

Análisis *in vitro* de las interacciones entre hongos endófitos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*).

Elizarraraz Martínez Iris Jahel¹, Navarro Meléndez Ariana Lizbeth², Morales Vargas Adán Topiltzin³.

¹ Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato | Dirección de correo electrónico: is11110529@es.itesi.edu.mx

² Laboratorio de Ecología de plantas, Dpto. Ingeniería Genética, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN unidad Irapuato | Dirección de correo electrónico: anavarro@ira.cinvestav.mx

³ Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana, Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato | Dirección de correo electrónico: admorales@itesi.edu.mx

Resumen

Diferentes especies de microorganismos endófitos pueden cohabitar en un mismo tejido sin causar síntomas de enfermedad. Sin embargo, aún se desconoce como interactúan estos microorganismos y como estas interacciones podrían determinar los patrones de colonización, así como el rol que desempeña la comunidad de endófitos en de las propiedades conferidas a las plantas. En este trabajo se analizaron *in vitro* las interacciones entre los hongos endofíticos (HE) asociados con mayor frecuencia en las hojas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Se realizaron confrontaciones *in vitro* entre los morfotipos seleccionados en dos diferentes medios de cultivo, PDA y medio frijol lima. Se encontró que los hongos interactúan diferencialmente dependiendo del medio de cultivo, donde, la mayoría presentaron una interacción moderada de acuerdo al índice de Badalyan. Además, se determinó la capacidad de esporulación para cada hongo en diferentes medios de cultivo (PDA, FL, Agar maíz, V8 y agar extracto de malta (AEM)). PDA y V8 fueron los mejores medios de cultivo para inducir la esporulación de la mayoría de los hongos, y el medio AEM el menos adecuado. Estos resultados nos ayudarán a obtener inóculo para realizar confrontaciones *in vivo* mediante la inoculación de plantas de invernadero con los HE.

Abstract

Different species of endophytes can inhabit the same plant tissue without causing any symptom of disease. However, even is unknown how are interacting these microorganisms and how the interactions could determinate the colonization patterns, as well as the role of endophytes community on the properties conferred to the plants. In this work were analyzed *in vitro* the interactions between the fungal endophytes (EF) associated more frequently on lima bean leaves (*Phaseolus lunatus*). Were performed *in vitro* confrontations between selected fungi morphotypes in two different culture medium PDA and lima bean media. We found that the resulting interaction were dependent of the culture medium, where most of the fungi showed moderate interaction according to Badalyan index. Furthermore, the colonization capacity were determinate to each fungal using different culture medium (PDA, FL, maize agar, V8 and malt extract agar), PDA was the best culture medium to induce sporulation of most fungi and the AME were less suitable. This results will be used to produce inoculum to performed *in vivo* confrontations through EF inoculation of greenhouse plants.

Palabras Clave

interacciones entre endófitos; confrontación dual; índice de Badalyan; esporulación

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos que no se encuentran aislados de su entorno, de tal manera, que interactúan con otros organismos de los cuales pueden beneficiarse o verse perjudicadas; entre los cuales están los microorganismos endófitos [1, 2].

El término endófito se refiere a todo microorganismo que reside dentro de los tejidos internos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad o sin manifestar efectos negativos inmediatamente [1, 3]. Se ha observado que los microorganismos endófitos afectan la fisiología y ecología de sus plantas hospederas en múltiples formas, confiriendo a éstas resistencia a patógenos, herbivoría, sequía, inundaciones, temperaturas extremas y aumentando la producción de biomasa [4].

Las interacciones entre los hongos tienen la capacidad de determinar los patrones de crecimiento y velocidad a la que pueden desarrollarse, afectando también la composición química y la producción de sus metabolitos secundarios. Estas interacciones normalmente son determinantes en el rol ecológico de los hongos y de la comunidad fúngica independientemente de la especie y sustrato en el que se encuentren. Normalmente las interacciones estudiadas son de tipo antagonista o competitiva, debido a que este tipo de interacciones tienden a llevar a estrés a los hongos, provocando la liberación de metabolitos secundarios que pueden ser utilizados para el control de patógenos [5, 6].

