallo y raíz por separado) se colocaron en una hoja de papel aluminio a peso constante. La biomasa se deshidrató a 60°C durante 48 h para determinar el peso seco.

## 5.5 Pruebas de asociación con *P. vulgaris*

Para las pruebas de asociación con *P. vulgaris*, se tomaron muestras de las plántulas a los 5, 10 y 15 días después de la inoculación con *M. anisopliae*, *M. oryzae* o la mezcla de ambos microorganismos. De cada planta, se tomaron muestras de tres tejidos diferentes (hojas, raíz y tallo). Se seleccionaron de manera aleatoria muestras de dos hojas. Con relación al tallo, se tomaron dos fragmentos de 5 cm de largo, las muestras se tomaron de la mitad de la planta y la segunda cerca de la base del tallo. Se obtuvieron tres piezas de 5 cm de longitud de diversos puntos de las raíces.

Los tejidos de plántulas se esterilizaron superficialmente, por separado, con base en la modificación propuesta por Alcántara (2013) y Greenfield *et al.* (2016). El proceso de desinfestación de los tejidos de las plantas fue específico para cada tipo de tejido (Tabla 3).

Tabla 4. Condiciones de esterilización superficial para los diferentes tejidos de *P. vulgaris*.

Tejido	Tween 80		Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)		Hipoclorito de sodio (NaClO)	
	Concentración (%)	Tiempo (min)	Concentración (%)	Tiempo (min)	Concentración (%)	Tiempo (min)
Raíz	0.05	5	70	2	2	10
Tallo	-		70	2	1.5	10
Hojas	-		70	2	1.2	10

Al finalizar la agitación en NaClO, se lavó cada muestra 3 veces con agua destilada estéril para eliminar cualquier residuo. Posterior al proceso de desinfestación, los tejidos fueron cortados en segmentos de ~1 cm, descartando las orillas, donde los endófitos pudieron ser eliminados debido al tratamiento de desinfestación (Figura 6).

Para verificar la efectividad del proceso de desinfestación, previo a la siembra de los tejidos en las placas de PDA y agar nutritivo, en una caja de Petri con el mismo tipo de medio en el cual el tejido sería incubado, se presionó cada una de las piezas de tejido sobre la superficie del medio hasta dejar la forma de ese tejido en el medio y posterior a la impresión fueron transferidos a las cajas donde finalmente se incubaron. Los fragmentos de raíz, tallos y hojas se transfirieron por separado, bajo condiciones asépticas, a cajas Petri con PDA para los tejidos inoculados con *M. anisopliae* y cajas con agar nutritivo en los tejidos con

inoculados con *M. oryzae* y la mezcla de ambos microorganismos. Las cajas de Petri con los diferentes tejidos se incubaron a 25°C y se monitorearon cada 24 horas por 15 días para observar la aparición de hifas o crecimiento bacteriano.

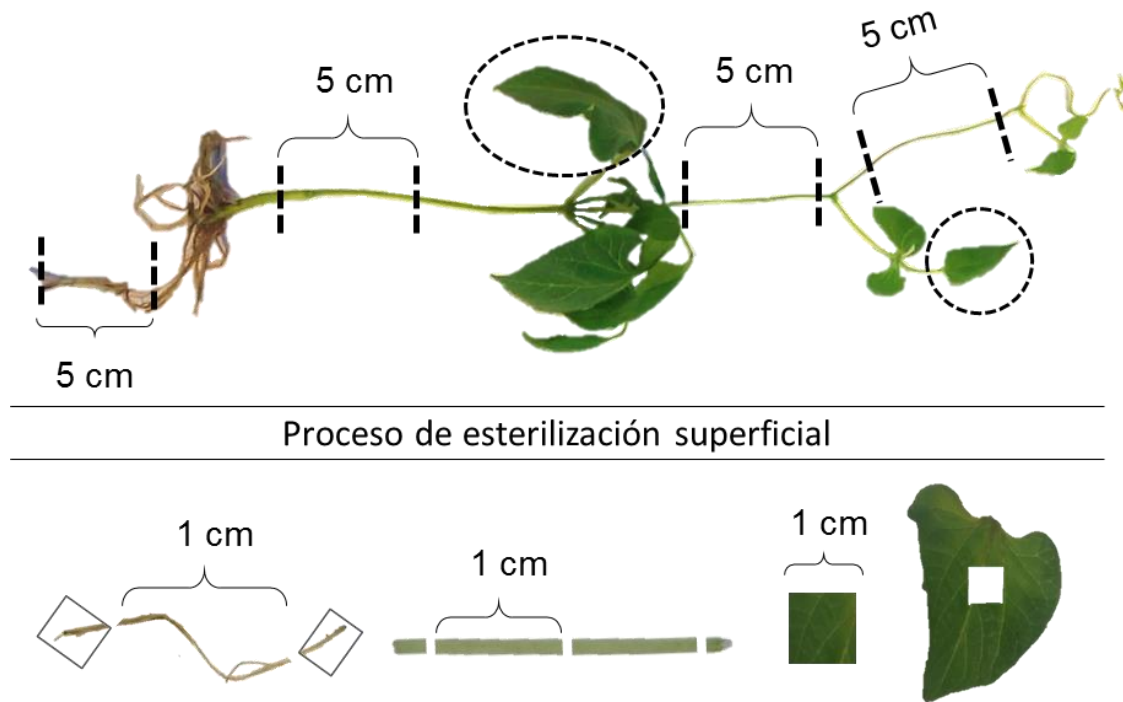


Figura 6. Cortes de los diferentes tejidos de *P. vulgaris* para la prueba de asociación.

## 5.6 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza seguido de la comparación de medias usando la prueba Tukey, así como una prueba T para corroborar diferencias entre los tratamientos. Para analizar el efecto de la inoculación de *M. anisopliae* y *M. oryzae* sobre el crecimiento de *P. vulgaris*, la variable analizada fue la producción de biomasa. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico Minitab® 17.1.0 con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección, se presentan los resultados del presente estudio, donde se definió el medio con sales MS al 100% y 5g de sacarosa como el mejor medio de cultivo para inducir la asociación endófito de *Metarhizium anisopliae* y *Methylobacterium oryzae*, juntos y por separado, con *Phaseolus vulgaris*. También pudo confirmarse la naturaleza endófito de estas asociaciones, además del tiempo en el que ésta puede

establecerse. Por último, se presentan los resultados acerca de los efectos que esta asociación bajo una condición de estrés salino.

### 6.1 Prueba de viabilidad

Posterior al proceso de desinfestación, las semillas de los tiempos de inmersión en agua destilada durante 40 y 60 minutos sufrieron oxidación en los cotiledones, por lo que estos tiempos de remojo fueron descartados para la prueba de viabilidad. Las semillas tratadas durante 10 y 20 min fueron germinadas en cajas de Petri con medio agar-agua. Trascurrido el periodo de incubación (3 días), algunas de las semillas presentaron contaminación, oxidación e inhibición en la germinación y crecimiento (Figura 7).

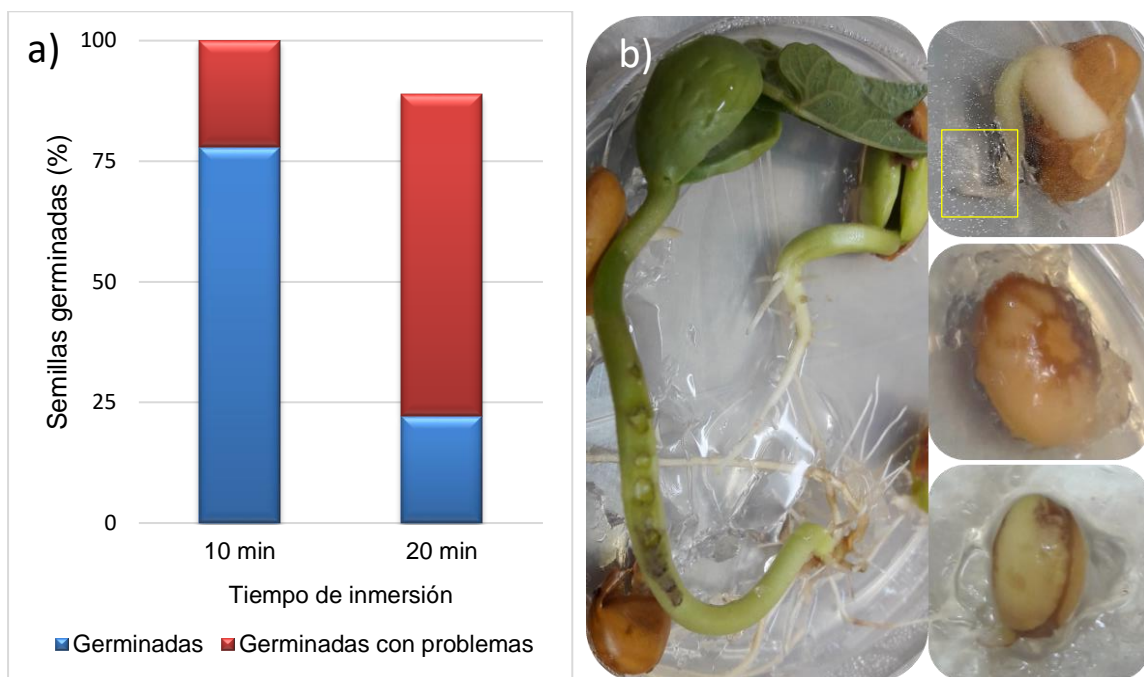


Figura 7. a) Porcentaje de germinación en semillas inmersas en agua destilada durante 10 y 20 min.

b) Daños en semillas e hipocótilos presentados después del proceso de desinfestación y germinación. El cuadro en amarillo enmarca contaminación por un hongo desconocido.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron las semillas inmersas durante 10 minutos en agua destilada para el resto de los ensayos. Este lapso de tiempo permitió la absorción de agua por la semilla sin reblandecer demasiado su tegumento (FAO, 1991) y evitar daños severos al someterlas al proceso de desinfestación, permitiendo obtener un mayor número de plántulas sanas.

## 6.2 Efecto de las condiciones nutrimentales sobre el crecimiento de *P. vulgaris*

El crecimiento de una planta generalmente es definido como un incremento irreversible en sus dimensiones. Para determinarlo suelen medirse variables relacionadas al crecimiento, como la acumulación de peso, las variaciones en altura o diámetro, o los cambios en el área foliar. En condiciones de turgencia plena, el peso fresco o húmedo es un buen estimador del volumen, ya que las variaciones en el peso específico de los tejidos vegetales son bajas. Esto es así debido a que el agua es el principal componente en casi todos los órganos y tejidos (las semillas son una notoria excepción). Sin embargo, el análisis clásico del crecimiento es un análisis de la acumulación de peso seco, ya que es un muy buen estimador del carbono total de la planta, lo que permite analizar importantes aspectos de su fisiología (Di Benedetto y Tognetti, 2016).

En relación con el desarrollo de las plantas en diferentes concentraciones nutrimentales pudo observarse, de manera cualitativa, un efecto positivo en el crecimiento de las plantas, con hojas de mayor tamaño en los medios con sacarosa (Figura 8).

