Utilización de endófitos en plántulas de menta

Dagoberto Castro Restrepo, María Isabel Domínguez Rave, Bertha Myriam Gaviria Gutiérrez, Diana Yurladi Vanegas y Luis Eladio Castro Tabares

Los endófitos son microorganismos presentes en las plantas, pero que no causan síntomas de enfermedades. Los registros de fósiles de plantas indican que estas han estado asociadas con hongos micorrícicos y bacterias, así como con hongos endofíticos por más de 400 millones de años. Ello quiere decir que se asociaron desde que las plantas colonizaron la Tierra, lo cual cumple un importante rol en la evolución de la vida en el planeta (Rodriguez et al., 2009).

La simbiosis entre la planta y el microorganismo requiere una estrecha coordinación de su fisiología, su estructura y sus ciclos de vida. Esta asociación beneficia a las dos partes, debido a que las plantas hospedantes albergan y protegen al endófito, el cual, a su vez, promueve el crecimiento de estas mediante funciones como la solubilización de fósforo y potasio, la fijación del nitrógeno y la síntesis de fitohormonas (Zhao et al., 2015). De igual manera, los microorganismos endófitos son un método de control biológico, pues estos compiten con los patógenos por los mismos lugares dentro de la planta y tienen la capacidad de liberar sustancias antibióticas y compuestos orgánicos. En el caso de las plantas medicinales, los endófitos pueden producir metabolitos bioactivos e inducir la producción de metabolitos secundarios. La simbiosis entre plantas y microorganismos es un proceso evolutivo altamente especializado y su interacción ocurre tanto en la zona radical como en la parte aérea de las plantas.

Simbiontes que se asocian a las raíces (microorganismos rizosféricos)

Los principales grupos de microorganismos, aunque difieren en sus mecanismos de infección y formas de vida, desarrollan un papel importante como simbiontes. Estos son:

Hongos micorrícicos arbusculares (HMA): son simbiontes obligados de las plantas, los cuales no pueden ser cultivados y no pueden desarrollarse si no existe una planta huésped, aunque algunas especies como *Rhizophagus* spp. se pueden cultivar *in vitro* en placas de dos compartimentos, donde es posible recolectar material fúngico de un compartimento solo para hongos (Rosikiewicz et al., 2017).

Los HMA forman asociaciones con la mayoría de las plantas terrestres. Su infección y establecimiento dentro de las raíces es un proceso complejo de redes y señales químicas entre el hongo y la planta hospedante que, como se mencionó anteriormente, ha evolucionado por millones de años. Una vez el hongo se asocia a la raíz, forma estructuras lobuladas relativamente grandes denominadas arbúsculos, que se localizan dentro de la pared celular del huésped y la membrana celular de la planta (Harman & Uphoff, 2019). Estas asociaciones de hongos con las raíces de las plantas mejoran su desarrollo debido a un incremento en la absorción de nutrientes poco móviles como el fósforo y la producción de compuestos promotores de crecimiento, tolerancia a estrés hídrico y salinidad, así como a enfermedades y nematodos, además de optimizar la estructura del suelo dada la producción de glomalinas.

Bajo condiciones de invernadero, se realizó un ensayo con plántulas de *M. spicata* inoculadas con hongos formadores de micorrizas del género *Rhizophagus* spp., las cuales se compararon con plantas sin inocular. A los 30 días se realizó una infección con un inóculo de *Rhizoctonia* sp., aplicado en las raíces. De acuerdo con los resultados, las plantas inoculadas con *Rhizophagus* spp. mostraron mejor respuesta en la producción de biomasa seca (figura 2.19a) y menor incidencia de la enfermedad causada por *Rhizoctonia* (figura 2.19). Ello confirma el efecto benéfico de la simbiosis.

