

COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EMITIDOS POR *Phaseolus vulgaris* CONTRIBUYEN EN LA DEFENSA HACIA ANTRACNOSIS

Rivera Macías Luis Enrique (1), Morales Vargas Adán T. (1), Adame Álvarez Rosa M. (2), Heil Martin (2) y Quintana Rodríguez Elizabeth (2)

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [luis_rivera.macias@outlook.es]

2 [Ingeniería Genética, Laboratorio de Ecología de Plantas, Irapuato, CINVESTAV] | Dirección de correo electrónico: [equintana@ira.cinvestav.mx]

Resumen

En el presente trabajo, se utilizaron cuatro variedades de frijol común (*P. vulgaris*) clasificadas de acuerdo a su nivel de resistencia hacia *Colletotrichum lindemuthianum* (agente causal de la antracnosis); identificando un cultivar resistente y una línea susceptible. Posteriormente, se analizaron e identificaron los compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos por las plantas resistentes y susceptibles al fitopatógeno. De los perfiles obtenidos fueron seleccionados COVs exclusivos de las plantas resistentes, así como los COVs compartidos por ambas líneas. Los volátiles seleccionados fueron probados para evaluar su actividad antifúngica contra *C. lindemuthianum*. Se encontró que los compuestos presentes en ambas líneas (*cis*-hexenil-acetato, farnesol y cariofileno) no presentaron ningún efecto. Por otro lado, los volátiles nonanal, terpineol y *trans*-2-decanal tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento micelial del patógeno estudiado. Finalmente, concluimos que los COVs pueden actuar como agentes antifúngicos y mediar la resistencia contra el hongo *C. lindemuthianum*.

Abstract

Four varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris*) classified according to their level of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* (causal agent of anthracnose) were used, identifying a resistant and susceptible cultivar line. Subsequently, they were analyzed and identified volatile organic compounds (VOC's) emitted by the plants resistant or susceptible to phytopathogen. From the profiles obtained they were selected the exclusive VOC's for resistant plants and VOCs shared by both lines. The volatiles selected were tested to evaluate their antifungal activity against *C. lindemuthianum*. It was found that the present compounds on both lines (*cis*-hexenyl acetate, farnesol and caryophyllene) did not show any effect. Furthermore, nonanal, terpineol and *trans*-2-decanal had a negative effect on the mycelial growth of pathogen studied. The compounds with the highest antifungal activity were found differentially in the resistant cultivar. Finally, we conclude that VOC's can act as antifungal agents and mediate the resistance against the fungus *C. lindemuthianum*.

Palabras Clave

Colletotrichum lindemuthianum; Frijol común; Antifúngico; Biofungicida; Defensa.

INTRODUCCIÓN

Las plantas al ser organismos sésiles están obligadas a manifestar respuestas de defensa contra a estrés biótico y abiótico, lo que les permite la mejor distribución de sus recursos para crecer, defenderse y reproducirse. No debe, pues, sorprendernos que gran parte de las reacciones de defensa son el reflejo de una gran diversidad bioquímica, resultado de interacciones complejas a lo largo del tiempo [1].

Entre las respuestas de defensa encontramos a los compuestos orgánicos volátiles [2]. La importancia de los volátiles de plantas radica en que pueden actuar como señales para otros organismos, y aún para la misma planta; además, pueden ser exportados y modificar el entorno de las especies que los producen [3]. Aunque poco se ha explorado su actividad antimicrobiana (imagen 1). El frijol constituye una parte esencial en la dieta básica de la población en México. El estado de Guanajuato se posiciona como uno de los productores mayoritarios de este cultivo [4]. Sin embargo, es propenso a un gran número de enfermedades.

El hongo *Colletotrichum lindemuthianum* causa la antracnosis del frijol, una enfermedad presente en todo el mundo que produce pérdidas económicas muy graves. La enfermedad se ve favorecida por alta humedad y temperatura, cuando se logra establecer puede ser devastadora y causar la pérdida completa de la producción en las variedades susceptibles [5].

Entre las estrategias de control se encuentran el uso de variedades resistentes a enfermedades, el uso de la fumigación de suelos, fungicidas y pesticidas que en algunas ocasiones resultan ser ineficientes y los últimos poco amigables con el ambiente. Los compuestos volátiles parecen una alternativa viable y natural para el control de plagas y enfermedades.

El trabajo consistió en analizar e identificar los volátiles emitidos por plantas de frijol común resistentes y susceptibles a *C. lindemuthianum*.