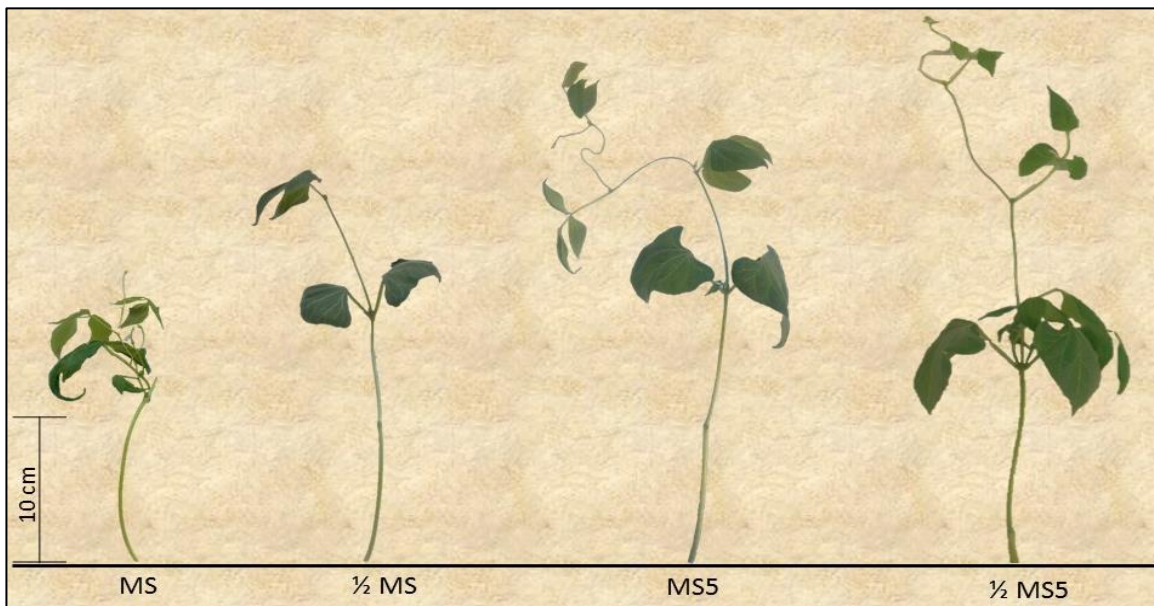


Figura 8. Biomasa fresca de plantas control de *P. vulgaris* 22 días después de la siembra. MS: medio con sales MS al 100% sin sacarosa;  $\frac{1}{2}$ MS: Sales MS al 50%, sin sacarosa. MS5: Sales MS al 100% con 5 g/de sacarosa;  $\frac{1}{2}$ MS5: Sales MS al 50%, con 5 g/L de sacarosa.

Esto se corroboró de manera cuantitativa, ya que el análisis estadístico demostró que la producción de biomasa de tallos de *P. vulgaris* aumentó significativamente (ANOVA,  $P=0.001$ ) y raíces (ANOVA,  $P=0.02$ ) en los medios a los que se adicionó 5 g/L de sacarosa (Figura 9).

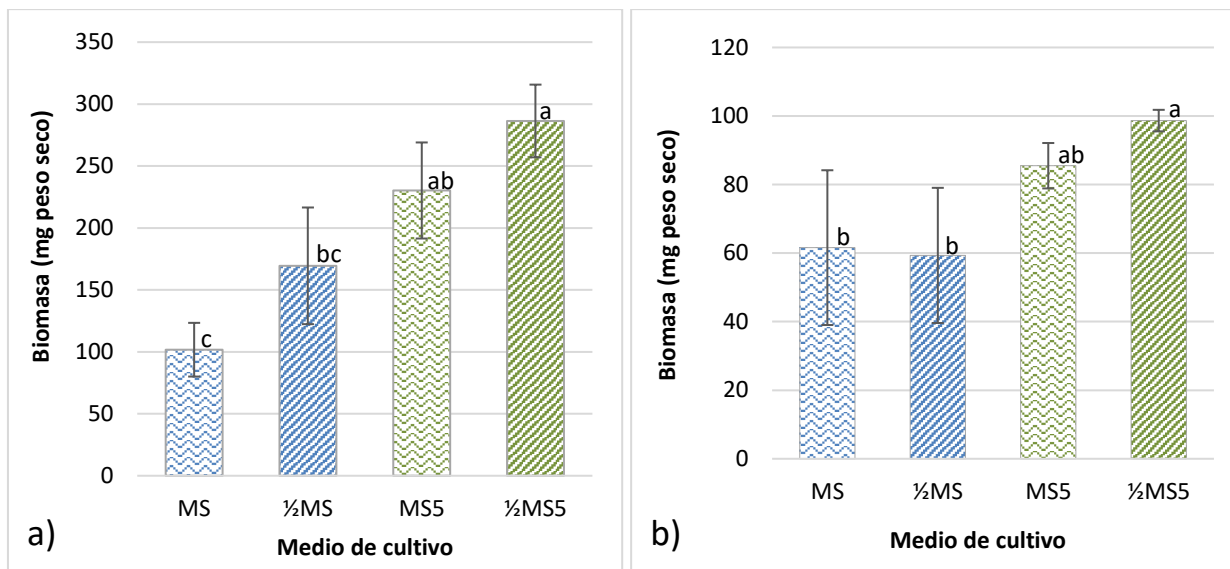


Figura 9. Biomasa (peso seco) de tallos (a) y raíces (b) de *P. vulgaris* después de 22 días de ensayo. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $\alpha=0.05$ ; prueba de Tukey,  $n=3$ ). MS: sales MS 100%, sin sacarosa; 1/2MS: sales MS 50%, sin sacarosa; MS5: sales MS 100%, 5 g/L de sacarosa; 1/2MS5: sales MS 50%, 5 g/L de sacarosa.

La causa de una mayor producción de biomasa en los medios con sacarosa, puede deberse a que las plantas, en condiciones normales, utilizan el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como fuente de carbono para la síntesis de todos sus componentes mediante la fotosíntesis. Sin embargo, se ha reportado que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tienen una capacidad fotosintética muy reducida o nula, aunado al hecho de que la unidad experimental y/o la iluminación pudieran no ser las adecuadas, causando que la planta requiera de una fuente de carbono exógena para satisfacer sus necesidades a partir del medio de cultivo (Troncoso *et al*, 1997). Además de la sacarosa, se han probado otras fuentes de carbono como la glucosa, fructosa, lactosa, galactosa, rafinosa, maltosa e incluso almidón, pero con resultados casi siempre inferiores a la sacarosa (Bharati *et al*, 2007). La adición de sacarosa en medios de cultivo para el cultivo de plantas en condiciones *in vitro*, se ha reportado en varias investigaciones, demostrando que mejora el crecimiento, siendo la concentración óptima variable dependiendo de la composición del medio de cultivo y de la planta (Troncoso *et al*, 1997, Bharati *et al*, 2007).

Con base en los resultados anteriores y, debido a que la sacarosa además de ser usada como fuente de carbono por la planta, en condiciones *in vitro* tiene un papel importante como regulador del potencial

osmótico y funciona también como señal molecular para la regulación, negativa y positiva, de algunas enzimas clave involucradas en el metabolismo de carbohidratos, así como también, modifica el crecimiento y la acumulación de biomasa de algunas plantas en condiciones *in vitro* (Faria *et al*, 2004), se seleccionaron los medios MS5 y ½MS5 para los siguientes ensayos.

### **6.3 Efecto de la asociación con *M. anisopliae* y *M. oryzae* sobre el crecimiento de *P. vulgaris***

Para acelerar el crecimiento y la producción de cultivos se ha hecho un excesivo uso de fertilizantes químicos y plaguicidas en la agricultura; lo anterior, ha generado un incremento en diferentes problemáticas agrícolas, tales como la resistencia de pestes y patógenos a los plaguicidas, contaminación ambiental e impactos negativos en la salud humana (Kumar *et al*, 2016). En años recientes, el interés en el uso de microorganismos endófitos, nativos y no nativos, para mejorar la salud y productividad de los cultivos se ha incrementado, ya que se ha demostrado una estimulación del crecimiento vegetal, cuantificado con el incremento de biomasa, la productividad del cultivo y la resistencia a condiciones de estrés biótico y abiótico, así como el incremento en la absorción de nutrientes (Rodríguez *et al*, 2009; Nóbrega *et al*, 2015). Lo anterior, se debe principalmente a que, para mantener una simbiosis estable, los endófitos producen compuestos que promueven el crecimiento vegetal, además de ayudar a la adaptación de la planta ante diversos tipos de estrés (Nair y Padmavathy, 2014).

Con relación al medio MS5, este mejoró significativamente la producción de biomasa aérea en las plantas inoculadas con *M. oryzae* con respecto al control o a los demás microorganismos (Figura 10). Esto puede atribuirse a que el género *Methylobacterium* se caracteriza por ser un grupo de bacterias productoras de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), promoviendo el crecimiento de las plantas (Kim *et al*, 2010; Kumar *et al*, 2016). Sin embargo, los RCV pueden tener el efecto contrario dependiendo del tejido y la concentración (Jordan y Casareto, 2006). *Methylobacterium oryzae* puede producir algunas de las fitohormonas como el ácido indolacético y algunas citocininas, las cuales puede estimular el crecimiento del tallo principal y promover la división y la diferenciación celular, entre muchas otras funciones (Kumar *et al*, 2016). Con respecto a las plantas control o las inoculadas con *M. anisopliae* y la mezcla de microorganismos, no se encontraron diferencias significativas.

Con relación a la biomasa aérea de las plantas en el medio ½MS5 (Figura 10) no se encontraron diferencias significativas entre la biomasa de las plantas del control, las inoculadas con *M. anisopliae* y las inoculadas

con ambos microorganismos. Esto puede ser consecuencia de las condiciones nutrimentales, ya que se ha comprobado que la concentración y disponibilidad de los nutrientes en el medio pueden promover o inhibir el crecimiento microbiano, así como afectar las asociaciones endófitas (Usuki *et al.* 2002; Murphy *et al.* 2015). Tomando en cuenta los antecedentes de este género bacteriano, la pérdida de biomasa pudo deberse a la sobreproducción de algún RCV (Jordan y Casareto, 2006).

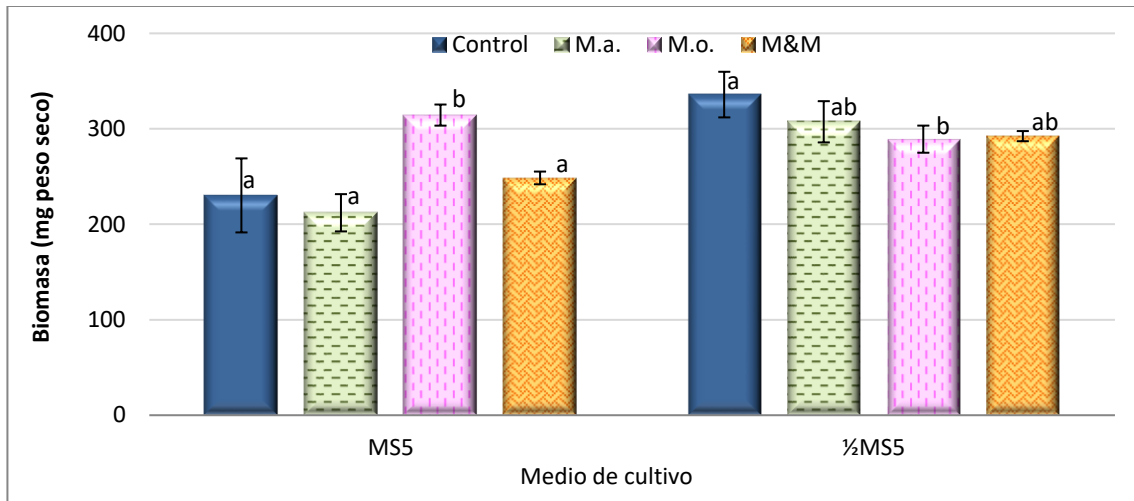


Figura 10. Biomasa de tallos de *P. vulgaris* en medio MS5 y 1/2MS5, de plantas inoculadas con *M. anisopliae* (M. a.), *M. oryzae* (M. o.) y mezcla de los endófitos (M&M). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $\alpha=0.05$ ; prueba de Tukey,  $n=3$ ).

Con relación al medio MS5, la biomasa radicular de las plantas inoculadas con *M. anisopliae* (Figura 11), reflejó un aumento significativo, similar a lo reportado por Sasan y Bidochka (2012), donde la inoculación de plantas de frijol con *M. robertsii* estimuló la producción de la biomasa radicular, aunque los mecanismos que originaron este resultado se desconocen hasta ese momento. No se encontraron diferencias significativas en la biomasa de raíces del control y las inoculadas con *M. oryzae* o la mezcla de ambos microorganismos.

Con relación al medio 1/2MS5, los resultados fueron similares a lo reportado en la biomasa aérea, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con *M. anisopliae*, el control y la mezcla de los microorganismos (Figura 11), pero sí una pérdida de biomasa significativa en las plantas inoculadas con *M. oryzae*, lo cual, como se mencionó previamente, puede ser resultado de una sobreproducción de RCV ocasionada por efecto de *M. oryzae*.