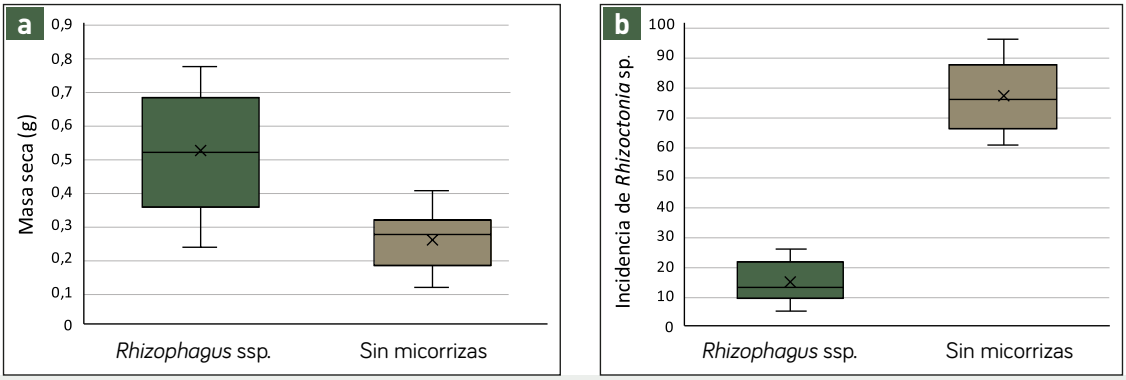


Figura 2.19. Efecto de inoculación de *M. spicata* con *Rhizophagus* spp.
a. Materia seca en plantas con y sin inoculación; **b.** Incidencia de *Rhizoctonia* spp. en plantas con y sin inoculación. Los resultados corresponden a las medias de tres repeticiones con 15 unidades experimentales. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$; Tukey HSD).

Fuente: Elaboración propia

El hongo del género *Trichoderma* es quizá uno de los que tienen mayor distribución en el mundo y con mayor presencia en los suelos. Los miembros de este género tienen diferentes estilos de vida, incluyendo saprófitos para la degradación de sustratos complejos como los componentes de celulosa, quitina y lignina, otros que colonizan las partes aéreas, e incluso algunas cepas que pueden colonizar las raíces de las plantas a través de la penetración directa de las paredes celulares, convirtiéndose en endófitos eficientes que persisten durante el ciclo de vida de la planta (Neumann & Laing, 2006).

Trichoderma tiene efectos directos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, una mejor absorción de nutrientes y eficiencia en la utilización de fertilizantes, además de inducir resistencia sistémica (RSI) a las enfermedades (Brotman et al., 2013).

En el presente proyecto, las investigaciones que se realizaron en condiciones de vivero mostraron que las plantas tratadas con *Trichoderma asperellum* presentaron tolerancia a la enfermedad, causada por el hongo *Rhizoctonia* sp., e indujo una mayor acumulación de biomasa seca, es decir, un mayor desarrollo frente a plantas que no tuvieron este endófito. Asimismo, se logró obtener un contenido de ácido rosmarínico de 28 mg/100 g de muestra, en los aceites esenciales de *M. spicata*, cuando las plantas tuvieron el endófito de *Trichoderma asperellum*, mientras que en plantas sin inocular los contenidos fueron de 10 mg/100 g de muestra.

Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV): son microorganismos benéficos que viven en el suelo y colonizan la zona adyacente a la raíz de las plantas (rizosfera), promueven su desarrollo y facilitan la absorción y utilización de nutrientes minerales. Las RPCV pueden incrementar la producción de los cultivos y disminuir la ocurrencia de enfermedades, por lo que es una alternativa en el manejo sostenible de los cultivos. Las más conocidas son *Pseudomonas, Bacillus, Agrobacterium, Erwinia, Flavobacteria, Pasteuria, Enterobacter* y *Azospirillum* (Huang et al., 2017).

Las RPCV pueden sintetizar reguladores de crecimiento y sideróforos que mejoran el crecimiento de las plantas y transformar elementos nutrientes poco asimilables para beneficiar su absorción (incluyendo solubilización de fosfatos, sílice y fijación de nitrógeno).

En las investigaciones realizadas con *Mentha spicata*, se demostró que las plantas con el endófito *Bacillus subtilis* mejoraron la tolerancia a enfermedades como *Rhizoctonia* sp. y el crecimiento de las plantas en condiciones de vivero.

Microorganismos que se asocian a la filósfera

La filósfera es la parte aérea de las plantas, principalmente la superficie de las hojas, la cual es un ambiente ampliamente habitado por diversos microorganismos que conforman una microflora específica.

Las células y esporas de los microorganismos llegan a la superficie de las hojas y entran en contacto inicialmente con la cutícula, una capa hidrofóbica que protege a las plantas contra la deshidratación y otros tipos de estrés; después, los microorganismos ingresan a los tejidos internos de la hoja a través de los estomas y colonizan primero los espacios intercelulares del mesófilo esponjoso. Así, se acercan a las venas menores de las hojas, donde los azúcares que se transportan en los elementos del floema sirven de fuente de energía a los microorganismos (Vacher et al., 2016). Entre los microorganismos de la hoja más comunes se encuentran:

Bacterias: proteobacterias (*Beijerinckia, Azotobacter* y *Klebsiella*), cianobacterias (*Nostoc, Scytonema* y *Stigonema*) y bacterias (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* spp.).

Hongos: principalmente levaduras y hongos filamentosos. De manera especial, se destacan algunos hongos entomopatógenos como *Beauveria* spp., *Metharhizium* spp., *Lecanicillium lecanii, Paecilomyces* spp., entre otros.

