

EL PAPEL DE LOS VOLÁTILES EN LA DELIMITACIÓN DEL ESPACIO DE HONGOS ENDÓFITOS DE FRIJOL LIMA

Morales Martínez Nancy Lorena (1), Elizarraraz Martínez Iris Jahel (2), Quintana Rodríguez Elizabeth (2), Heil Martin (2)

¹ [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [NancyLorena_Morales@live.com]

² [Laboratorio de Ecología de plantas, Dpto. Ingeniería Genética, CINVESTAV Irapuato] | [iris.elizarraraz@cinvestav.mx/equintana@ira.cinvestav.mx/ martin.heil@cinvestav.mx]

Resumen

Los hongos endófitos viven dentro de todas las plantas investigadas hasta ahora. Estos hongos no causan síntomas de enfermedad y pueden mostrar efectos benéficos para su hospedero. A pesar de que se ha encontrado una gran diversidad dentro de un mismo tejido, aún no se conoce cómo mantienen sus interacciones dentro de la planta. Los volátiles podrían constituir una excelente señal para mediar tales interacciones. Para investigar el papel de los COVs en las interacciones entre hongos endófitos, se tomaron 9 cepas aisladas de frijol lima, se cultivaron en placas Petri con dos medios de cultivo: PDA y agar con extracto de hoja: (a) sin confrontación (b) en confrontación directa (dual) y (c) en confrontación indirecta. Los incrementos en los diámetros miceliales se midieron diariamente para comparar las tasas de crecimiento obtenidas. Efectos neutros se observaron en 55 respuestas de los hongos en las confrontaciones realizadas en PDA, mientras que en medio de hoja, aumentó hasta 65. El aumento en el número de interacciones neutras en medio de hoja indica que estos hongos podrían estar adaptados a convivir entre ellos. Los efectos inhibitorios observados en numerosas confrontaciones indirectas indican la importancia de los COVs en las interacciones que suceden entre hongos endófitos.

Abstract

Endophyte fungi live within all plants investigated so far. These fungi do not cause disease symptoms and can also show beneficial effects to its host. Although it has been found a great diversity inside one tissue, it is still unknown how it is maintained the interactions inside the plant. Volatile organic compounds could be an excellent sign to mediate that interactions. To investigate the role of VOCs in the interactions between endophytic fungi, we took 9 isolates of lima bean were cultivated in Petri dishes on two growth media: PDA and agar with leaf extract: (a) without confrontation (b) in direct (dual) and (c) indirect confrontation. Increases in the diameters of the mycelia were measured daily to compare the growth cups obtained. The complete experiment was performed on agar with leaf extract. Neutral effects were observed in 55 fungi responses in confrontation on PDA, while in lima bean leaf medium increased till 65. The increase in the number of neutral interactions in leaf medium indicates that these fungi could be adapted to coexist between them. The inhibitory effects observed in numerous indirect confrontations indicate the importance of VOCs in the interactions that occur between endophytic fungi.

Palabras Clave

Confrontación dual; Compuestos Orgánicos Volátiles, Interacciones entre endófitos

INTRODUCCIÓN

El término hongo endófito hace referencia a todos a los organismos fúngicos que viven dentro de las plantas sanas [1,2]. Los hongos endófitos se encuentran colonizando a la planta durante todo su ciclo de vida, y son productores de metabolitos secundario, además cumplen con diversas funciones entre ellas; el aumento a tolerancia ante estrés, ayudan a la protección contra la herbivoría y a microorganismos patógenos [3]. Los hongos endófitos forman relaciones simbióticas complejas con su hospedera dicha simbiosis tomara diversos comportamientos de acuerdo a los escenarios climáticos [4,5].

