

LOS VOLÁTILES DE PLANTAS (COVs) EJERCEN UN ROL IMPORTANTE EN LA RESISTENCIA DIRECTA A HONGOS PATÓGENOS

Luis E. Rivera-Macías (1), Elizabeth Quintana-Rodríguez (2), Rosa M. Adame-Álvarez (2), Jorge Molina-Torres (2) y Martin Heil (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 – mheil@ira.cinvestav.mx]

Resumen

Naturalmente las plantas responden a plagas e infecciones con la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs). Los cuales participan de manera indirecta al atraer polinizadores o depredadores de herbívoros, asimismo desempeñan funciones directas como deterrentes de insectos y poseen propiedades antimicrobianas. En el presente proyecto nos centramos en la función que desempeñan los COVs en la resistencia de las plantas frente a patógenos. Los cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris*) que exhiben resistencia fenotípica a la antracnosis causada por el hongo, *Colletotrichum lindemuthianum*, emiten cuantitativa y cualitativamente más COVs que los cultivares susceptibles. Hemos examinado aprox. 50 COVs derivados de plantas para conocer su capacidad inhibitoria y encontramos que citral, eugenol, terpineol, nonanal y trans-2-decanal son capaces de inhibir el crecimiento micelial. La exposición a los volátiles citral y eugenol inhibió el crecimiento en los primeros minutos de acción. Microscopía confocal reveló una inhibición del crecimiento apical en las hifas de las cepas expuestas a citral y eugenol. Se encontró que la inhibición es irreversible, pues el hongo no restaura el crecimiento después de la exclusión de los compuestos de la atmósfera. Los COVs muestran un gran potencial para ser utilizados como fungicidas naturales en el manejo integral de plagas para una agricultura sustentable.

Abstract

Naturally plants respond to pests and infections with the emission of volatile organic compounds (VOCs). Which are involved indirect in attract pollinators or predators of herbivores, also they play roles direct way as insect deterrents and have antimicrobial properties. In this project, we focus on the role played by VOCs in the resistance of plants against pathogens. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*) which exhibit phenotypic resistance to anthracnose caused by the fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*, quantitatively and qualitatively emit more VOCs than susceptible cultivars. We examined ca. 50 VOCs from plants to know its inhibitory capacity and found that citral, eugenol, terpineol, nonanal and trans-2-decanal are capable of inhibiting the mycelial growth. Exposure to volatiles citral and eugenol inhibits growth in the first minutes of action. Confocal microscopy revealed apical growth inhibition in the hyphae of the strains exposed. Finding that inhibition is irreversible, because the fungus doesn't restore growth after the exclusion of the compounds from the atmosphere. VOCs show great potential for use as natural fungicides in integrated pest management for sustainable agriculture.

Palabras Clave

Actividad antifúngica; Defensa; Resistencia; Compuestos orgánicos volátiles; *Colletotrichum lindemuthianum*; Biofungicida

INTRODUCCIÓN

En condiciones naturales, las plantas están expuestas frecuentemente a una amplia gama de estrés biótico y abiótico. Para enfrentar a herbívoros y patógenos, las plantas han desarrollado varios mecanismos de defensa siendo uno de ellos la liberación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) [1]. Estos compuestos cumplen varias funciones fisiológicas y ecológicas, como atrayentes de polinizadores o dispersores de semillas, deterrentes de herbívoros [2], participan como señales internas en la planta atacada [3]. También se sabe que estos compuestos cuentan con actividad antimicrobiana. COVs de hojas de algodón mostraron actividad antifúngica frente *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, reduciendo la producción de aflatoxina y el crecimiento micelial [4]. Por otro lado, compuestos orgánicos volátiles como citral y trans-2-hexenal mostraron actividad fungicida contra *Monilinia laxa* [5], asimismo el β -cariofileno de las flores de *Arabidopsis* presento actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas syringae* pv. tomate [6]. En cultivos post-cosecha de mango el 2-nonanona y timol reprimieron el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* [7]. Los compuestos orgánicos volátiles están implicados tanto en defensa directa e indirecta, una pregunta importante es ¿cómo la calidad o cantidad de compuestos orgánicos volátiles emitidos en una planta pueden determinar su éxito para superar una enfermedad? Según lo observado en *Plasmora viticola*, esta induce la emisión de terpenos implicados en la respuesta de defensa solo en cultivares resistentes y no en susceptibles [8], mientras en papa la resistencia al gorgojo *Cylas formicarius* se atribuyó a volátiles solamente presentes en genotipos resistentes a la plaga [9]. Mostrando así, que diferentes genotipos pueden presentar cambios en la producción y emisión de COVs, pero ¿cómo afecta esta variación la resistencia? Para tratar de investigar la relación entre los COVs emitidos en plantas resistentes y susceptibles, se identificaron los volátiles emitidos por plantas de frijol inoculadas con el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, que es agente causal de la antracnosis, una de las enfermedades más importantes del frijol en regiones templadas que puede llegar a causar la pérdida completa de la producción [10].