Se analizó la actividad antifúngica de los volátiles seleccionados sobre el patógeno para mostrar la contribución de estos compuestos con la defensa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron dos distintas variedades de la planta *Phaseolus vulgaris*). El cultivar "Pinto Villa" y la especie silvestre "Phaseolus vulgaris 4". Previamente clasificados de acuerdo al nivel de resistencia contra *C. lindemuthianum*, resistente y susceptible respectivamente [6]. Las plantas se encontraron en condiciones de controladas de invernadero. La cepa del fitopatógeno *C. lindemuthianum* se activó en medio sólido PDA (agar potato dextrosa) contenido en cajas Petri por un lapso de 15-20 días a 28°C.

Colecta de COVs

Los volátiles fueron recolectados 24 horas después de la inoculación con el fitopatógeno mediante la técnica de micro-extracción (SPME) [7]. Las fibras fueron expuestas durante 24 horas y luego desorbidas durante 30 segundos directamente en el inyector del cromatógrafo a 180°C. COVs se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS). Los compuestos fueron identificados con ayuda de la biblioteca espectral de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

Ensayo-Desarrollo micelial

Se evaluó el diámetro de inhibición utilizando una versión modificada del método Kirby-Bauer. Consintió en colocar un bocado del aislado de hongo (aprox. 5mm) confrontado a un papel filtro (5mm) que contenía al volátil estudiado (versiones comerciales de lo COVs colectados anteriormente) en concentración natural (10 µL). Todo esto en un cuadro de PDA (2x2cm) suspendido en un portaobjetos y dentro de una caja Petri sellada con una película plástica para evitar la volatilización. Se midió el crecimiento micelial (cm) a los 2 días.