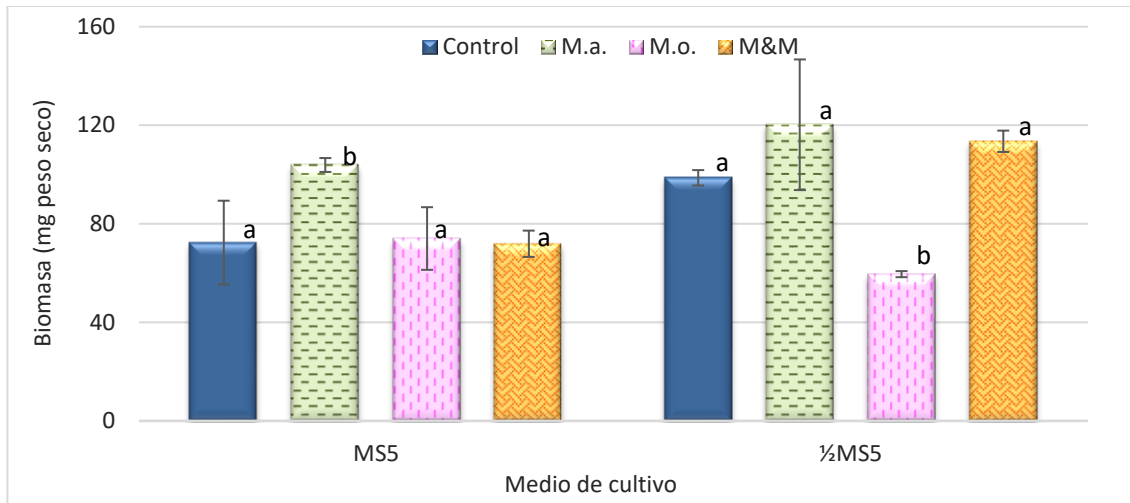


Figura 11. Biomasa de raíces de *P. vulgaris* en medio MS5 (Anova a la izquierda,  $\alpha=0.05$ ) y  $\frac{1}{2}$ MS5 (Anova a la derecha,  $\alpha=0.05$ ), inoculadas con *M. anisopliae* (M. a.), *M. oryzae* (M. o.) y mezcla de los endófitos (M&M). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $\alpha=0.05$ ; prueba de Tukey;  $n=3$ ).

Además de la biomasa (peso seco), otra variable cuantificada para evaluar el crecimiento fue el número de hojas producidas. La importancia de esta variable radica en que las hojas son unidades funcionales de la fotosíntesis y la transpiración de las plantas vasculares por lo que son relevantes para el crecimiento de una planta. Bajo condiciones de estrés, las plantas presentan diversas respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento. Uno de los principales efectos del estrés salino es la disminución de la expansión foliar y, debido a que de ella depende la fotosíntesis, esto puede causar un decremento en la biomasa total de la planta (Moreno, 2009; Martínez *et al*, 2011).

En la Figura 12, se muestran las plantas obtenidas 15 días después de la inoculación con el hongo y la bacteria, juntos o por separado. En las plantas del medio MS5 inoculadas con *M. oryzae* y las inoculadas con ambos microorganismos, se observaron plantas con hipocótilos de mayor longitud en comparación con las plantas inoculadas con *M. anisopliae* o el control. Las plantas creciendo en el medio  $\frac{1}{2}$ MS5, en apariencia, tuvieron un color verde de mayor intensidad que las plantas creciendo en el medio MS5 además de que, con excepción de las plantas inoculadas con *M. oryzae* (en  $\frac{1}{2}$ MS5), tuvieron hojas primarias más grandes.

De manera cuantitativa, el análisis de varianza del medio MS5 indicó que no hubo diferencias significativas entre las plantas creciendo con o sin microorganismos. Sin embargo, el ANOVA del medio  $\frac{1}{2}$ MS5, mostró que las plantas inoculadas con la mezcla de los microorganismos reflejaron una pérdida significativa en la

producción de hojas en comparación con las plantas inoculadas con los microorganismos por separado y el control (Figura 13).

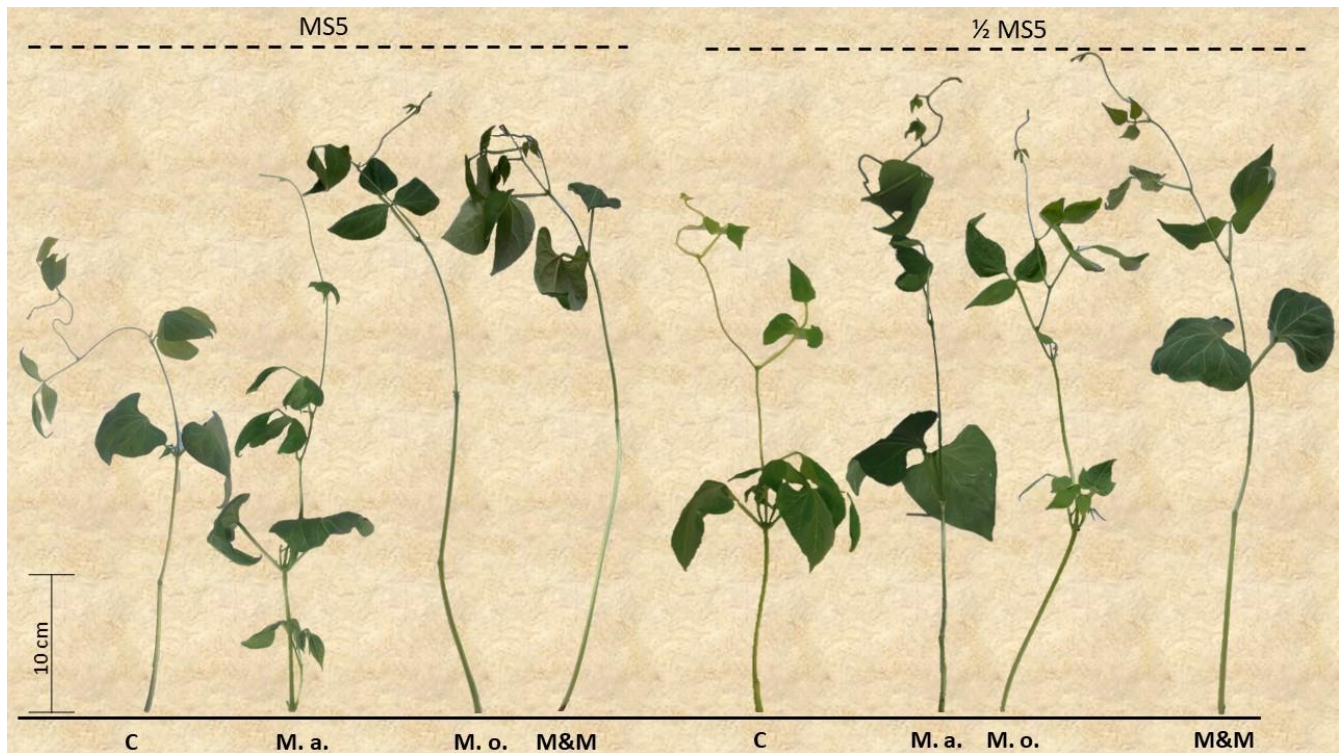


Figura 12. Biomasa aérea de *P. vulgaris* 15 días después de la inoculación con *M. anisopliae* (M. a.), *M. oryzae* (M. o.) o la co-inoculación con ambos microorganismos (M&M). MS5: sales MS 100%, 5 g/L de sacarosa; 1/2MS5: sales MS 50%, 5 g/L de sacarosa

La disminución en la producción de hojas en el medio 1/2MS5 por efecto de la mezcla de los microorganismos puede estar relacionada con un efecto antagónico entre *M. anisopliae* y *M. oryzae*, ya que se ha reportado que algunos metabolitos producidos por bacterias afectan el crecimiento de ciertos hongos filamentosos, lo cual, dependiendo del metabolito producido, puede modificar la asociación entre microorganismos (Ansari *et al* 2005; Frey *et al*, 2011). Asimismo, también se generó una prueba t-Student para corroborar si había diferencias entre los órganos colonizados de los tratamientos de los medios MS5 y 1/2MS5, aunque no se encontraron diferencias significativas. Si bien se ha reportado que la aplicación de diversos tipos de microorganismos puede mejorar el crecimiento de las plantas a través de mecanismos como la regulación en la producción de fitohormonas, el aumento en la captura de nutrientes, así como mostrar antagonismo sobre algunos fitopatógenos (Frey *et al*. 2011; Porras y Bayman, 2011), en el presente estudio los microorganismos mostraron un efecto neutro sobre *P. vulgaris* en los medios MS5 y 1/2MS5.

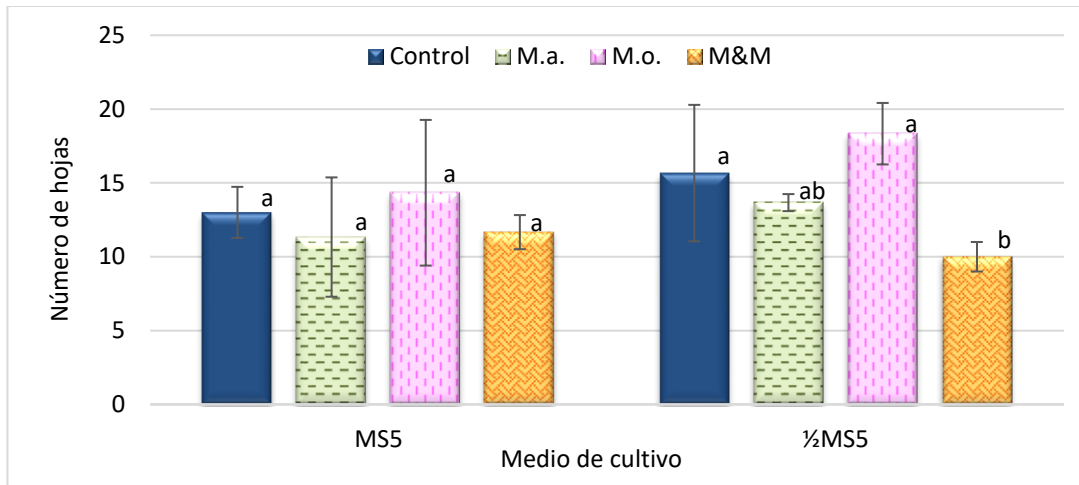


Figura 13. Producción de hojas en plantas de *P. vulgaris* en medio MS5 y 1/2MS5, 15 días después de la inoculación con *M. anisopliae* (M. a.), *M. oryzae* (M. o.) o la mezcla de los endófitos (M&M). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $\alpha=0.05$ ; prueba de Tukey;  $n=3$ ).

En relación con los resultados presentados hasta este momento, se determinó que debido a que el medio 1/2MS5 estimuló la producción de biomasa de *P. vulgaris*, en algunas ocasiones de manera significativa, se seleccionó este medio para los ensayos posteriores.

## 6.4 Pruebas de asociación

### 6.4.1 Asociación entre *P. vulgaris* y *M. anisopliae*

Varias investigaciones coinciden en que los microorganismos endófitos se encuentran dentro de los tejidos de una gran diversidad de plantas y que poseen una amplia diversidad, estilo de vida (ej. diseminación), especificidad con su hospedero, y colonización dentro de un tipo de tejido (Porrás y Bayman, 2011; Reinhold y Hurek, 2011).

Muchos hongos endófitos pueden ser específicos de un hospedero. Además, la asociación entre diferentes especies de un mismo endófito puede ser influenciada por condiciones microclimáticas, así como debido a adaptaciones resultantes de los diversos mecanismos de defensa del hospedero (Saikkonen *et al* 2004). Sin embargo, también pueden mostrar especificidad por un órgano o tejido como resultado de su adaptación a diferentes condiciones fisiológicas (Porrás y Bayman, 2011).

En el presente estudio, se registró la presencia endófitica de *M. anisopliae* en todos los tejidos de *P. vulgaris*, siendo el tallo el órgano con mayor porcentaje de colonización (MS5: 33%, ½MS5: 67%), seguido por las raíces (MS5: 31%, ½MS5:44%) y en menor grado en hojas (MS5 y ½MS5: 25%) (Figura 10).