El frijol lima (*Phaseolus lunatus*) es una especie de planta de la familia de leguminosas que tiene diversas variedades en todo el mundo, es una de las especies de mayor distribución. [6,7]. De esta planta se han aislado más de 450 hongos endófitos foliares (Navarro-Melendez 2014, datos no publicados). Por lo tanto, la identidad de los hongos y la estructura de la comunidad que forman en la planta no sólo depende de la planta hospedera, sino también de las interacciones entre ellos, que pueden resultar dañinas (inhibición del crecimiento) tanto como benéficas (inducción del crecimiento) [8]. Sin embargo, no se conocen los mecanismos bioquímicos mediante de los cuales los hongos interactúan, definen y delimitan sus interacciones dentro de las hojas [2,7,8]. Nos enfocamos en los compuestos orgánicos volátiles (COVs): metabolitos que se difunden en el aire [9], los cuales son emitidos por muchos hongos y que se ha observado que inhiben parcial o totalmente el crecimiento de las hifas de otros hongos [10]. En el presente trabajo se analizaron las interacciones *in vitro* entre los hongos endófitos, procedentes de hojas de frijol lima que se aislaron del mismo tejido, realizándose confrontaciones *in vitro*, de forma directa e indirecta (placas divididas) que implica únicamente un intercambio de compuestos aéreos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de los endófitos utilizados: U027, *Cochliobolus lunatus*, U066, *C. geniculatus*, U081, U089, *Fusarium sp.*, *C. verruculosus* y C2E, fueron aislados de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) [11]. Los

endófitos fueron inoculados en medio agar dextrosa papa (PDA), con un círculo de 0.5 cm de diámetro de un cultivo axénico, para posteriormente realizar las confrontaciones.

Confrontaciones *in vitro*

Se realizaron confrontaciones duales conforme a Elizarraraz-Martinez *et al.* (2015) con algunas modificaciones; se mantuvo una distancia entre ambos hongos de 6 cm y se realizaron confrontaciones directas e indirectas en ambos medios: PDA y medio de hoja de frijol lima. Para las confrontaciones indirectas se realizó una ruptura al medio, cortando 1 cm de agar en la parte media del medio.

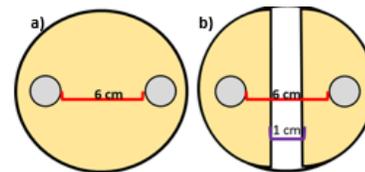


Figura 1: Representación de los modelos de confrontación directa (a) e indirecta (b).

Se cultivaron en 3 condiciones a) sin confrontación, b) confrontación dual directa y c) confrontación dual indirecta. Todas las confrontaciones de endófitos fueron repetidas cinco veces teniendo sus respectivos controles. Las cajas fueron incubadas a 28° C. El crecimiento radial micelial fue registrado midiéndolo diariamente durante 7 días y comparando con el control (sin confrontación).

Para calcular la inhibición/crecimiento de cada una de las cepas se utilizó la fórmula

$$\text{inhibición/crecimiento} = \frac{d_{ctrl} - d_{conf}}{d_{ctrl}}$$

donde d_{ctrl} , es el diámetro micelial del endófito sin confrontación (axénico) y, d_{conf} , es el diámetro micelial del endófito en confrontación.

Para la clasificación de las respuestas individuales de los hongos se tomó el resultado obtenido de la ecuación anterior para cada uno de los hongos en confrontación; positivas (crecimiento, >0), negativas (inhibición, <0) o neutras (igual a 0). Se