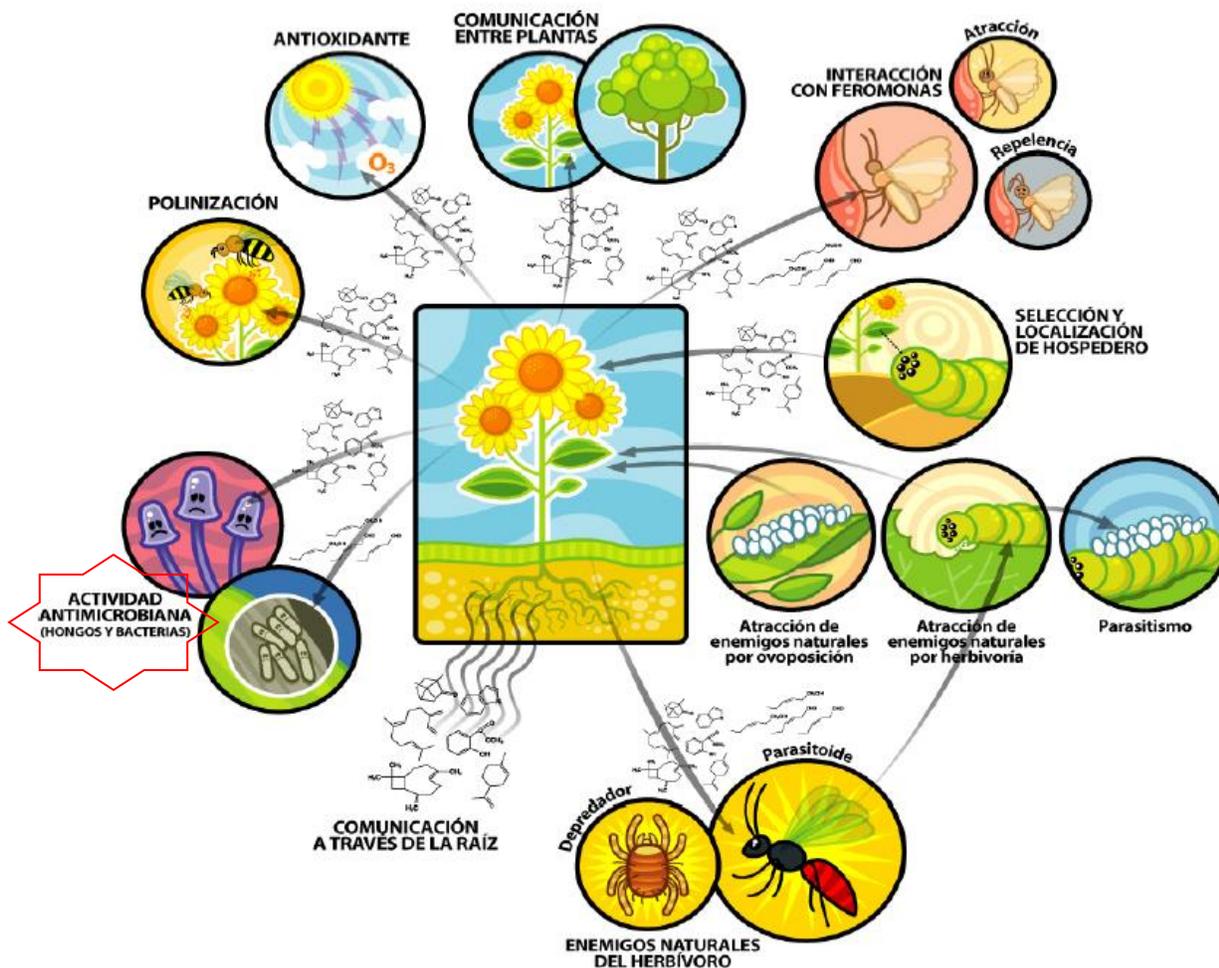


IMAGEN 1.- Propiedades reconocidas para los volátiles de plantas. [3]

RESULTADO Y DISCUSIONES

Se detectó y colectó una cantidad considerable de COVs mediante la técnica SPME, presentando gran diversidad química. La planta resistente mostro mayor cantidad de volátiles, algunos únicos de ese tratamiento como nonanal, trans-2-decanal, limoneno, linalool, metil salicilato., y otros compartidos con la línea susceptible (notablemente en menor cantidad) como cis-hexenil-acetato, farnesol, decanal, copaeno, cariofileno, véase la Tabla 1. En el ensayo de desarrollo, interesantemente se encontró que los volátiles (nonanal, trans-2-decanal y terpineol) emitidos por la planta resistente mostraron una inhibición total en el crecimiento micelial a los 2 días post-exposición, lo que indica que los

volátiles fungicidas derivados de plantas en concentraciones naturales pueden inhibir directamente y eficazmente el crecimiento micelial (imagen 2), una parte central del ciclo reproductivo del hongo. Del mismo modo, los estudios en otros patosistemas indicaron una asociación directa de ciertos compuestos orgánicos volátiles con fenotipos de resistencia. Por ejemplo, la exposición de *Arabidopsis* a trans-2-decanal mostró resistencia contra el patógeno *Botrytis cinerea* [8]. De igual forma el nonanal que inhibió la germinación de hongos e indujo resistencia en frijol lima contra *Pseudomona syringae* [8], posee propiedades antimicrobianas contra *Trichophyton mentagrophytes* [9]. El terpineol aún no reportado con actúa como antifúngico contra *C. lindemuthianum* demostrado en el presente trabajo.

Tabla 1.- COVs emitidos en plantas de frijol común en respuesta a *Colletotrichum I.*

Compuesto Orgánico Volátil	Familia Química	Tratamiento			
		Pinto Villa [Resistente]		Phaseolus vulgaris 4 [Susceptible]	
		Inoculado C.I.	Control	Inoculado C.I.	Control
Beta-Myrcene	Monoterpeno	x	x	x	x
Cis-hexenil-acetato	Éster	✓	✓	✓	✓
Limonene	Monoterpeno	✓	x	x	x
Beta-Pinene	Monoterpeno	x	✓	x	x
Ocimeno	Monoterpeno	✓	✓	✓	✓
Cymol	Desconocido	x	x	x	x
Nonanal	Aldehído	✓	x	x	x
Linalool	Monoterpeno	✓	x	x	✓
Farnesol	Sesquiterpeno	✓	✓	✓	✓
1,5-octadiene-3,7-diol	Desconocido	✓	□	x	x
Terpineol	Monoterpeno	✓	x	x	x
Trans-3-carenil-1-ol	Desconocido	x	x	x	x
Trans-2-decanal	Aldehído	✓	x	x	x
Cis-hexenil-butarato	Ester	✓	□	x	x
Metil salicilato	Éster	✓	x	x	x
Cuminal	Aldehído	x	x	x	x
Decanal	Aldehído	✓	✓	✓	x
Verbenol	Monoterpeno	✓	x	x	x
Citral	Terpenoide	x	x	x	x
Cis-hexenil-valetaro	Éster	✓	x	□	x
Octatrienal	Aldehído	✓	x	x	x
Indole	Fenilpropanoide	x	□	x	x
Copaeno	Sesquiterpeno	✓	x	✓	✓
Beta-Bourbenene	Sesquiterpeno	x	x	x	□
Tetradecaene	Hidrocarburo	✓	x	✓	x
Caryophyllene	Sesquiterpeno	✓	✓	✓	✓
Aromandrene	Sesquiterpeno	x	x	x	□
Gamma-Muuroleene	Sesquiterpeno	✓	✓	□	x

[✓] = Detectado, [x] = No detectado, [□] = Trazas

Efecto en el crecimiento micelial - [Día 2]