En el presente estudio, cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se clasificaron según su respuesta a la infección. Los volátiles se colectaron de líneas resistentes y susceptibles en respuesta al hongo. Compuestos orgánicos volátiles fueron seleccionados de los perfiles de COVs y se evaluaron para investigar su actividad antifúngica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico: Semillas de cuatro líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), los cultivares Flor de Mayo Anita y Pinto Villa, el criollo Negro San Luis y el silvestre *Phaseolus* 4 procedentes del INIFAP (Celaya, Gto.). Fueron cultivados en condiciones de invernadero en macetas de plástico (2,5 l). Con el fin de conseguir diferentes antecedentes genéticos y por lo tanto diversidad en los metabolitos producidos, se seleccionaron estas distintas líneas, algunas importantes para la región Bajío. La cepa del hongo utilizado en este trabajo fue: *C. lindemuthianum* (Sacc. Y Magnus) obtenido de una colección en el Laboratorio de hongos y Desarrollo de la Expresión Génica en LANGEPIO (Irapuato, Gto.)

Ensayos de inoculación: Con una suspensión de conidios viables a una concentración de 1×10^6 esporas ml^{-1} del hongo *C. lindemuthianum* se asperjaron cinco plantas de cada variedad de frijol. Con el fin de cuantificar los niveles de infección, se recogieron las hojas de cada cultivar inoculado para medir ergosterol mediante HPLC pues se ha encontrado una correlación significativa entre la cantidad de ergosterol y la biomasa fúngica [11].

Colecta de COVs: Los volátiles fueron recolectados 24 horas después de la inoculación con el fitopatógeno mediante la técnica de microextracción (SPME) [12]. Las fibras fueron expuestas durante 24 horas y luego desorbidas durante 5 minutos directamente en el cromatógrafo de gas (GC) a 180°C . Los compuestos fueron identificados con ayuda de la biblioteca espectral de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) verificados por patrones (Sigma-Aldrich).

Actividad inhibitoria: COVs fueron seleccionados en base a los perfiles obtenidos en las líneas