El frijol lima (*Phaseolus lunatus*) es una planta modelo en ecología, que es endémica de tierras bajas tropicales de México y Sudamérica, ha sido utilizada en estudios de defensa contra estrés biótico y abiótico [7-10], además se ha logrado aislar hongos endófitos (HE) de las hojas de esta planta, los cuales podrían conferirle algunos de sus atributos de resistencia [11, 12].

En el presente trabajo se analizaron las interacciones *in vitro* entre los HE que se encuentran asociados con mayor frecuencia en las hojas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Se realizaron confrontaciones en cajas Petri utilizando dos diferentes medios de cultivo (PDA y FL), donde el resultado de la interacción fue dependiente del medio de cultivo y de la identidad

de los hongos confrontados. Además, la mayoría de las interacciones fueron moderadas de acuerdo al índice de Badalyan. Finalmente, se evaluó la capacidad de esporulación de los endófitos en diferentes medios de cultivo para posteriormente establecer protocolos de inoculación *in vivo* con plantas de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los endófitos utilizados (cepas U027, U065 (*Cochliobolus lunatus*), U066, U067 (*Cochliobolus geniculatus*), U081, U089, U090 (*Fusarium sp.*), UP2D1B2F (*Cochliobolus verruculosus*) y UP2D1C2E) fueron aislados de hojas sanas de plantas de frijol lima, crecidas en su ambiente natural (costa del Pacífico, México, 15°15'31.80" N y 97°09'4.68" E) colecta Julio del 2012. Los hongos fueron inoculados en cajas Petri con medio agar dextrosa papa (PDA) (Difco) con un círculo de 0.5 cm de diámetro de un cultivo puro [13]. Se midió el radio diariamente para determinar la velocidad de crecimiento de cada uno de las cepas para la planeación de las confrontaciones.

Confrontaciones *in vitro*.

En cajas petri (9 cm) con medio PDA o medio frijol lima (FL) se colocó un círculo de 0.5 cm de diámetro de los cultivos puros de las cepas a confrontar, manteniendo una distancia entre los dos hongos de 4 cm entre ellos. Cada combinación de hongos fue repetida 5 veces con sus respectivos controles negativos para los dos medios de cultivo e inoculados con el hongo y un círculo de PDA a la misma distancia que en la confrontación. Todas las cajas Petri fueron incubadas a 28°C en la oscuridad. El crecimiento radial fue registrado diariamente midiendo el diámetro de cada colonia.

Las asociaciones se clasificaron de acuerdo al índice de Badalyan [14]. El índice de interacción entre los HE se calculó para cada especie de acuerdo a 3 tipos (A, B y C) y cuatro subtipos (CA1, CA2, CB1 y CB2), donde A equivale a la formación de un cordón micelial entre los dos organismos; B, el cordón micelial se forma a una cierta distancia, sin contacto entre los microorganismos; C, no existe cordón micelial y un microorganismo reemplaza toda la superficie de la placa; CA1, existe un cordón micelial y se produce

un reemplazo parcial de la superficie de la placa; CA2 existe también un cordón micelial y la placa es reemplazada totalmente por uno de los microorganismos; CB1, inicialmente no hay contacto entre los microorganismos y se produce una reemplazo parcial de la placa y CB2, el reemplazo de la placa es total. Se asignaron valores para A=1; B=2, C=3; CA1=3.5; CA2=4.5; CB1=4 y CB2=5, utilizando la fórmula:

Ecuación 1 Índice de interacción

$$I.I. = \sum N \times I$$

N es la frecuencia de cada tipo y subtipo de interacción; I el valor de la interacción. Clasificándose de acuerdo a la sumatoria en interacciones débiles, moderadas o activas [3, 13-15].

Capacidad de esporulación.

Los hongos seleccionados fueron transferidos al centro de cada caja Petri en discos de 0.7 cm, en diferentes medios de cultivo (PDA, FL, AEM, V8 y agar maíz) y fueron incubados a 28°C en la oscuridad [16].

La capacidad de esporulación se evaluó después de 15 días vertiendo 5 ml de solución de Tween al 0.1% en cada una de las cajas y raspando el micelio con la espátula de triángulo, se recuperó la suspensión de esporas en un tubo Falcon de 15 ml. Se vertieron 10 µl de la suspensión de esporas en un portaobjetos, dejándolo secar para después teñir las esporas con azul de lactofenol. La presencia de esporas se observó en un microscopio Leica DM750 con el objetivo de en cada una de las muestras.