Utilidad de los endófitos

Conocer los procesos de la simbiosis planta-microbio permite tomar decisiones para el manejo integrado de los cultivos. A continuación, se describen algunas de las funciones de los endófitos en las plantas.

Promoción del crecimiento vegetal: los hongos formadores de micorrizas colonizan específicamente las raíces de las plantas; sin ellos, muchas especies vegetales no podrían sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Desafortunadamente, debido al desconocimiento sobre su adecuado manejo y a las malas prácticas, como la aplicación de fertilizantes nitrogenados (urea) y fosforados, y al empleo de fungicidas sistémicos, se limita su acción y funcionamiento. Está demostrado que los HMA aumentan la absorción de fósforo, inducen la resistencia a patógenos del suelo y pueden reducir el estrés abiótico (salinidad, sequía) (Alam et al., 2021).

Los hongos como *Serendipita indica* y las cepas de *Trichoderma* son endófitos que colonizan las raíces de la mayoría de las plantas para mejorar el crecimiento

de brotes y raíces. De igual manera, inducen la resistencia de las plantas a enfermedades y plagas y tienen efectos en la solubilización del fósforo fijado en el suelo. A diferencia de los HMA, se pueden cultivar eficientemente en medios de cultivo artificiales (Schulz et al., 2002).

Bacterias como *Azospirillum* sp., *Bacillus subtilis* sp. y *Pseudomonas* sp. han sido suficientemente estudiadas como microorganismos que colonizan la rizosfera y alteran la arquitectura de las raíces, además de que promueven la producción de hormonas vegetales como el ácido indolacético (AIA), las citoquininas y el ácido giberélico (GA3), los cuales generan un incremento en la superficie radicular de las plantas y la formación de raíces secundarias (Wu et al., 2021).

Control de insectos plaga y enfermedades en cultivos. En diversos estudios se ha mostrado que los hongos formadores de micorrizas pueden disminuir la presencia de diversos patógenos como hongos, oomicetos, bacterias, virus y nematodos. Algo similar se ha encontrado con *Serendipita indica*, que protege la planta contra patógenos como *Verticillium*, *Fusarium, Rhizoctonia* y otras enfermedades, a través de mecanismos como la producción de metabolitos y enzimas que mejoran la respuesta de la planta.

En el caso de *Trichoderma* spp., se ha demostrado que tiene la capacidad de controlar muchos organismos patógenos como hongos (*Fusarium, Colletotrichum, Alternaria* y *Rhizoctonia*), oomicetos (*Phytium* y *Phytophthora*) y bacterias (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*) (Harman & Uphoff, 2019).

Beauveria bassiana, Lecanicillium lecanii y *Metharhizium anisopliae* son entomopatógenos que tienen la habilidad de colonizar endófitamente las plantas y pueden tener un papel importante en la protección de las plantas contra insectos herbívoros y enfermedades (Vidal & Jaber, 2015).

La salud del suelo como un factor clave para el equilibrio del agroecosistema

Los actuales sistemas de prácticas agronómicas tienen una incidencia directa sobre aspectos como la producción, la calidad, los rendimientos y la presencia de enfermedades o insectos en los cultivos; todas estas situaciones son los efectos del manejo y pocas veces nos detenemos a pensar sobre sus causas. Se ha visto que los microorganismos juegan un rol importante en el comportamiento de las plantas a partir de la simbiosis, que ocurre desde el mismo momento en que estas inician la colonización del planeta Tierra.

Una de las principales causas, si no la más importante, es el problema del crecimiento poblacional, ya que actualmente se requiere alimentar a una población de 8.000 millones de habitantes. A ello se suma el inadecuado manejo de la producción agrícola y pecuaria, junto a los recurrentes fenómenos de eutrofización de las aguas por los excesos de nitrógeno y fósforo procedentes de los fertilizantes, la erosión, la desertificación y la salinización, entre otros.

En ese sentido, es necesario reconocer el suelo como un organismo vivo. Esto fue demostrado científicamente por Minami (2021), quien encontró semejanzas con los sistemas de vida y argumentó que el suelo ingiere, digiere, utiliza y excreta material y energía, y también que este sistema de vida reconoce el medio ambiente y abstrae, forma redes, completa, acumula y recuerda información.

Teniendo en cuenta que el suelo es una base de recursos finitos que sostiene la vida en el planeta, y que la biota (microorganismos, mesoorganismos y macroorganismos) le ayuda a realizar sus funciones, así como a soportar usos específicos como la agricultura, la referencia a la salud del suelo debe hacer parte de los diferentes análisis relativos a la materia orgánica, la diversidad y el número de organismos y constituyentes o productos microbianos, que se complementan con otros indicadores de calidad del suelo, tales como sus características físicas y químicas.