Behie, *et al.* (2015) encontraron a *Metarhizium robertsii* como endófito en más de 82 especies de plantas analizadas, colonizando principalmente las raíces, con una muy baja presencia en tallos y nula en hojas, atribuyendo la presencia de *Metarhizium* en estos órganos a que los insectos que afectan las plantas asociadas con esta especie de *Metarhizium* atacan principalmente la zona radicular. Parsa *et al.* (2016), determinó que era posible establecer una asociación endófitica entre *M. anisopliae* y una especie de mandioca *Manihot esculenta*, sugiriendo que este entomopatógeno tiene el potencial para colonizar, de manera endófitica, diferentes especies de plantas y que tiene una alta preferencia por el sistema radicular de su hospedero.

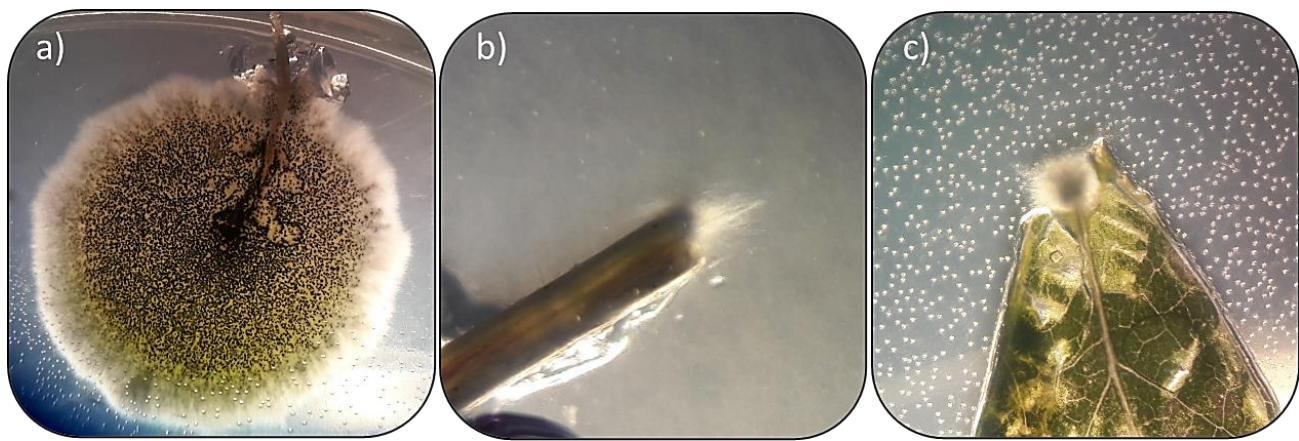


Figura 10. Órganos de *P. vulgaris* colonizados por *M. anisopliae* después de 15 días de contacto en medio MS. a) raíz, b) tallo y c) hoja.

En comparación con la bibliografía hallada hasta el momento, el presente trabajo es el segundo reporte en el que se encuentra a *M. anisopliae*, de manera endófitica en las hojas de su hospedero. Una de las causas que puede explicar la presencia del hongo en hojas y tallos de *P. vulgaris*, podría estar relacionado a lo concluido por Win *et al.* (2017) donde se encontró que diversos hongos endófitos presentes en plantas de *Camellia sinensis* tenían una alta preferencia en tejidos con una mayor cantidad de nutrientes. Tomando en cuenta que *P. vulgaris* presenta una germinación epigea, es decir, las reservas de energía utilizadas en la germinación son transportadas a los tejidos aéreos (FAO, 1991), *M. anisopliae* podría estar presente en estos tejidos por la acumulación de nutrientes en estas zonas. Además, tomando en cuenta lo expuesto

por Behie *et al.* (2015) en comparación con *M. robertsii*, esta cepa de *M. anisopliae* (CP-Oax) ha sido reportada como un entomopatógeno chapulines, grillos y otros insectos que afectan los tallos y hojas de algunos cultivos (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010), por lo que esta cepa podría afectar insectos sobre el nivel del suelo.

#### **6.4.2 Asociación entre *P. vulgaris* y *M. oryzae***

Así como los hongos, también existen bacterias capaces de colonizar plantas de manera endófitas. Diversos estudios han demostrado que alrededor de 300,000 especies de plantas están asociadas con uno o varios tipos de bacterias. Éstas colonizan diferentes compartimentos de la planta, como el apoplasto, los espacios intercelulares de las paredes de las células y los vasos del xilema (Patt *et al.*, 1976; Reinhold y Hurek, 2011).

El género *Methylobacterium* ha sido reportado como endófito, encontrándose en raíces, tallos, hojas, flores y frutos de muchos cultivos de interés alimenticio, resaltando ser uno de los géneros microbianos reportados en hojas, principalmente alrededor de los estomas, tricomas o espacios intracelulares (Iguchi *et al.*, 2015). Lo anterior, es poco frecuente, ya que puede ser un ambiente desafiante debido principalmente a la radiación UV, el rápido cambio de temperatura y el estrés hídrico (Kumar *et al.*, 2016). Varias especies de *Methylobacterium* han sido halladas como endófitos de plantas. Por ejemplo, López *et al.* (2010) encontraron a *M. adhaesivum*, *M. gregas* y *M. platani* como endófitos nativos en raíces de tres variedades de *P. vulgaris*; Oliveira *et al.* (2012) encontraron a *M. populi* en las hojas de *P. vulgaris*. Kim *et al.* (2010) demostraron que es posible inducir la asociación endófitas de *M. oryzae* con plantas *Capsicum annuum* L. (pimiento rojo) y que la bacteria se presentó principalmente en las hojas de la planta a los 45 días del ensayo. En el presente estudio, *M. oryzae* no se encontró en hojas, pero sí colonizando principalmente los tallos (MS5: 83%, ½MS5: 100%) y en menor presencia en las raíces (MS5: 22%, ½MS5: 33%), de *P. vulgaris* (Figura 11).

En el caso del presente estudio, es probable que *M. oryzae* no se haya encontrado en las hojas de *P. vulgaris* debido a que el tiempo de exposición fue muy corto, así como también el método utilizado para inocular a la bacteria, ya que en el presente trabajo la inoculación solo se realizó una sola vez en el día 4 después de la germinación y directamente en las raíces, evaluando la presencia de la bacteria 15 días después de su inoculación. En comparación con Kim *et al.* (2010), la planta fue inoculada con *Methylobacterium oryzae*

los días 0, 15 y 45 después de la germinación, directamente a hojas (por aspersión) y a las raíces (con una suspensión en la que se encontraba la bacteria) en los 63 días que duro el ensayo.

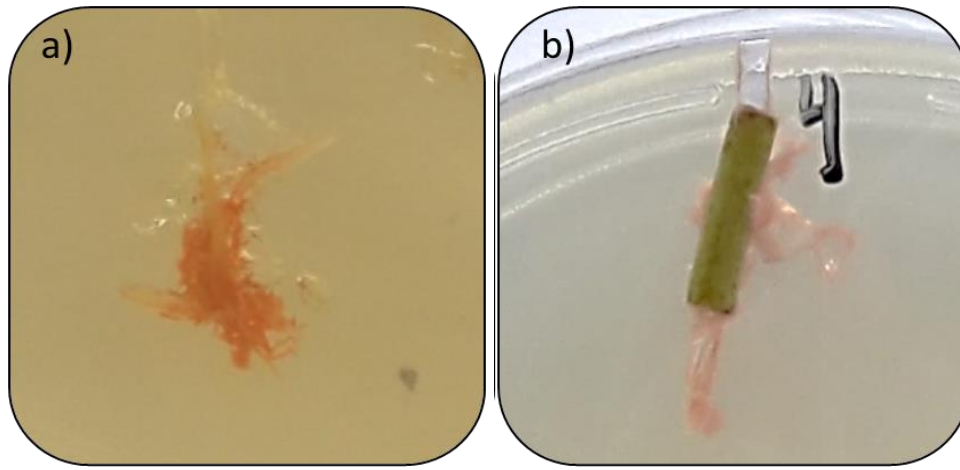


Figura 11. Órganos de *P. vulgaris* colonizados por *M. anisopliae* después de 15 días de contacto en medio MS. a) raíz y b) tallo.

En el caso de los ensayos en los que *Methylobacterium* spp. se encontró en tres variedades de *P. vulgaris* (Oliveira *et al*, 2012), ninguna de las especies de la bacteria se encontró en las hojas, lo que podría indicar que, en el caso particular de la asociación con *P. vulgaris*, *M. oryzae* no tiene preferencia por las hojas de su hospedero.

#### 6.4.3 Asociación entre *P. vulgaris* y ambos microorganismos

Los beneficios que los microorganismos endófitos pueden ofrecer a sus hospederos han sido ampliamente citados en diversas investigaciones. Sin embargo, solo en recientes años se han investigado los efectos benéficos que la inoculación conjunta de estos microorganismos puede proporcionar a su hospedero (Frey *et al*, 2011, Iguchi *et al*, 2015). Cuando se inocularon juntos *M. anisopliae* y *M. oryzae* alrededor de las raíces de *P. vulgaris*, ambos microorganismos penetraron los tejidos de la planta y las pruebas de endofiticidad mostraron que ambos pueden infectar un mismo tejido al mismo tiempo. Para ambos microorganismos, los tallos fueron el órgano con mayor porcentaje de colonización (MS5: 83%, ½MS5: 92%), seguido por las raíces (MS5: 28%, ½MS5: 17%). No obstante, no se halló presencia de la mezcla de los endófitos en las hojas. Los resultados de estas pruebas demostraron que el tipo de asociación entre *P. vulgaris* y *M. anisopliae* o *M. oryzae* es de naturaleza endófito y que el tejido con mayor porcentaje de colonización fueron los tallos, en ambos casos. A la fecha, se desconocen los mecanismos precisos por los

cuales los endófitos tienen preferencia por un tejido específico. Sin embargo, Win *et al.* (2017) ha sugerido que esto puede estar relacionado con el tipo de nutrientes en el mismo, la anatomía del órgano, el estado fisiológico de la planta y el tipo de microorganismo endófito.

#### 6.4.4 Pruebas de asociación en función del tiempo y las condiciones nutrimentales

Como se mencionó anteriormente, se ha comprobado que las asociaciones entre plantas y endófitos sean de origen fúngico o bacteriano, pueden ser influenciadas por el genotipo, el desarrollo y el estado fisiológico del hospedero, la concentración y disponibilidad de nutrientes del sustrato en el que se desarrolla (Usuki *et al.*, 2002; Frey *et al.*, 2011), así como también por el origen del endófito (ej. Raíz, hojas, flores, etc.) (Hardoim *et al.*, 2015).

Además de corroborar el tipo de asociación entre los microorganismos usados en el presente estudio, también se observaron los efectos de dos concentraciones de sales del medio MS, al que se le adicionó 5 g/L de sacarosa como fuente de carbono sobre la asociación. En el caso de *M. anisopliae*, los resultados indicaron que la colonización endófito del hongo con *P. vulgaris*, ocurre en raíces y tallos entre los 5 y los 10 días después de la inoculación y, en hojas, después del décimo día (Figura 12).