Se cuantificó la cantidad de esporas producida por caja para los hongos que esporularon. Se realizó por triplicado el conteo de las esporas en una cámara de Neubauer (hematocitómetro) y obtuvo el promedio [12]. Se realizó un ANOVA con una prueba de Fisher LSD con un n=3 y una confianza de 95% para cada uno de los HE para comparar la producción de esporas en cada uno de los medios probados (Tabla 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que la velocidad de crecimiento de las 9 cepas en medio PDA fue diferente y se agrupaban en 4 grupos (Figura 1), por lo cual las confrontaciones se hicieron desfasadas, es decir, algunos hongos en la misma confrontación se inocularon simultáneamente y otros hasta cuatro días después uno del otro.

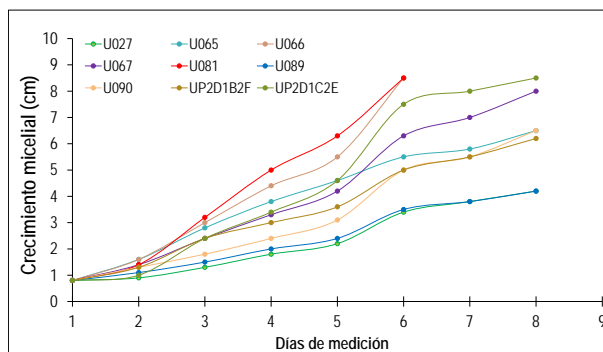


Figura 1 Cinética de crecimiento de los HE utilizados.

En las 36 confrontaciones realizadas (al confrontar las 9 cepas entre ellas), la mayoría de los HE presentaron morfologías y comportamientos diferentes dependiendo del medio de cultivo y de la identidad del hongo con el que interactuaban (Figura 2). Estos cambios pueden deberse a los nutrientes presentes en el medio en el que crecen y a la disponibilidad de espacio [17]. Por ejemplo, los hongos U065 (Figura 2 a y b), U081 (Figura 2 c y d) y U067 (Figura 2 e y f) cambian su morfotipo cuando se confrontan con diferentes hongos. El comportamiento de los HE en el medio de FL, puede ser más parecido al que naturalmente presentan estos microorganismos en su planta hospedera, debido a que simula las condiciones químicas de la cual fueron aislados.

Además, se observó que la producción de metabolitos secundarios por algunos de los hongos dependía de la confrontación, por ejemplo el hongo U067 en presencia del U090 se observa la liberación de metabolitos al medio color café (Figura 2 e), sin embargo en el medio de FL esto no se observa (Figura 2 f). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Yuen et al.[6] y Fryar et al.[5], donde observaron que la mayoría de los hongos producían metabolitos secundarios

al estar en confrontación con otros HE. La producción de metabolitos secundarios se ha relacionado con la capacidad que tiene los hongos endófitos de inhibir la infección de patógenos en las plantas [18].

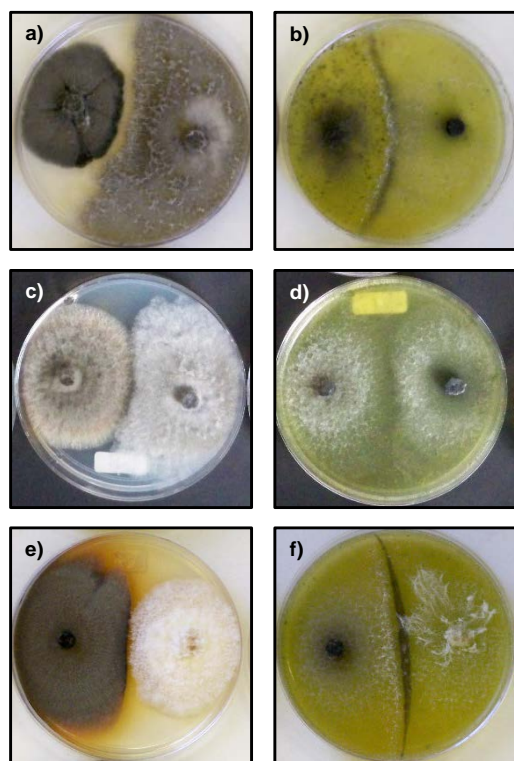


Figura 2 Comportamiento de los HE en PDA (a, c y e) y FL (b, d y f). En las imágenes se observan las interacciones entre los hongos a y b, U065 (izq) y U081 (der.); c y d, U067 (izq) y U081 (der.); e y f, U067 (izq) y U090 (der.).