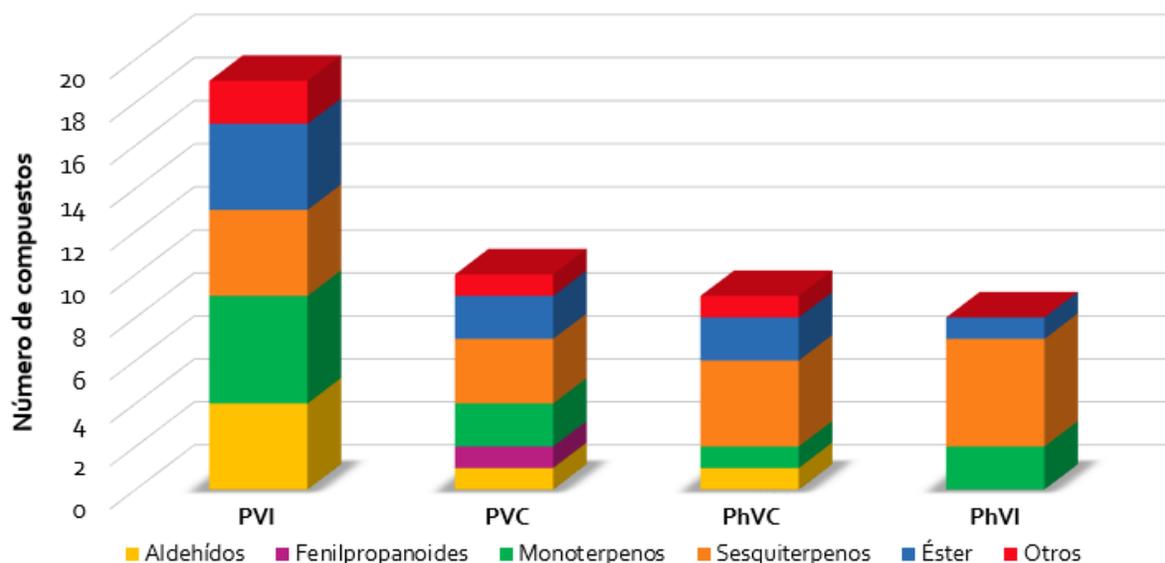
resistentes y susceptibles, compuestos puros (Sigma-Aldrich) se disolvieron en etanol 99%. Con el fin de tratar de llegar a las concentraciones naturales de 10 ng/ml para cada volátil. Un disco micelial (5 mm de diámetro) fue tomado de un cultivo activo de *C. lindemuthianum* y se colocó en un cuadro de PDA (2x2cm) suspendido en un portaobjetos dentro de una placa de Petri. El COV se agregó a un papel filtro colocado frente al disco micelial. Dos días más tarde se registró el diámetro de crecimiento del micelio. Como control se utilizaron las mismas condiciones utilizando solamente etanol.

Análisis del efecto antifúngico: COVs más activos fueron seleccionados para probar si su efecto era fungistático (reversible) o fungicida (irreversible). Citral, eugenol, nonanal y terpineol fueron seleccionados para probar su tipo de efecto utilizando la técnica descrita con anterioridad, pero en este ensayo después de los 2 días, los portaobjetos se retiran de las placas Petri y se colocan en nuevas placas con atmosfera limpia (sin volátil) durante 4 días, al transcurrir estos, se registra el crecimiento micelial. En estos ensayos también se analizó mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM) en un equipo LSM 510 META (Carl Zeiss, Alemania) el tipo de efecto para cada volátil en tiempo real.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterizados los niveles de resistencia al fitopatógeno en cuatro líneas de frijol común. Encontramos que el cultivar susceptible es P. vulgaris 4 pues presentó una mayor presencia de ergosterol. Por el contrario, Pinto Villa resultó ser una línea resistente lo cual concuerda con lo reportado por Quintana y colaboradores en 2015 [11]. Se encontró que el resistente Pinto Villa libera cuantitativamente y cualitativamente más COVs en respuesta a la inoculación con el hongo en comparación con la línea susceptible (Fig. 1). Similar a lo encontrado en genotipos de maíz con mayor emisión de COVs que resultaron más resistentes a *Aspergillus flavus* [13]. Las principales familias de compuestos orgánicos

volátiles en la línea resistente pertenecen a la familia sesquiterpenos y monoterpenos, mientras que las plantas susceptibles presentan menor abundancia de familias en su perfil (Fig. 1). Del mismo modo, en *Vitis vinifera* después de la inoculación con *Plasmopara viticola* la emisión de sesquiterpenos se incrementó en los genotipos resistentes [8]. En general, la emisión de terpenos es parte de los mecanismos de defensa en las plantas, en forma directa o indirecta. Así, en *Citrus jambhiri* Lush, monoterpenos liberados en respuesta a daño mecánico presentan actividad antimicrobiana [14]. COVs fueron seleccionados a partir de los perfiles obtenidos de las líneas resistentes y susceptibles para analizar su actividad inhibitoria. Limoneno, linalool y nerolidol tuvieron un efecto moderado en el crecimiento del hongo *C. lindemuthianum*. Compuestos como citral, eugenol, nonanal, terpineol y trans-2-decanal inhibieron fuertemente el crecimiento del patógeno estudiado. Ciertos volátiles compartidos entre las líneas resistentes y susceptibles como farnesol, acetato de cis-hexenilo y cariofileno no mostraron ningún efecto sobre el crecimiento (Fig. 2). Los COVs con mayor actividad antifúngica fueron seleccionados para investigar el tipo de efecto antifúngico. Citral y eugenol presentaron efecto fungicida ya que inhibieron el crecimiento después de la exposición. Sin embargo, nonanal y terpineol sólo actúan limitando el crecimiento mientras están presentes, es decir, como fungistáticos (Fig. 3b). En informes anteriores mostraron que el eugenol induce la generación de especies reactivas de oxígeno y un aumento del flujo de calcio en *B. cinerea*; (lo que indica que la actividad antifúngica atribuido a este compuesto podría ser por la alteración de la permeabilidad de la membrana [15]. Alteraciones en la morfología de las hifas fueron exhibidas cuando se expuso *Geotrichum citri aurantii* a citral [16]. Debido a su naturaleza lipofílica, se ha sugerido que este podría entrar en las membranas y alterar la fluidez o permeabilidad [17], que concuerda con lo observado por microscopía confocal en este trabajo, una notable desestabilización o ruptura de hifas (Fig. 3a).