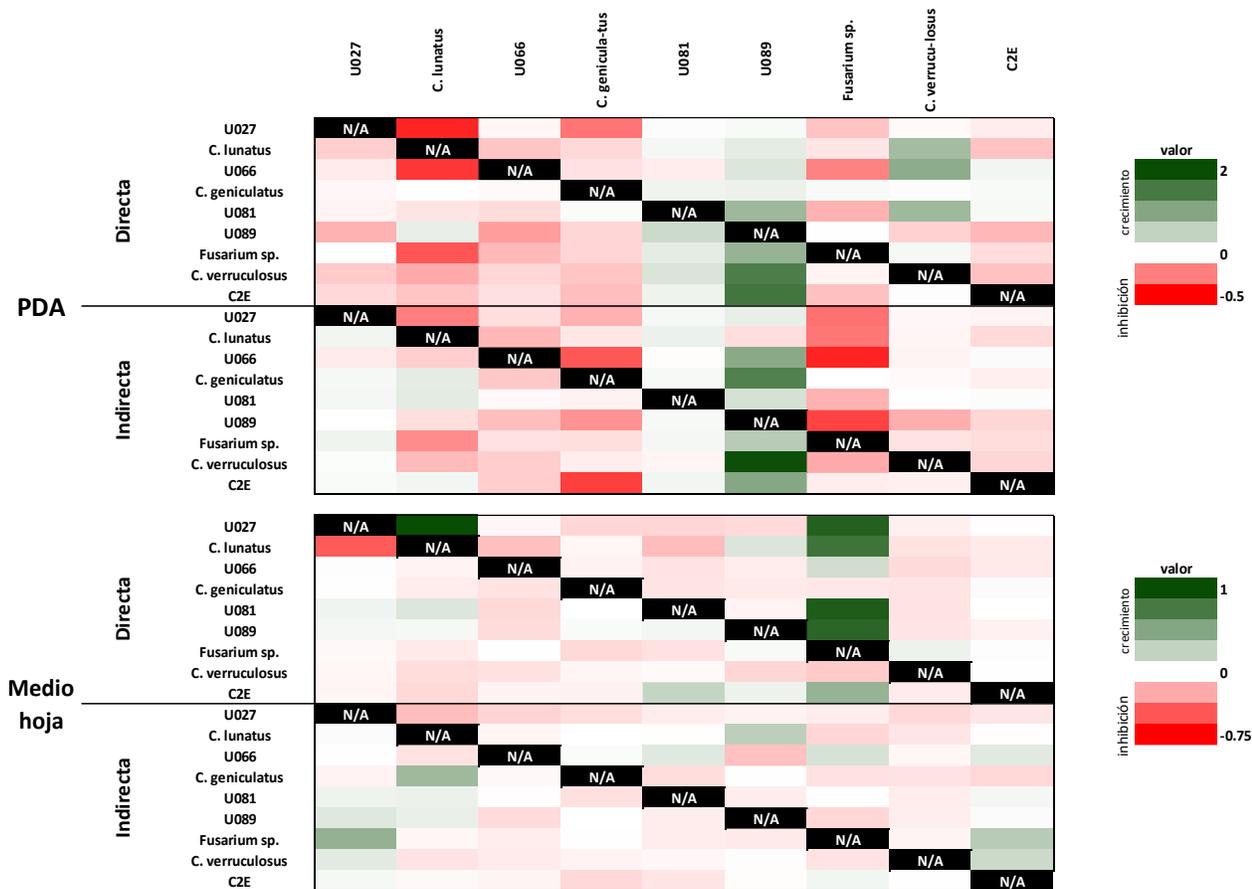


Figura 2: Heatmaps de los porcentajes de crecimiento e inhibición promedio en los 7 días de medición en los dos medios de cultivo y en las dos condiciones de crecimiento. Se muestra el efecto que tienen los hongos mostrados en el eje x sobre los hongos del eje y.

utilizó Microsoft Excel® para la generación de los heatmaps y se tomó como número mayor y menor los valores más altos a los que se llegaba en cada caso.