En las interacciones de acuerdo al índice de Badalyan, 8 de los 9 HE se comportan de igual manera en medio PDA y medio FL (Tabla 1), en las interacciones había contacto entre los dos hongos, sin embargo se mantenía aún una delimitación entre ellos. En base al índice de interacción (Ii) se dividieron en tres grupos: activa ($I_i > 15$), moderada ($I_i = 15-10$) y débil ($I_i < 10$) [14]. En medio PDA el hongo U027 y 089 presentaron un índice de Badalyan moderado (Figura 3a y c), mientras que en medio FL el hongo U089 presentaban una interacción débil (Figura 3b) debido que el cordón miceliar se formaba a cierta distancia o no había contacto entre los dos hongos.

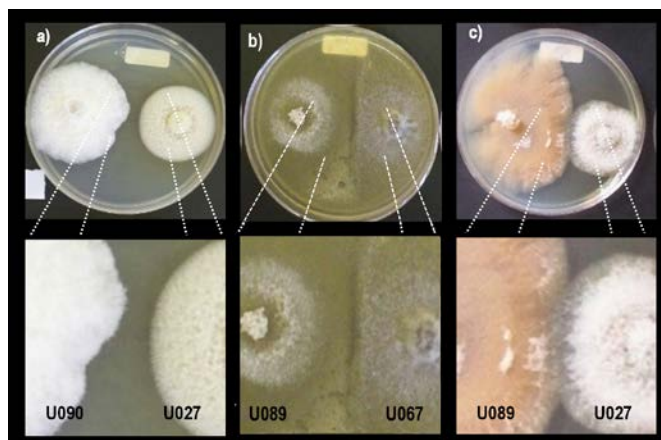


Figura 3 Interacciones de los HE U090, U027 y U089 en PDA (a y c) y en FL U089 y U067 FL (b). En las imágenes se observa la zona de interacción entre los HE.

Tabla 1: Tipo de interacción para los HE de acuerdo al índice de Badalyan.

HE	PDA		FL	
	Ii ^a	Ti ^b	Ii ^a	Ti ^b
U027	12.5	Moderada	13.5	Moderada
U065	21.5	Activa	31	Activa
U066	20	Activa	17	Activa
U067	24	Activa	22	Activa
U081	23	Activa	24	Activa
U089	11	Moderada	9	Débil
U090	17	Activa	17	Activa
UP2D1B2F	25	Activa	31	Activa
UP2D1C2E	23	Activa	26.5	Activa

Ii^a: índice de interacción; Ti^b: tipo de interacción.

Se determinó la capacidad de esporulación para cada uno de los HE seleccionados en diferentes medios de cultivo que han sido utilizados para inducir la producción de esporas (PDA, FL, AEM, agar maíz y V8). Todos los hongos utilizados esporularon en PDA, FL, agar maíz y V8, mientras que U089, U090 y UP2D1C2E, solo esporularon en medio AEM. Se encontraron algunas diferencias en la cantidad de esporas producidas que dependían del medio (Tabla 2), además, la capacidad de esporulación de los HE fue mayor en los medios de PDA y V8. También se observó que los hongos U027 y U081 no produjeron esporas en ninguno de los 5 medios probados.

Tabla 2 Capacidad de esporulación de cada hongo en diferentes medios de cultivo.