En resumen, a partir de la articulación entre los análisis de salud y calidad del suelo, se obtendrá una mejor respuesta en cuanto a la disponibilidad y el ciclo de nutrientes, así como la capacidad de prevenir los daños por plagas y enfermedades en los cultivos. La figura 2.20 muestra algunas alternativas para mejorar la salud y calidad de los suelos.



Figura 2.20. Estrategias para mejorar la salud y calidad de los suelos.
Fuente: Elaboración propia

Cómo utilizar los endófitos en la agricultura

Las plantas aromáticas, condimentarias y medicinales tienen restricciones para el empleo de agroquímicos, debido a que su presencia en los tejidos vegetales puede alterar la calidad de los metabolitos secundarios y, por lo tanto, la salud de los consumidores. Esto, sumado a las percepciones sobre sus efectos en el medio ambiente, justifica el reto de buscar alternativas de manejo.

En el presente proyecto, la utilización de los endófitos en micropropagación mejoró el crecimiento de *M. spicata*; se indujo resistencia sistémica a patógenos y aumentó los contenidos de ácidos polifenólicos totales que contribuyen a la actividad antioxidante, y del ácido rosmarínico, que es un potente agente antimicrobial.

La tabla 2.1 presenta el momento de aplicación de algunos endófitos evaluados en el cultivo de menta.

Tabla 2.1. Momentos de aplicación de endófitos en menta

Agente biológico	Momento de aplicación
Micorrizas (hongos formadores de micorrizas)	En la etapa de endurecimiento de plantas *in vitro*.
	En esquejes durante la fase de enraizamiento.
	En semillas durante la etapa de germinación.
Trichoderma spp.	Al menos una semana antes de realizar la siembra, para prevenir el ataque de enfermedades.
	En el momento del trasplante al suelo en forma de drench.
	Durante el enraizamiento de esquejes y la germinación de semillas.
Bacillus spp.	Se puede aplicar al sustrato junto con *Trichoderma*.
	Cuando aparezcan pudriciones bacteriales.
Beauveria bassiana, Lecanicillium lecanii y *Metharhizium anisopliae*	Cuando se hayan formado verdaderas hojas para prevenir el ataque de trips, mosca blanca, áfidos y ácaros, entre otros.

Fuente: Elaboración propia

Referencias

Alam, B., Li, J., Ge, Q., Alam, M., Go, J., Mehmood, S., Yuán, Y., & Go, W. (2021). Endophytic fungi: From symbiosis to secondary metabolite communications or viceversa? *Frontiers in Plant Science, 12*, Article 791033. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.791033

Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A., & Willmitzer, L. (2013). Trichoderma-plant root colonization: Escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*, *9*(4), Article 1003221. https://doi.org/10.1371/annotation/8b818c15-3fe0-4e56-9be2-e44fd1ed3fae

Harman, G. E., & Uphoff, N. (2019). Symbiotic root-endophytic soil microbes improve crop productivity and provide environmental benefits. *Scientifica*, Article ID 9106395. https://doi.org/10.1155/2019/9106395

Huang, Y., Wu, Z., He, Y., Ye, B., & Li, C. (2017). Rhizospheric *Bacillus subtilis* exhibits biocontrol effect against *Rhizoctonia solani* in pepper (*Capsicum annuum*). *BioMed Research International*, Article ID 9397619. https://doi.org/10.1155/2017/9397619

Minami, K. (2021). Soil is a living substance. *Soil Science and Plant Nutrition*, *67*(1), 26-30. https://doi.org/10.1080/00380768.2020.1827939

Neumann, B., & Laing, M. (2006). Trichoderma: An ally in the quest for soil system sustainability. En N. Uphoff & J. Thies (Eds.), *Biological approaches to sustainable soil systems* (pp. 491-500). Routledge.

Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, *182*(2), 314-330. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x

Rosikiewicz, P., Bonvin, J., & Sanders, I. (2017). Cost-efficient production of *in vitro Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza*, *27*, 477- 486. https://link.springer.com/article/10.1007/s00572-017-0763-2

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, *106*(9), 996-1004.

Vacher, C., Hampe, A., Annabel, J., Porte, A., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. (2016). The phyllosphere: Microbial jungle at the plant-climate interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *47*, 1-24.

Vidal, S., & Jaber, L. (2015). Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science*, *109*(1), 46-54.

Wu, W., Chen, W., Liu, S., Wu, J., Zhu, Y., Qin, L., & Zhu, B. (2021). Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants. *Frontier in Plant Science*, *12*, Article 646146. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646146

Zhao, L., Xu, Y., Lai, X., Shan, Ch., Deng, Z., & Ji, Y. (2015). Screening and characterization of endophytic Bacillus and Paenibacillus strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(4), 977-989. https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140024