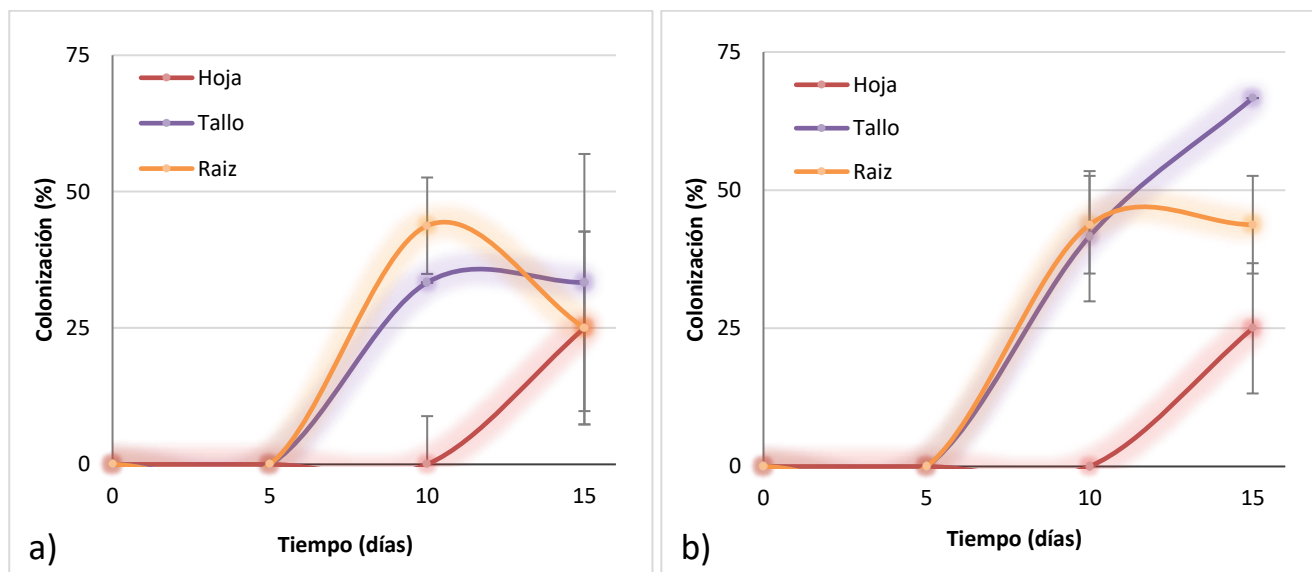


Figura 12. Índice de colonización de hojas, tallos y raíces de *P. vulgaris* por *M. anisopliae* en medio Murashige-Skoog (MS) al 100% con 5g/L de sacarosa (a) y MS al 50% con 5g/L de sacarosa (b).

Esto es similar a lo reportado por Greenfield *et al.* (2016), quienes reportan un nivel de colonización en las raíces de *Manihot esculenta* (yuca) por *M. anisopliae* a partir del día 7 después de la inoculación. Con respecto a la biomasa aérea (tallos y hojas), García *et al.* (2011) reportan la presencia de *M. anisopliae* al en tallos y en hojas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) a los 28 después de la inoculación.

Con relación a las condiciones nutrimentales, las pruebas t-Student ( $\alpha=0.05$ ;  $n=2$ ) no reflejaron diferencias significativas en los niveles de colonización de los órganos (tallos:  $P=0.3$ , raíz:  $P=0.7$ , hojas: mismos valores) de *P. vulgaris* entre los dos medios de cultivo.

Con respecto a la asociación entre *M. oryzae* y *P. vulgaris*, se encontró que ésta también es de carácter endófito y que puede establecerse después de cinco días de contacto con las raíces y en los tallos a partir de los 10 días.

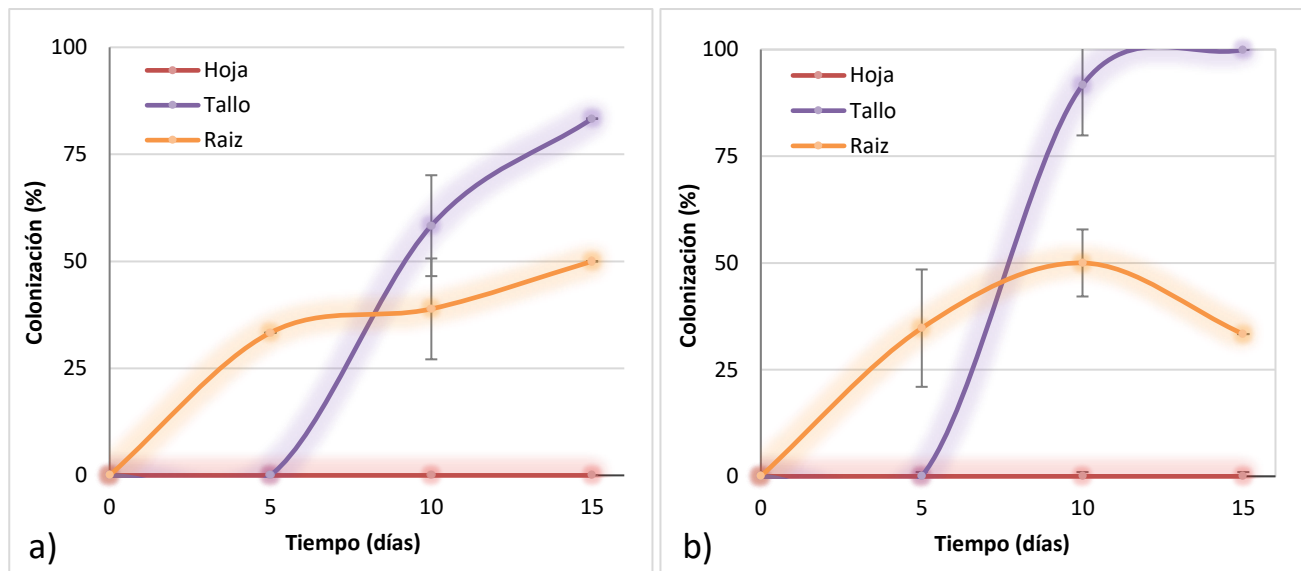


Figura 13. Índice de colonización de hojas, tallos y raíces de *P. vulgaris* por *M. oryzae* en medio Murashige-Skoog al 100% con 5g/L de sacarosa (a) y Murashige-Skoog al 50% con 5g/L de sacarosa (b).

Existen antecedentes de que el género *Methylobacterium* puede ser inoculado como endófito en diferentes cultivos. Como ejemplo, Poonguzhali *et al.* 2008 inocularon *M. suomiense* en plantas de *Oryza sativa* (arroz) var. Dongjin y *Lycopersicon esculentum* L. (tomate) var. Mairoku encontrándolos de manera endófito en hojas y raíces entre los 7 y 10 días después de la inoculación. Las pruebas t-Student no reflejaron diferencias significativas en los niveles de colonización de los órganos de *P. vulgaris* (tallos:  $P<0.2$ , raíz:  $P<0.1$ ) entre los dos medios de cultivo.

En las pruebas de la co-inoculación de *P. vulgaris* con el hongo y la bacteria pudo observarse el crecimiento de ambos microorganismos a partir de tallos y raíces a los 15 días después de la co-inoculación, nuevamente observándose una preferencia por los tallos (Figura 14). En relación con las condiciones nutrimentales, las pruebas t-Student ( $\alpha=0.05$ ;  $n=2$ ) no reflejaron diferencias significativas en los niveles de colonización de los diferentes órganos de *P. vulgaris* entre los dos medios de cultivo.

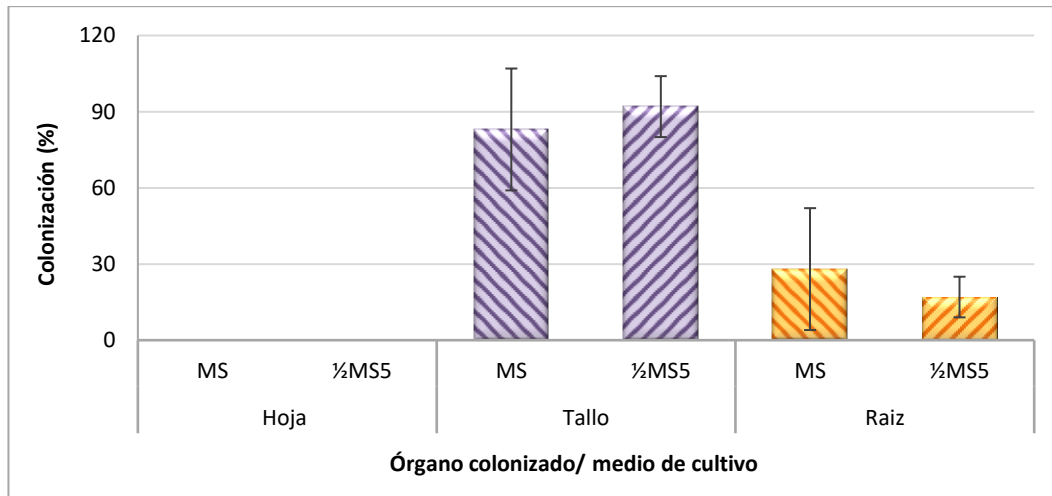


Figura 14. Colonización endófitas de los órganos de *P. vulgaris* por la mezcla de ambos microorganismos (*M. anisopliae* y *M. oryzae*) 15 días después de la inoculación. (t-Student,  $\alpha=0.05$ ;  $n=2$ ). MS5: sales MS 100%, 5 g/L de sacarosa; ½MS5: sales MS 50%, 5 g/L de sacarosa

Muchos factores inciden sobre el establecimiento de la asociación entre un endófito y su hospedero, por lo que la importancia de conocer el tiempo en el que ésta se establece radica en que los endófitos pueden cambiar las condiciones fisiológicas y morfológicas del hospedero, así como también, pueden afectar las poblaciones de otros microorganismos presentes en la planta (Reinhold y Hurek, 2011; Porras y Bayman, 2011; Hardoim *et al*, 2015). Esto permite, una vez que se conoce el tiempo en el que se establece la asociación, probar diferentes condiciones, bióticas y abióticas, para mejorar dicha asociación. En el presente ensayo, la composición del medio de cultivo no mostró efectos significativos sobre el establecimiento de la asociación entre *P. vulgaris* y los microorganismos endófitos, juntos o por separado.

### 6.5 Influencia de asociaciones endófitas en el crecimiento de *P. vulgaris* bajo estrés salino

La salinidad es uno de los principales tipos de estrés abiótico que limita la productividad de muchos cultivos

de interés alimenticio (Pasternak, 1987). La salinización de las tierras de uso agrícola va en aumento a nivel mundial, restringiendo cada vez más el rendimiento de los cultivos (Garzón y García 2001). No obstante, aunque muchas plantas tienen mecanismos de respuesta al estrés salino (Strogonov, 1964), no todos los cultivos agrícolas poseen estos mecanismos (Azad y Kaminskyj, 2016). El uso de microorganismos endófitos es un método innovador que se ha ido desarrollando en décadas recientes, ya que puede promover el crecimiento vegetal y mejorar la tolerancia de las plantas a ciertos tipos de estrés (Frey *et al*, 2011). En el presente estudio, se indujo estrés salino utilizando NaCl en una concentración 30mM adicionado al medio. Esta concentración de NaCl fue seleccionada en base con los antecedentes, ya que se ha observado que los efectos negativos sobre el crecimiento o germinación de *P. vulgaris* ante condiciones salinas inician en concentraciones superiores a 20 mM de NaCl (Quintana *et al*, 2016), aunque los efectos de esta concentración de NaCl pueden variar dependiendo de la variedad o especie de frijol (França *et al*, 2007, Chulim *et al*, 2014).

Al finalizar el ensayo (15 días después de la inoculación), se observó una menor cantidad de hojas y de menor tamaño en las plantas sometidas a estrés salino (Figura 15).