Diversidad de COVs durante la inoculación con *C. lindemuthianum*. La grafica muestra el número y las principales clases de compuestos detectados en las plantas inoculadas de dos líneas distintas (resistente y susceptible). Pinto Villa inoculado (PVI), Pinto Villa no inoculado-control (PVC), Phaseolus 4 inoculado (PhVI) y Phaseolus 4 no inoculado-control (PhVC).

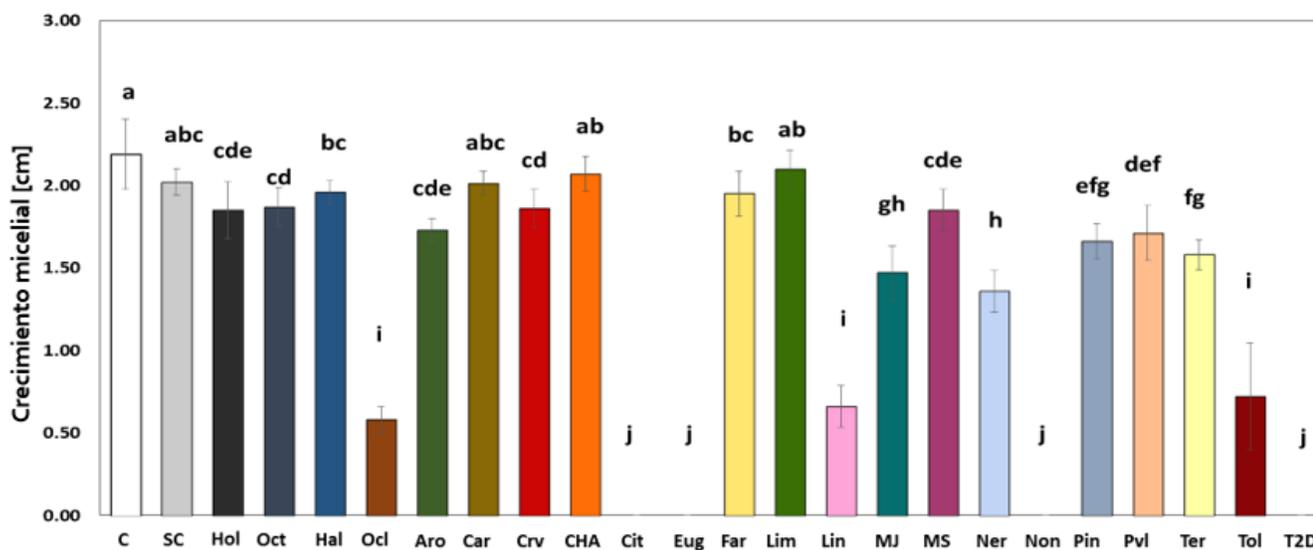


Figura 2. Efecto en el crecimiento micelial de los compuestos orgánicos volátiles en *C. lindemuthianum*. Los diámetros de los micelios se midieron 48h después de la exposición a los diferentes COVs [10 ng ml⁻¹]. Las barras representan el promedio del crecimiento micelial en centímetros y se muestra la desviación estándar, diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05, Tukey post-hoc test), n=10. Control: sin volátil, CS: control con disolvente etanol, Hol: 2-hexen-1-ol, Oct: 2,6-dimetil-2,4,6-octatrieno, Hal: 2-hexen-2-al, Ocl: 3-octen-1-ol, Aro: Aromandreno, Car: cariofileno, Crv: carvona, CHA: acetato cis-3-hexen-1-ilo, Cit: citral, Eug: eugenol, Far: farneseno, Lim: limoneno, Lin: linalool, MJ: metil jasmonato, MS: metil salicilato, Ner: nerolidol, Non: Nonanal, Pin: pineno, Pvl: Pinocarvona, Ter: terpineno, Tol: Terpineol, T2D: Trans-2-decanal.

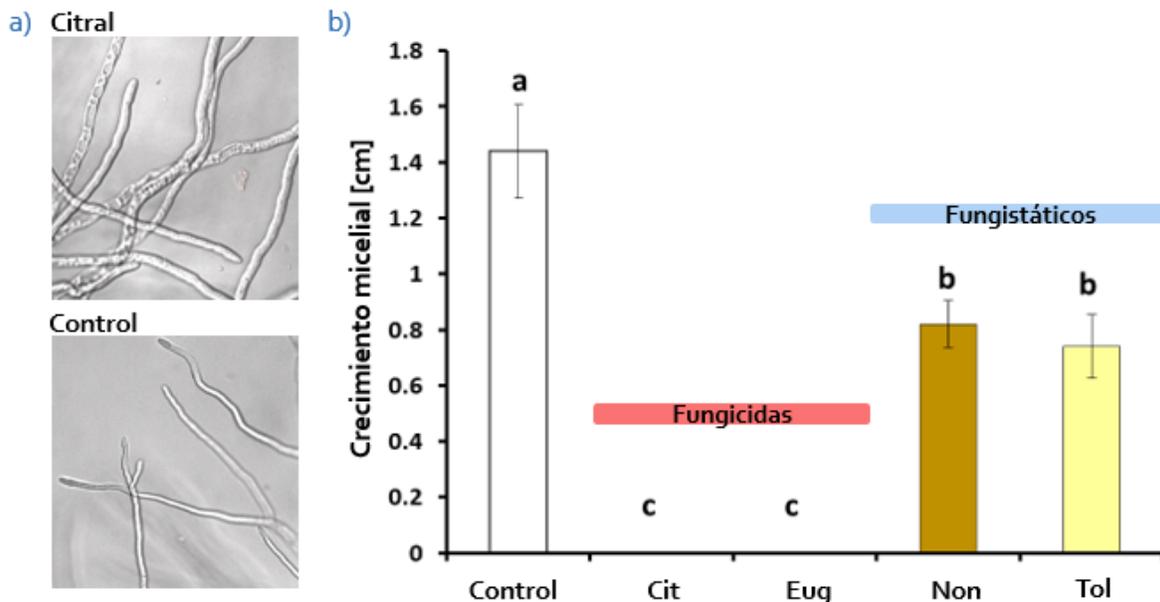


Figura 3. Análisis del efecto antifúngico en el crecimiento micelial. a) Fotografías tomadas mediante microscopía confocal, observando la aparición de vacuolas en las hifas tratadas con citral. b) Micelio activo de *C. lindemuthianum* se expuso durante 2 días a los COVs con mayor efecto. Después de la exposición, COVs se retiraron para observar el restablecimiento del crecimiento y distinguir entre fungicidas y fungistáticos. Cit: citral, Eug: eugenol, Non: nonanal y Tol: terpineol. Las barras representan el crecimiento del micelio, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$, Tukey test post hoc), $n=10$.