Para el conteo de número y tipo de interacciones se realizaron rangos en el crecimiento/inhibición en comparación con el control y se dio más rango a las interacciones neutras (-0.2 a 0.2) para poder obtener sólo como inhibición o crecimiento los valores extremos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, se observó que en medio PDA la mayoría de las confrontaciones tienden a ser inhibitorias (Fig 2 tendiendo a color rojo), mientras que, en medio de hoja, la mayoría tienden a ser

neutras.(Fig 2 tendiendo a color blanco). Comparando entre medios y las dos condiciones de crecimiento, en PDA se tienen cambios sobre los hongos *C. lunatus* (disminución de inhibición) y *C. verruculosus* (de crecimiento a neutro). En medio de hoja comparando entre las confrontaciones directa e indirecta se ven cambios sobre el hongo *Fusarium sp.* que cambia de crecimiento a un comportamiento más parecido al neutro. Por lo que se puede observar que los volátiles emitidos por los endófitos pueden tener un rol en la delimitación del espacio entre ellos [12], más que nada de mantenimiento del espacio. Además, se observó que el crecimiento en medio de hoja es diferente al que se obtiene en PDA.

Se puede observar el cambio de respuesta en la interacción U027 en confrontación con *C. lunatus*.

Como se observa en la figura 2 y 3, la delimitación del espacio se da principalmente por la liberación de COVs ya que la respuesta cambia al estar en confrontación directa e indirecta.

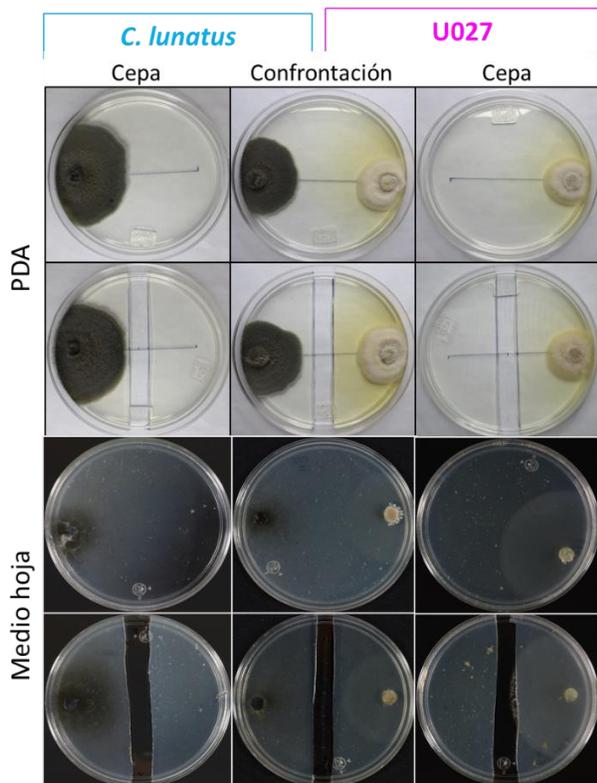


Figura 3: Diferencias en la respuesta de los hongos *C. lunatus* vs. U027 en medio PDA y medio hoja. Se muestran los tratamientos realizados para las confrontaciones.

Como se muestra en la tabla 1, usando el medio de hoja, efectos inhibitorios se observaron en sólo 4 de las confrontaciones directas y en 2 de confrontaciones indirectas, mientras el crecimiento se indujo en 7 de las confrontaciones directas y en 5 de las indirectas. Los efectos inhibitorios observados en numerosas confrontaciones indirectas pueden indicar la importancia de los COVs en las interacciones que suceden entre hongos endófitos, concordando con Fryar et al. [8], Yuent et al. [14] y Arnold et al. [15] ya que ellos observaron que los hongos son productores de metabolitos secundarios al estar interactuando con otros hongos endófitos; y se ha demostrado *in vitro* que algunos COVs disminuyen el crecimiento de las

hifas de hongos como *Colletotrichum lindemuthianum*[10]. Además, el aumento en las respuestas neutras en medio de hojas, con respecto a PDA, indica que estos hongos podrían estar adaptados a convivir en el medioambiente específico representado por hojas del frijol lima.

Tabla 1: Número y tipos de interacción por cada medio de cultivo y condición de crecimiento.

| Medio de cultivo | Condición | Tipo de respuesta | | |
|-------------------------------|-----------|-------------------|--------|----------|
| | | Negativa | Neutra | Positiva |
| PDA | Directa | 5 | 55 | 12 |
| | Indirecta | 9 | 55 | 8 |
| Medio de hojas de frijol lima | Directa | 4 | 61 | 7 |
| | Indirecta | 2 | 65 | 5 |

CONCLUSIONES

Los efectos neutros observados en numerosas confrontaciones indirectas indican la importancia de los COVs en las interacciones que suceden entre hongos endófitos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Martin Heil por permitir realizar el trabajo en el Laboratorio de Ecología de Plantas en el CINVESTAV-Irapuato a su cargo y a la Ing. Iris Jahel Elizarraraz Martínez por sus conocimientos y tiempo.

REFERENCIAS

[1] Partida-Martinez, L. P., & Heil, M. (2011). The microbe-free plant: fact or artifact? *Front Plant Sci*, 2, 100. doi: 10.3389/fpls.2011.00100

- [2] Sánchez Fernández R., Sánchez Ortiz B., Sandoval Espinosa Y., Ulloa Benítez A., Armendáriz Guillén B., García Méndez C. & Macías Rubalcava M.. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*. 16(2): p.132-146.
- [3] Hashizume Y., Fukuda K., and Sahashi N.. (2010). Effects of summer temperature on fungal endophyte assemblages in Japanese beech (*Fagus crenata*) leaves in pure beech stands, NRC Research Press, Botany 88: p.266–274
- [4] López-Alcocer J. de J., Lépiz Ildefonso R., González Eguarte D. R., Rodríguez Macías R. y López Alcocer E.. (2015). Morphological variability of wild phaseolus lunatus l. from the western region of Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 39 (1): p. 49 – 58
- [5] Rodrigues R. e L., Nascimento Edilza S., Thalles Jocelino J., Silva Pinto L., Rizzi C., Marques Bezerra M., Ribeiro Pinto I., Mateus Pereira S., Texeira Pinto V., Filho G., Almeida Gadelha C. A., Gadelha T.. (2016). Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L.var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 95 (2017): p 1072–1081
- [6] Gamboa Gaitán M.A.. (2006). Tropical Endophytic Fungi: Current Knowledge and Perspectives. *Revistas Científicas de América Latina*. Vol. 11: p. 3 – 20.
- [7] Elizarraraz Martínez, I. J., Navarro Meléndez, A. L., & Morales Vargas, A. T. (2015). Análisis in vitro de las interacciones entre hongos endófitos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). *Jóvenes en la ciencia* Vol 1: 60-64
- [8] Fryar S.C., Booth W., Davies J., Hodgkiss I. , Hyde K.. (2005). Evidence of in situ competition between fungi in freshwater. *Fungal diversity*. 18: p. 15649-15654.
- [9] Lopez Gonzalez R. C., Gomez Cornelio S., Rosa García S., Garrido E., Oropesa Mariano O., Heil M., Partida Martínez L. P..(2016). The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology*. 26 (2017):p .1e10
- [10] Heil M., and Karban R.. (2009). Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Cell press*, Vol.25: p.137-144
- [11] Rivera Macías L. E., Quintana Rodríguez E., Adame Álvarez R.M., Molina Torres J., Heil M..(2017). *Los volátiles de plantas (cvs) ejercen un rol importante en la resistencia directa a hongos patógenos. Jóvenes en la ciencia, vol 2: p. 304-309.*
- [12] Navarro Melendez, A. L., & Heil M. (2014). Symptomless endophytic fungi suppress endogenous levels of salicylic acid and interact with the jasmonate-dependent indirect defense traits of their host, Lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 816-825
- [13] Santamaría J., Bayman P.. (2005). Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*. Volume 50: p. 1–8
- [14] Yuen, T., K. Hyde, I Hodgkiss. (1999). Interspecific interaction among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microbial ecology*. 31(4):257-262.
- [15] Arnold, A. E., Mejía L. C., Kylo D., Rojas Enith I., Maynard Z., Robbins N., Allen Herr Edward. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100 (26): p.15649-15654