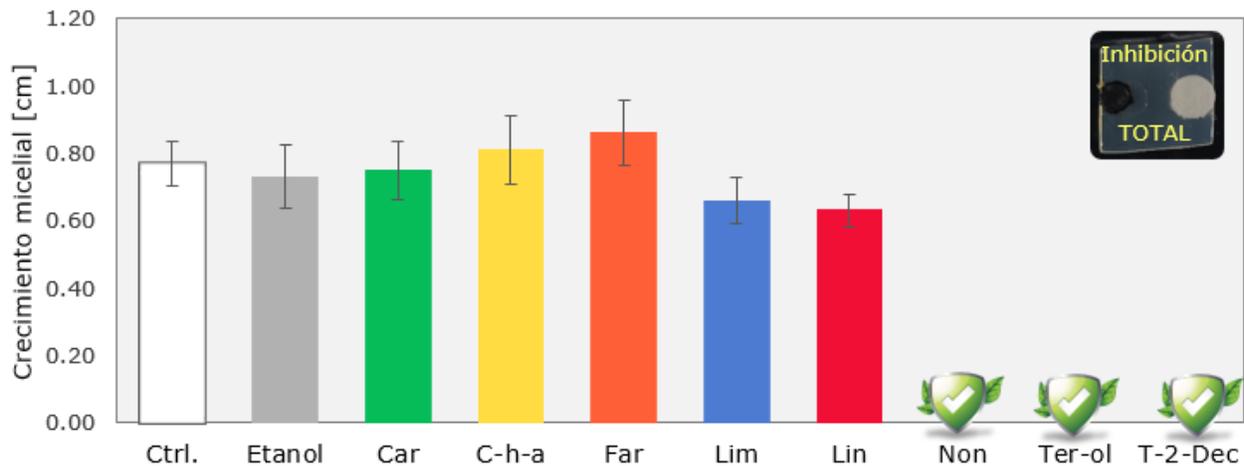


IMAGEN 1.- Efecto de COVs en el desarrollo micelial a 2 días post-exposición.

[Control, Etanol, Cariofileno, Cis-hexenil-acetato, Farnesol, Limoneno, Linalool, Nonanal, Terpeneol, Tras-2-decanal] n=10

CONCLUSIONES

La planta resistente libera mayor cantidad de COVs en comparación con la planta susceptible. De estos compuestos, los compartidos por ambas líneas como Cariofileno y Farnesol no presentaron efecto antifúngico. A diferencia de Nonanal, Terpeneol, Trans-2-Decanal que en concentraciones naturales tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento micelial del fitopatógeno estudiado. La mayor diversidad de COVs se encontró en la familia de los terpenos, lo que muestra un indicio que quizás la estructura o el origen de los compuestos influye en la capacidad de estos para bloquear o inhibir el desarrollo fúngico.

AGRADECIMIENTOS

Total agradecimiento a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Ecología de plantas del CINVESTAV-Irapuato que lidera el Dr. Martin Heil, especialmente a la Dra. Elizabeth Quintana por confiar en mi trabajo y apoyarme a cada momento.

REFERENCIAS

- [1] M. Vivanco, M.J., Cosio, E., Vargas, L.V. & Flores, E.H., (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia, Volumen (1), pp. 68-75
- [2] Heil, M., (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. New Phytologist, Vol. (178), pp. 41-61
- [3] Marín, J. C. & Céspedes, C. L., (2007). Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications. Revista Fitotecnia Mexicana, Vol. (30), pp. 327-351
- [4] SAGARPA. (2010). Análisis de la cadena de valor del frijol. Secretaría de Economía, Vol. (1), pp. 1-5
- [5] Castellanos, G., Jara, C., Mosquera, G., (1990). Enfermedad: Antracnosis, CIAT, Vol. (1), pp. 1-8
- [6] Quintana, R.E., Morales, V.A., Torres, M.J., Ádame, A.R., Gallegos, A.J., Heil, M. (2014). Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. Journal of Ecology, pp. 1-10
- [7] Tholl, D., et al. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. The plant journal, Vol. (45), pp. 540-560
- [8] Yi, H.-S., Heil, M., Ádame, R.M., Ballhorn, D.J., Ryu, C.-M. (2009). Airborne Induction and Priming of Plant Defenses against a Bacterial Pathogen. Plant Physiology, Vol. (151), pp. 2152-2161
- [9] Wood, W.F. (2007). Volatile antimicrobial compounds in the pelage of the Mexican free-tailed, *Tadarida brasiliensis mexicana*. Biochemical Systematics and Ecology, pp. 1-3