CONCLUSIONES

La línea resistente presentó mayor abundancia y variedad de compuestos en comparación con la línea susceptible. Los compuestos orgánicos volátiles exclusivos de líneas resistentes mostraron alta actividad antifúngica. Sin embargo, los COVs compartidos en líneas susceptibles y resistentes no mostraron actividad. Por lo tanto, estos compuestos pueden mediar la resistencia contra *C. lindemuthianum* actuando como compuestos antimicrobianos. Citral y eugenol mostraron la mayor actividad antifúngica la cual resultó ser fungicida. Estos compuestos resultaron ser potenciales candidatos con aplicaciones biotecnológicas y su uso en el control biológico de hongos patógenos. Estudios futuros podrían ser necesarios para investigar si los compuestos se mantienen estables en condiciones de campo para su aplicación como fungicidas naturales en el manejo integral de plagas para una agricultura sustentable.

REFERENCIAS

- [1] M. Heil and R. Karban, "Explaining evolution of plant communication by airborne signals," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 25, no. 3, pp. 137–144, 2010.
- [2] M. Rosenkranz and J.-P. Schnitzler, "Plant Volatiles," eLS. John Wiley Sons, pp. 1–9, 2016.
- [3] M. Heil and J. Silva Bueno, "Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature," *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.*, vol. 104, pp. 5467–72, 2007.
- [4] D. M. Greene-McDowelle, B. Ingber, M. S. Wright, H. J. Zeringue Jr, D. Bhatnagar, and T. Cleveland, "The effects of selected cotton-leaf volatiles on growth, development and aflatoxin production *Aspergillus parasiticus*," *Toxicon*, vol. 37, pp. 883–893, 1999.
- [5] F. Neri, M. Mari, S. Brigati, and P. Bertonili, "Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit," *Plant Dis.*, vol. 91, pp. 30–35, 2007.
- [6] M. Huang, A. Sanchez-Moreiras, C. Abel, R. Sohrabi, S. Lee, J. Gershenzon, and D. Tholl, "The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen," *New Phytol.*, vol. 193, pp. 997–1008, 2012.

- [7] M. Zheng, J. Shi, J. Shi, Q. Wang, and Y. Li, "Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos," *Biol. Control*, vol. 65, no. 2, pp. 200–206, 2013.
- [8] A. Algarra Alarcon, V. Lazazzara, L. Cappellin, P. L. Bianchedi, R. Schuhmacher, G. Wohlfahrt, I. Pertot, F. Biasioli, and M. Perazzolli, "Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation in vitro," *J. Mass Spectrom.*, vol. 50, pp. 1013–1022, 2015.
- [9] R. R. Korada, S. Misra, S. Naskar, N. Bhaktavatsalam, A. Prasad, K. Sinha, C. Jayaprakas, and A. Mukherjee, "Plant volatile organic compounds as chemical markers to identify resistance in sweet potato against weevil *Cylas formicarius*," *Curr. Sci.*, vol. 9, pp. 1247–1253, 2013.
- [10] G. Castellanos and C. Jara, "Enfermedad: Antracnosis," 1990.
- [11] E. Quintana-Rodríguez, A. T. Morales-Vargas, J. Molina-Torres, R. M. Ádame-Alvarez, J. a. Acosta-Gallegos, and M. Heil, "Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*," *J. Ecol.*, vol. 103, no. 1, pp. 250–260, 2015.
- [12] D. Tholl, W. Boland, A. Hansel, F. Loreto, U. S. R. Röse, and J. P. Schnitzler, "Practical approaches to plant volatile analysis," *Plant J.*, vol. 45, no. 4, pp. 540–560, 2006.
- [13] H. J. Zeringue, R. L. Brown, J. N. Neucere, and T. E. Cleveland, "Relationships between C6-C12 alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 44, pp. 403–407, 1996.
- [14] Y. Yamasaki, H. Kunoh, H. Yamamoto, and K. Akimitsu, "Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense," *J. Gen. Plant Pathol.*, vol. 73, pp. 168–179, 2007.
- [15] C. Wang, J. Zhang, H. Chen, Y. Fan, and Z. Shi, "Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*," *Trop. Plant Pathol.*, vol. 35, pp. 137–143, 2010.
- [16] H. Zhou, N. Tao, and L. Jia, "Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*," *Food Control*, vol. 37, pp. 277–283, 2014.
- [17] P. C. Braga, M. D. Sasso, M. Culici, and M. Alfieri, "Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*," *Fitoterapia*, vol. 78, pp. 396–400, 2007.