HE	PDA	FL	AEM	MAIZ	V8
U065	2.19x10 ⁵ a	1.19x10 ⁵ b	0.00 d	6.42x10 ⁴ c	1.81x10 ⁵ a
U066	1.18x10 ⁵ b	1.53x10 ⁵ a	0.00 d	8.25x10 ⁴ c	1.18x10 ⁵ b
U067	1.10x10 ⁵ b	7.00x10 ⁵ c	0.00 d	2.45x10 ⁵ d	2.65x10 ⁵ a
U089	8.08x10 ⁷ a	1.46x10 ⁶ b	4.58x10 ⁵ b	1.08x10 ⁵ b	1.53x10 ⁵ b
U090	6.01x10 ⁶ b	5.90x10 ⁶ b	1.41x10 ⁶ c	1.33x10 ⁷ a	1.44x10 ⁶ c
UP2D1B2F	6.22x10 ⁵ b	4.27x10 ⁵ bc	0.00 c	1.12x10 ⁵ c	5.13x10 ⁵ a
UP2D1C2E	6.99x10 ⁷ a	5.68x10 ⁷ b	1.12x10 ⁷ c	7.86x10 ⁶ c	6.99x10 ⁷ a

Los valores representan la media \pm ES (n=3) de la cantidad de esporas. Diferentes letras representan diferencias significativas en la esporulación entre los medio de cultivo, ANOVA, Fisher LSD, $p < 0.05$.

CONCLUSIONES

Es importante la selección del medio de cultivo para evaluar las interacciones, debido a que la composición química afecta el crecimiento y el comportamiento de los hongos endofíticos.

La mayoría de las confrontaciones *in vitro* mostraron interacciones moderadas de acuerdo al índice de Badalyan.

En el medio PDA y V8 la mayoría de los hongos tuvieron una mayor esporulación con respecto a los otros 3 medios probados.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Martin Heil por permitirme llevar a cabo el trabajo en el laboratorio a su cargo, al CINVESTAV unidad Irapuato, a la M.C. Ariana Navarro por sus conocimientos y tiempo, y al Conacyt por el apoyo económico otorgado (Exp. Ayte. 11635).

REFERENCIAS

- Partida-Martínez, L.P. & M. Heil (2011), The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in plant science*. 2.
- Porras-Alfaro, A. & P. Bayman (2011), Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Phytopathology*. 49(1): p. 291.
- Estrada, A.E.R., A. Hegeman, H.C. Kistler, & G. May (2011), In vitro interactions between *Fusarium verticillioides* and

Ustilago maydis through real-time PCR and metabolic profiling. *Fungal Genetics and Biology*. 48(9): p. 874-885.

- Arnold, A.E., L.C. Mejía, D. Kylo, E.I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins, & E.A. Herre (2003), Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(26): p. 15649-15654.
- Fryar, S.C., W. Booth, J. Davies, I. Hodgkiss, & K. Hyde (2005), Evidence of in situ competition between fungi in freshwater. *Fungal Diversity*. 18: p. 59-71.
- Yuen, T., K. Hyde, & I. Hodgkiss (1999), Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microbial ecology*. 37(4): p. 257-262.
- Ballhorn, D.J., A.L. Godschalx, & S. Kautz (2013), Co-variation of chemical and mechanical defenses in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Journal of chemical ecology*. 39(3): p. 413-417.
- Ballhorn, D.J., S. Kautz, M. Heil, & A.D. Hegeman (2009), Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. *PLoS One*. 4(5): p. e5450.
- Heil, M. (2004), Induction of two indirect defences benefits lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology*. 92: p. 10.
- Radhika, V., C. Kost, A. Mithöfer, & W. Boland (2010), Regulation of extrafloral nectar secretion by jasmonates in lima bean is light dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(40): p. 17228-17233.
- Kost, C. & M. Heil (2006), Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*. 94(3): p. 619-628.
- Navarro-Meléndez, A.L. & M. Heil (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): p. 816-825.
- Campanile, G., A. Ruscelli, & N. Luisi (2007), Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. *European Journal of Plant Pathology*. 117(3): p. 237-246.
- Badalyan, S.M., G. Innocenti, & N.G. Garibyan (2004), Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathologia Mediterranea*. 43(1): p. 44-48.
- Lahlali, R. & M. Hijri (2010), Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS microbiology letters*. 311(2): p. 152-159.
- Su, Y.-Y., Y.-L. Qi, & L. Cai (2012), Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. *Mycology*. 3(3): p. 195-200.
- Pal, K.K. & B.M. Gardener (2006), Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*. 2: p. 1117-1142.
- Gao, F.-k., C.-c. Dai, & X.-z. Liu (2010), Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr J Microbiol Res*. 4(13): p. 1346-1351.