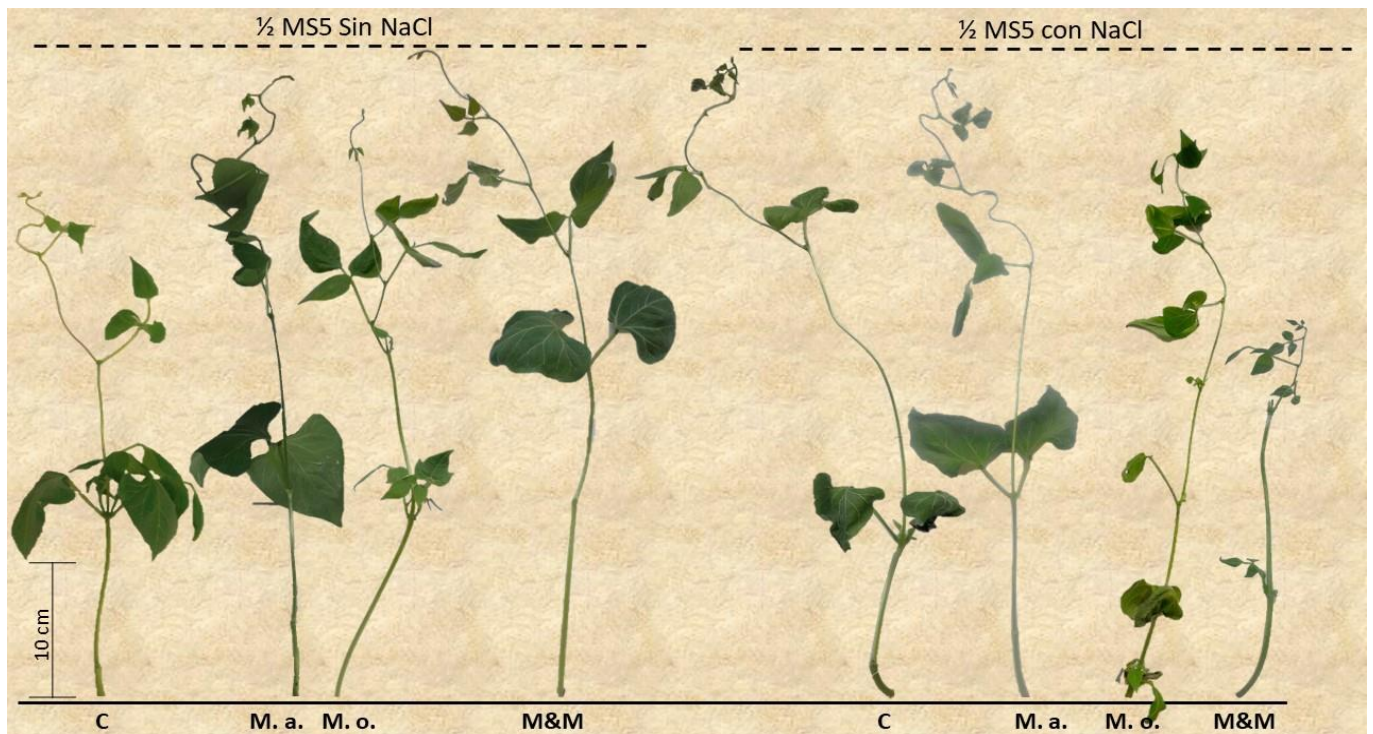


Figura 15. Biomasa aérea de plantas de *P. vulgaris*, con y sin estrés salino, 15 días después de la inoculación con *M. anisopliae* (Ma), *M. oryzae* (Mo) o la mezcla de ambos microorganismos (M&M).

Solo el tratamiento con *M. oryzae* estimuló significativamente la producción de hojas por efecto de la

asociación con la bacteria. No se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con *M. anisopliae*, la mezcla de microorganismos o el control sometidos a estrés salino con respecto a las plantas con los mismos tratamientos, o con el control sin estrés salino (Figura 16). Las señales más comunes de una planta bajo estrés salino se reflejan en la baja producción de biomasa y la pérdida de hojas, ya que la capacidad de absorción de agua por la planta se encuentra reducida (Porrás y Bayman, 2011), lo cual conduce a la activación de mecanismos para hacer frente a las condiciones salinas.

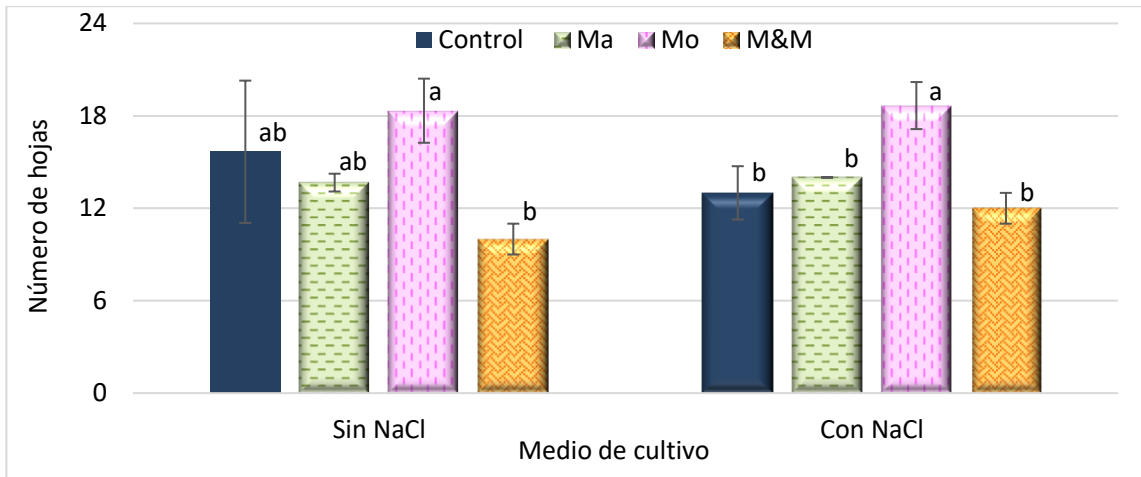


Figura 16. Producción de hojas en plantas de *P. vulgaris* en medio  $\frac{1}{2}$ MS5 sin NaCl y con NaCl, 15 días después de la inoculación con *M. anisopliae* (Ma.), *M. oryzae* (Mo) y mezcla de los endófitos (M&M).

Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $\alpha=0.05$ ; prueba de Tukey;  $n=3$ ).

En algunas plantas del tratamiento control se observaron tricomas (Figura 17) en la superficie de las hojas, similares a los reportados por Garzón y García (2011) en dos especies del frijol *Vigna unguiculata* L., no obstante, no se encontraron en ningún otro tratamiento. Algunas dicotiledóneas, presentan dos tipos de adaptaciones anatómicas a condiciones de estrés salino: (i) incremento en el tamaño de las células debido al aumento del volumen vacuolar (suculencia); (ii) excreción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  mediante glándulas modificadas (tricomas) o vesículas vejiga (células epidérmicas modificadas). Estas células, localizadas en la superficie de las hojas y de los tallos, son células modificadas (tricomas) que se desarrollan durante el crecimiento de la planta y permanecen deprimidas en ausencia de sal, pero su crecimiento se ve estimulado por la presencia de ésta (Munns y Tester, 2008). Se ha propuesto que los tricomas pueden jugar algún papel en la secreción del exceso de sales (Garzón y García, 2011). La aparición de los tricomas, solo en el control con NaCl y no en los demás tratamientos, puede deberse a que los microorganismos estén amortiguando los efectos del estrés salino.

Con respecto a la biomasa de tallos en el medio  $\frac{1}{2}$ MS5 con NaCl, la inoculación con *M. anisopliae*, *M. oryzae* no mostró diferencias significativas en comparación con el control, reflejando un efecto neutro de estos microorganismos sobre el crecimiento de *P. vulgaris* bajo condiciones salinas. Sin embargo, sí se encontró una disminución significativa (40%) en la producción de biomasa aérea en el tratamiento de la mezcla de los endófitos (M&M), en comparación con el control bajo estrés salino (Figura 18, a).



Figura 17. Efectos causados por estrés salino en plantas de frijol, 15 días después de la inoculación con los endófitos: a) enrollamiento de hojas, b) necrosis, c) clorosis, d) tricomas, e) pérdida de turgencia.

En relación con el estrés salino en las raíces, solo *M. oryzae* mostró un efecto neutro en la producción de biomasa de las raíces de *P. vulgaris*, ya que los tratamientos con *M. anisopliae* y la mezcla de ambos microorganismos (M&M) causaron una disminución significativa (20 y 17%, respectivamente) en dicha variable, con respecto a las plantas control (Figura 18).

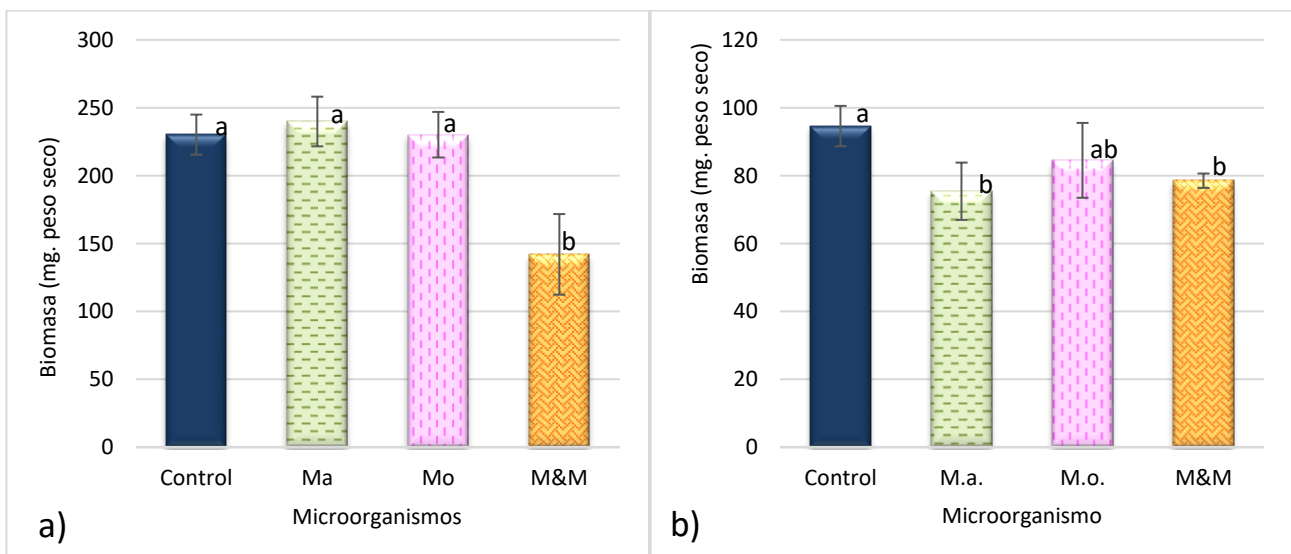


Figura 18. Biomasa de tallos (a) y raíces (b) de *P. vulgaris* crecidas en medio  $\frac{1}{2}$ MS5 bajo condiciones salinas, 15 días después de la inoculación con *M. anisopliae* (Ma), *M. oryzae* (Mo) y mezcla de los

endófitos (M&M). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA,  $\alpha=0.05$ ; prueba de Tukey;  $n=3$ ).

Estos resultados fueron comparados con los resultados de las condiciones no salinas mediante una prueba t-Student (Figura 19). Los resultados mostraron diferencias significativas en los tratamientos con los endófitos, juntos o por separado, para los tallos y para la zona radicular en el tratamiento con *M. oryzae* y ambos microorganismos.

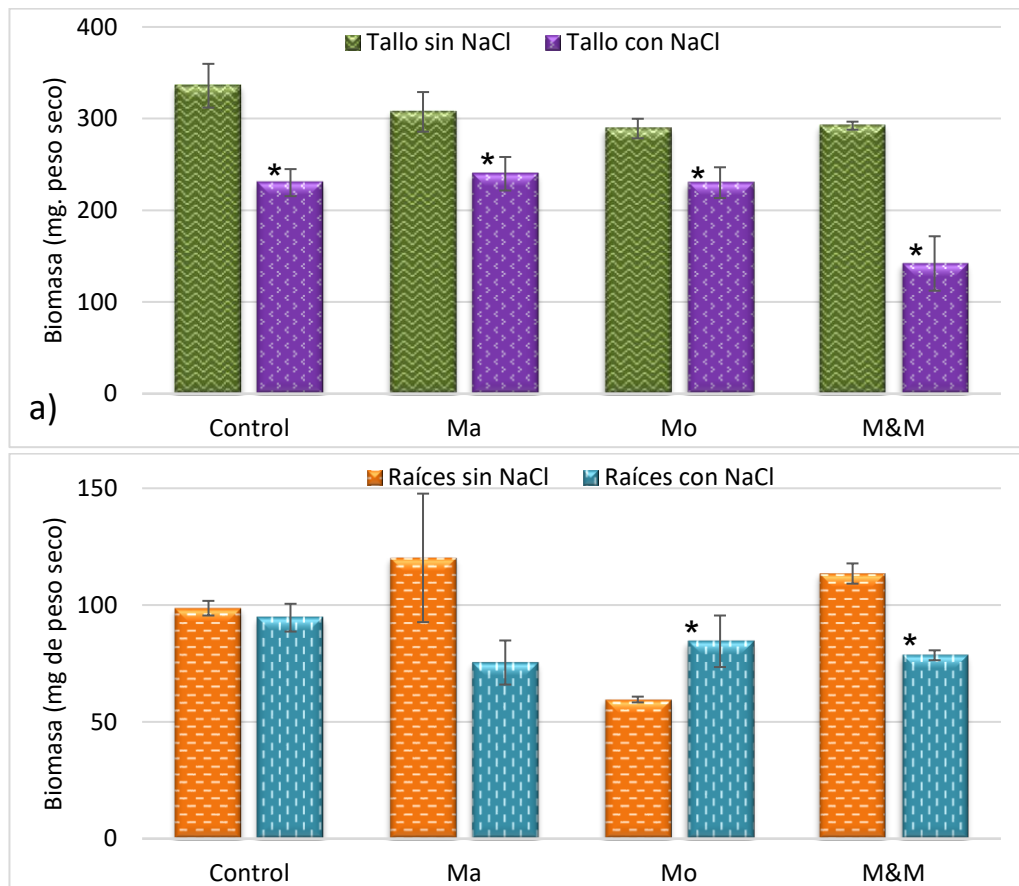


Figura 19. Biomasa de tallos (a) y raíces (b) de *P. vulgaris* crecidas en medio  $\frac{1}{2}$ MS5, con y sin NaCl, 15 días después de la inoculación con *M. anisopliae* (Ma), *M. oryzae* (Mo) y mezcla de los endófitos (M&M). Diferencias significativas entre los tratamientos con NaCl y sin NaCl se marcan con un asterisco (t-Student,  $\alpha=0.05$ ;  $n=3$ )

El efecto neutro de la asociación de *P. vulgaris* - *M. anisopliae* y *P. vulgaris* - *M. oryzae* en tallos se observó al comparar los resultados con y sin NaCl. Se encontró una reducción (22 y 20.4%, respectivamente) en la producción de biomasa vegetal de plantas asociadas con *M. anisopliae* y con *M. oryzae* (Figura 19, a). Este mismo efecto se observó en el tratamiento donde *M. oryzae* y *M. anisopliae* fueron co-inoculados, donde

la pérdida de biomasa fue mayor al 50% en comparación con los endófitos por separado. En relación con los efectos de los endófitos en la zona radicular, la co-inoculación de *M. anisopliae* y *M. oryzae* bajo condiciones salinas, redujo significativamente la producción de biomasa en comparación con el tratamiento sin NaCl.

La prueba t-Student demostró que *M. oryzae* es capaz de promover la producción de biomasa de *P. vulgaris*, de manera significativa, bajo condiciones salinas en comparación con la biomasa de las plantas de *P. vulgaris* en asociación con *M. oryzae*, sin el estrés salino (Figura 19, b). Sin embargo, al comparar los resultados de la biomasa de *P. vulgaris* asociada con *M. oryzae*, bajo estrés salino con el control (sin asociación) bajo condiciones salinas este efecto no fue significativo (Figura 18, b).

Aunque se ha demostrado el efecto benéfico de diversos microorganismos endófitos en la tolerancia de sus hospederos ante diversos tipos de estrés (Kim *et al*, 2010; Khan *et al*, 2012 Azad y Kaminskyj, 2016), los efectos potencialmente benéficos o perjudiciales para una planta varían dependiendo del ambiente, el estado fisiológico del hospedero y las condiciones en que se desarrolla, afectando así también la asociación (Uzuki *et al* 2002; Rangel *et al*, 2008; Frey *et al*, 2011). El género *Methylobacterium* ha mostrado efectos sinérgicos sobre el crecimiento vegetal al ser co-inoculado con hongos micorrízicos arbusculares en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*), (Kim *et al*, 2010; Lee *et al*, 2015). En relación con *Metarhizium*, particularmente *M. anisopliae*, también existen antecedentes de que puede hallarse en condiciones endófitas interactuando con algunas bacterias entomopatógenas. Sin embargo, los efectos de la co-inoculación puede tener efectos sinérgicos o antagónicos dependiendo de cantidad del inóculo utilizado (Ansari *et al*, 2005). En este caso, la disminución de la biomasa de *P. vulgaris* por efecto de la co-inoculación de los endófitos pudo haber sido causada por efecto de los metabolitos secundarios que los microorganismos producen bajo condiciones de estrés o de los exudados de la planta frente al estrés salino (Meena *et al*, 2012; Frey *et al*, 2011).

De acuerdo con los resultados obtenidos bajo condiciones de estrés salino, la asociación entre *M. anisopliae* y *M. oryzae*, por separado, con *P. vulgaris* es de carácter neutro; mientras que la asociación con la mezcla de los endófitos es antagonista.

## **6.6 Asociación entre *P. vulgaris* y ambos microorganismos bajo condiciones salinas**

Como se mencionó, las asociaciones entre endófitos y sus hospederos pueden verse afectados por diversos

factores como el estado fisiológico del hospedero, la concentración y disponibilidad de nutrientes del sustrato en el que se desarrolla, así como el origen del endófito (Reinhold y Hurek, 2011; Hardoim *et al*, 2015; Win *et al*, 2017).

Las pruebas de endofiticidad mostraron que el estrés salino afectó la asociación de *M. anisopliae* en las hojas de *P. vulgaris*, ya que bajo condiciones salinas no pudo encontrarse la asociación y si bien se observó un marcado descenso en el porcentaje de colonización en los tallos, este no fue significativo (t-Student,  $\alpha=0.05$ ,  $P=0.1$ ). En relación con *M. oryzae* y la mezcla de ambos endófitos, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de colonización en las plantas bajo condiciones salinas y no salinas, independientemente del órgano colonizado (t-Student,  $\alpha=0.05$ ,  $n=2$ ) (Figura 20).

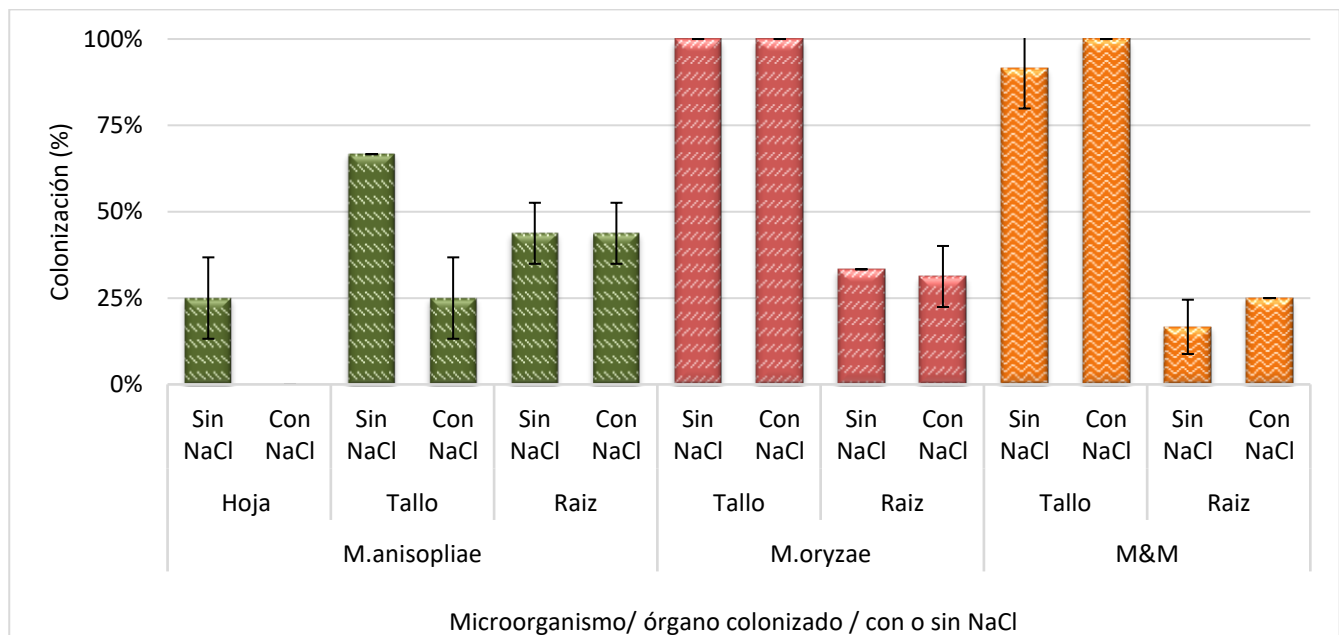


Figura 20. Índice de colonización endófito de los órganos de *P. vulgaris* por los microorganismos (*M. anisopliae* y *M. oryzae* y la mezcla de ambos), 15 días después de la inoculación. Sin NaCl: Medio ½MS5 sin NaCl; con NaCl: Medio ½MS5 con NaCl. Diferencias significativas entre los tratamientos con NaCl y sin NaCl se marcan con un asterisco (t-,  $\alpha=0.05$ ;  $n=2$ ).

*Metarhizium anisopliae* y *M. oryzae*, juntos o por separado, proporcionan beneficios a otras plantas bajo condiciones salinas (Khan *et al* 2012; Lee *et al*, 2015). Sin embargo, este efecto no se observó en el presente estudio, por lo que la importancia de saber si la asociación se afectó por las condiciones salinas radica en conocer el comportamiento de la asociación bajo esta condición, en un órgano o en toda la planta, y esto a su vez puede afectar el crecimiento de *P. vulgaris*, ya que se ha corroborado que la asociación entre

hospederos y endófitos puede afectarse por diversas condiciones ambientales y los beneficios que los endófitos pueden conferirle a su hospedero pueden variar, modificando la relación endófito de mutualista a neutra o inclusive antagonista (Reinhold y Hurek, 2011; Hardoim *et al*, 2015; Win et al 2017).

## 7 CONCLUSIONES

- La composición del medio de cultivo modificó significativamente el crecimiento de *P. vulgaris* bajo condiciones *in vitro*, encontrando que particularmente la adición de sacarosa (5 g/L) lo estimula y su ausencia lo reprime.
- El medio con sales de Murashige-Skoog al 50% adicionado con 5 g/L de sacarosa (½MS5), permite establecer una asociación de tipo endófito entre *P. vulgaris*-*M. anisopliae* y *P. vulgaris*-*M. oryzae*, bajo condiciones *in vitro*.
- Es posible establecer las asociaciones endófitas *P. vulgaris*-*M. anisopliae* y *P. vulgaris*-*M. oryzae* en medio ½MS5, a partir de los 10 días de contacto, encontrando índices decrecientes de colonización en el siguiente orden: tallo > raíz > hojas.
- Bajo condiciones de no estrés salino, *M. oryzae* mejora el crecimiento de *P. vulgaris* después de 15 días de cultivo en el medio con sales de Murashige-Skoog al 100%, adicionado con 5 g/L de sacarosa (MS5).
- El estrés salino afectó negativamente el crecimiento de *P. vulgaris*, encontrando que la asociación endófito con *M. anisopliae* y *M. oryzae* tienen un efecto neutro sobre el crecimiento.

## 8 RECOMENDACIONES

Con base en el trabajo realizado y los resultados obtenidos, se recomiendan los siguientes estudios:

- Para mejorar el entendimiento de la asociación entre *P. vulgaris* - *M. anisopliae* / *M. oryzae*, es conveniente ampliar el número de muestras, así como probar nuevas concentraciones de sales MS y sacarosa.
- Para determinar el momento propicio de la asociación de cada endófito con *P. vulgaris* hacer pruebas cada 24 horas alrededor del día estimado para cada órgano colonizado.
- Para mejorar la tolerancia de las plantas de *P. vulgaris* en asociación endófito con aumentar las concentraciones de NaCl, así como nuevos métodos de inoculación de los microorganismos (aspersión, suspensiones, riegos, etc.).
- Para discernir si los efectos de tolerancia a la salinidad son producidos por los mecanismos naturales de la planta o mejorados por los endófitos, realizar análisis de fitohormonas (prolina, ABA, AIA), así como otros compuestos relacionados al estrés oxidativo (Malondialdehído, superóxido dismutasa).

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. Alcántara M. I. N. (2013). Respuesta antioxidante de *Acacia farnesiana* (L.) Wild bajo condiciones de estrés por arsenato. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Ciudad de México.
2. Alcántara M. I. N., Figueroa M. F., Rivera C. F., Gutiérrez S G., Volke S. T. (2018). An endophytic strain of *Methylobacterium* sp. increases arsenate tolerance in *Acacia farnesiana* (L.) Wild: a proteomic approach. *Science of the Total Environment*.
3. Ansari A. y Moens M. A., Tirry L M. (2005). Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. *BioControl*, 50: 465-475.
4. Argentel L., López D., González L., López R., Gómez E., Girón R. Fonseca I. (2009). Contenido de clorofila e iones en la variedad de trigo harinero Cuba-C-204 en condiciones de estrés salino. *Cultivos Tropicales*, 30 (4): 32-37.
5. Ayers, R. S. y Westcot, D. W. (1987). La calidad del agua y su uso en la agricultura. Estudio FAO Riego y Drenaje 29. Rev. 1. FAO. Roma, Italia. 172 p.
6. Barkla B. J., Vera E. R., Balderas, E. y Pantoja O. (2007). Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. *Biotechnología*, 14: 263 - 272.
7. Azad K., Kaminskyj, S. (2016). A fungal endophyte strategy for mitigating the effect of salt and drought stress on plant growth. *Symbiosis*, 68:73–78.
8. Bayman P. 2006. Diversity, scale and variation of endophytic fungi in leaves of tropical plants. In *Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces*, ed. MJ Bailey, AK Lilley, TM Timms-Wilson, pp. 37-50.
9. Behie S. W., Jones S. J., Bidochka M. J. 2015. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology* 13: 112-119.
10. Bharati T., Kulkarni J. H., Krishnaraj P. U., Alagawadi A. R. 2007. Effect of different carbon sources on the biomass of *Metarhizium anisopliae* (Ma2). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 20 (2): 310-311.
11. Bonilla P. M. 2012. Inoculación y establecimiento endofítico de cepas de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* en plantas de frijol *Phaseolus vulgaris*. Tesis de licenciatura. Universidad Del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Cali, Colombia.
12. Carter, M. R. 2002. Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. *Agronomy journal*: 94: 38-47.
13. Castillo M., Ramírez P., Castillo F. y Miranda S. 2006. Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol ayocote del oriente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29:111-

14. Chanratana M., Han G. H., Choudhury A.R., Sundaram S., Halim M.A., Krishnamoorthy R., Kang Y., Sa T. (2017). Assessment of *Methylobacterium oryzae* CBMB20 aggregates for salt tolerance and plant growth promoting characteristics for bio-inoculant development. *AMB Express* 7: 208 - 218.
15. Chulim A.C., Ramírez G. A. L., Ortega E. H. M., Cruz C.E., Flores R.D., Sánchez B. E. I., Madueño M. A. 2014. Germinación y crecimiento de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de salinidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5: 753-763.
16. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG), A.C. (2011). *Manual de Plagas y Enfermedades en Frijol*. 24 pp.
17. De Simone, M. y Failde de Calvo, V. (2002). El cultivo de poroto en Argentina. *INTA*. 308 pp.
18. Di Benedetto A. y Tognetti J. (2016). Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. *RIA. Revista de investigación agropecuaria*, 42 (3): 258-282.
19. Faria R. T., Rodrigues F. N., Oliveira L. V. R, Müller C. (2004). *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, 22(4): 780-783.
20. Fernández de C. F., Gepts P., López M. (1986). Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 34 pp.
21. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). (2016). *Panorama Agroalimentario*. México.
22. Flowers T., Yeo A. (1986). Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Scientific Research* 13 (1): 75-91.
23. Food and Agriculture Organization (FAO). (1988). Chapter 10: Salt-Affected Soils and their Management. Abrol I. P., Yadav J. S. P., Massoud F. I. Eds. *FAO Soils bulletin* 39. Roma, Italia.
24. Food and Agriculture Organization (FAO). (1991). Guía para la manipulación de semillas forestales. Roma, Italia.
25. Food and Agriculture Organization (FAO). (2015). Status of the World's Soil Resources. Rome, Italy.
26. França D. B., De Sá R. L., Aragão C.A. (2007). Germination, initial growth and cotyledon protein content of bean cultivars under salinity stress. *Revista Brasileira de Sementes*, 29 (2): 106-110.
27. Frey K. P., Burlinson, P., Deveau A., Barret M., Tarkka M. y Sarniguet A. (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75 (4): 583-609.
28. Gama, P. B. S., Inanaga, S., Tanaka, K., Nakazawa, R. (2007). Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, 6 (2): 079-088.

29. García J. E., Posadas J. B., Peticari A. y Lecuona R. E. (2011). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research*, 5 (1): 22-27.
30. García R. E., Pérez P. R., León E. B. L., Pliego M. L. (2013). Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre mosca blanca (*Bemisia tabaci*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6: 1129-1138.
31. Garzón P., García M. 2011. Efecto del estrés por NaCl sobre la anatomía radical y foliar en dos genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Bioagro*, 23 (3): 153-160.
32. Greenfield M., Gómez J. M. I, Ortiz V., Vega F. E., Kramer M., Parsa S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, 95: 40-48.
33. González A. R. M., Flores V. M. J. F., Jiménez B. J. F., Rangel L. J. A. y Ramírez P. J. G. (2006). Caracterización fisiológica del efecto del estrés salino en frijol (*Phaseolus vulgaris*). III encuentro participación de la mujer en la ciencia. Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas.
34. Hardoim P.R., Van Overbeek L. S., Berg G., Pirttilä A. M., Compant S., Campisano A., Doring M., Sessitsch A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary considerations for defining function of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79 (3): 294-320.
35. Hernández L. V. M., Vargas V. M. L. P., Muruaga M. J. S., Hernández D. S. y Mayek P. N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y perspectivas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 36 (2): 95 - 104
36. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2015). Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) 2014, información relevante.
37. Iguchi H, Yurimoto H, Sakai Y. (2015). Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria. *Microorganisms* 3: 137-151.
38. Jordan, M.; Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas (Capítulo XV). En: Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
39. Kaymakanova M., Stoeva N. (2008). Physiological reaction of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) to salt stress. *General and Applied Plant Physiology*, special issue, 34 (3-4): 177-188.
40. Kepler R. M., Humber RA, Bischoff J. F, Rehner S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106 (4): 811-829.
41. Khan, A. L., Hamayun, M., Khan, S.A. Sang-Mo K., Shinwari Z. K., Kamran M., Rehman S. U., Kim J. G.,

- Lee I. J. (2012). Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1483.
42. Kumar M., Singh T. R., Lade H., Diby P. (2016). Methylo-trophic bacteria in sustainable agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32:120.
43. Lee Y., Krishnamoorthy R., Selvakumar G., Kim K., Sa T. (2015). Alleviation of salt stress in maize plant by co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and *Methylobacterium oryzae* CBMB20. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(4):533-540
44. Martínez V. N., López A. C. V., Basurto S.M., Pérez L. R. (2011). Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Tecnociencia Chihuahua*, 5 (3): 156-161
45. Maas, E. V. (1990). Crop salt tolerance. In: Tanji, K. K. (Ed.). Agricultural salinity assessment and management. *American Society of Civil Engineers (ASCE)*. New York, USA. 262-304 pp.
46. Meena K. K., Kumar M., Kalyuzhnaya M. G., Yandigeri M. S., Singh D. P., Saxena A. K., Arora D. K. (2012). Epiphytic pink-pigmented methylo-trophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101:777–786
47. Miranda C. S. (1966). Identificación de las especies mexicanas y cultivadas del *Phaseolus*. Colegio de postgraduados. *Serie de investigación*, 8: 1-15.
48. Moreno L., S. 1998. Respuestas morfofisiológicas, bioquímicas y de ultraestructura en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al estrés de salinidad, altas temperaturas y a sequía en etapa de plántula. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León
49. Moreno F. L. P. (2009) Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 27 (2): 179-191.
50. Munns R., Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-81.
51. Nair D. N., Padmavathy S. (2014). Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World Journal*, ID 250693: 1-11.
52. Nóbrega D. M., Camargo N. A. A., Souza S. D., Luiz A. W. (2015). Biotechnological and Agronomic Potential of Endophytic Pink-Pigmented Methylo-trophic *Methylobacterium* spp. *BioMed Research International*, Vol. 2015, Art. 909016.
53. Oliveira C. L. E., Vieira Q. E.; Chaer B. A., Alencar M. C., Fernandes A. E. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012: 1562-1575.
54. Omer Z.S., Tombolini R., Gerhardson B. (2004). Plant colonization by pink-pigmented facultative

- methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbial Ecology* 47: 319-326.
55. Ownley H. B., Gwinn D. K., Vega F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55: 113-128.
  56. Padilla M. G. N., Bernal U. M. G., Vélez A. P. E., y Montoya R. C. (2000). Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. *Cenicafé*, 28-40.
  57. Parsa S., García L. A. M., Castillo K., Ortiz, V., Becerra L. L. A. (2016). Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Fungal biology*, 120: 783-790.
  58. Parihar P., Singh S., Singh R., Pratap, S. V., Mohan S. P. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 4056–4075.
  59. Pasternak D. (1987). Salt tolerance and crop production - A comprehensive approach. *Annual Reviews of Phytopathology*, 25: 271-91.
  60. Patt T. E., Cole G. C., Hanson R. S. (1976) - *Methylobacterium*, a new genus of facultative methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26 (2): 226-229 pp.
  61. Poonguzhali S., Madhaiyan M., Woo-Jong Y., Kyoung-A K., Tong-Min, S. (2008). Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent-marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78:1033–1043
  62. Porrás-Alfaro, A., Bayman, H. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 291-315.
  63. Quintana B. W. A., Pinzón S., E. H. Torres D. F. (2016). Evaluación del crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) CV ica cerinza, bajo estrés salino. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica* 19 (1): 87 - 95.
  64. Rangel D. E. N, Anderson A. J., Roberts D. W. 2008. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological research* 112: 1362–1372
  65. Reinhold H. B., Hurek T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 435–443.
  66. Rekadwad B. N. (2014). Growth promotion of crop plants by *Methylobacterium organophilum*: efficient bio-inoculant and biofertilizer isolated from mud. *Research in Biotechnology*, 5: 1-6.
  67. Richards, L.A. (ed.) (1954). Diagnosis and improvements of saline and alkali soils. USDA. *Agriculture Handbook 60*. 160 pp.
  68. Rodríguez R. J., White J. F. Jr, Arnold A. E., Redman R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and

- functional roles. *New Phytologist*, 182: 314-330.
69. Saikkonen K., Wäli P., Helander M., Faeth S.H. (2004) Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9:275–280.
70. Sasan, K. R. y 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.
71. Sasan, K. R. y Bidochka M. J. (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 (3): 288-293.
72. Strogonov, B. P. (1964). Physiological basis of salt tolerance of plants (as affected by various types of salinity). Israel Program for Scientific Translation. Jerusalem, Israel. 279 pp.
73. Tlecuitl-Beristain. S., Viniegra-González. G., Díaz-Godínez . G., Loera O. (2010) Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*, 169 (5):387-94.
74. Treviño Q. C., Rosas Q. R. (2013). El frijol común: factores que merman su producción. *Revista de divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. Vol. XXVI, Núm. 1.
75. Troncoso A. A.; Matte C.; Venegas M. J.; Cantos M. (1997). Nutrición mineral de las plantas en la agricultura sostenible Consejería de Agricultura y Pesca.: España. Influencia de la concentración de sacarosa en el medio, sobre la respuesta de material de vid "*in vitro*". Pp. 457- 463.
76. Usuki F., Narisawa K., Yonezawa M., Kakishima M. y Hashiba T. (2002). An efficient inoculation method for colonization of Chinese cabbage seedlings by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*. *Journal of General Plant Pathology*, 68: 326-332.
77. Waqas M., Khan A. L., Kamran M., Hamayun M., Kang S. M., Kim Y. H., Leel J. (2012). Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules*, 17: 10754-10773.
78. Wilson D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition, *Oikos*, 73 (2): 274-276.
79. Win P. M., Matsumura E., Fukuda K. (2017). Diversity of tea endophytic fungi: cultivar and tissue preferences. *Applied ecology and environmental research*, 16(1):677-695.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00191

Matrícula: 2162800019

INFLUENCIA DE LA ASOCIACIÓN  
ENTRE PHASEOLUS VULGARIS Y  
DOS MICROORGANISMOS SOBRE LA  
TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 27 del mes de junio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

siendo la primera asesora de la alumna y lector el segundo, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: LEISY MARIELA AREVALO GALAN

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



LEISY MARIELA AREVALO GALAN  
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

ASESORA

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

LECTOR

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL