

¿CÓMO DETECTAR A UN INVASOR?: “EL USO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN LA DETECCIÓN TEMPRANA DE ANTRACNOSIS EN FRIJOL”

Rojas Raya Mariana Atzhiry (1), Omar Fabián Hernández Zepeda (2), Elizabeth Quintana Rodríguez (2) y Martin Heil (2)

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

2 [Ingeniería Genética, Laboratorio de Ecología de Plantas, Irapuato, CINVESTAV] | [ohernandez@ira.cinvestav.mx]; [equintana@ira.cinvestav.mx] y [mheil@ira.cinvestav.mx]

Resumen

El frijol común es la leguminosa de mayor consumo en México. Su rendimiento se ve disminuido por la “antracnosis”, causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, ocasionando pérdidas de hasta 100%. Sin embargo, cuando una planta es infectada, emite compuestos orgánicos volátiles (COVs), compuestos utilizados por las plantas como mecanismo de defensa contra patógenos. En este estudio, se comparó con otros marcadores, la eficiencia de los COVs (marcadores bioquímicos) emitidos por las plantas como respuesta a la infección en diferentes tiempos post infección. Los COVs se analizaron mediante GC-MS y se compararon con el ergosterol (marcador bioquímico), mediante su cuantificación por HPLC y con la amplificación de las regiones ITS (marcador molecular), mediante PCR. Los COVs permitieron la detección de la enfermedad a minutos post infección, mediante la emisión de volátiles como: “ácido oxálico etil neopentil éster”, detectado a los 15 min y los volátiles: “Isopropil meristato” y “ácido metoxiacético, 2-tetradecil éster”, detectados a las 24 h post infección. El ergosterol y las regiones ITS, detectaron la enfermedad hasta las 24h. Nosotros concluimos que los COVs emitidos pueden ser empleados en la detección más rápida de la enfermedad y éstos pueden aplicarse al campo.

Abstract

Common bean is the most consumed legume in Mexico. Its yield is diminished by the “antracnosis”, a disease caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, causing losses of 100%. When a plant is infected, it emits volatile organic compounds (VOCs), which are used by plants as defense mechanism against pathogens. In this study, we compared with other markers, the efficiency of VOCs (biochemical markers) emitted by plants in response to infection by the fungus in different post-infection times. The VOCs were analyzed by GC-MS and compared with ergosterol (biochemical marker), through quantification by HPLC and by amplification of ITS (molecular marker) regions, by PCR. VOCs allowed detection of the disease, minutes post infection through the emission of volatile as “oxalic acid, ethyl neopentyl ester”, found at 15 minutes post infection, and the volatiles “Isopropil meristate” and “methoxyacetic acid, 2-tetradecyl ester”, detected at 24 h post infection, as were ergosterol and ITS regions. Finally, we concluded that the VOCs emitted by plants can be used efficiently in faster detection of the disease and this can be used in field.

Palabras Clave

Frijol común; Antracnosis; *Colletotrichum lindemuthianum*; Compuestos orgánicos volátiles; ITS; ergosterol

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la leguminosa de mayor consumo en México [1]. Guanajuato se ubica entre los primeros productores de frijol a nivel nacional con 120, 000 ha anuales [2]. Sin embargo, el rendimiento de este cultivo se ve disminuido por diversos factores entre los que destacan las plagas y enfermedades, una de las enfermedades más comunes es la “antracnosis”. La antracnosis puede ocasionar la pérdida de este cultivo de hasta el 30% y en condiciones muy húmedas las pérdidas pueden llegar 100% [3]. La antracnosis puede afectar a toda la planta incluyendo a las semillas, apareciendo los síntomas, inicialmente en las nervaduras del envés de las hojas, en forma de manchas angulares color café, causando finalmente, la necrosis y muerte del tejido [5]. Esta enfermedad es causada por el hongo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum* (el cual tiene dos ciclos de infección, un ciclo biotrófico y un ciclo necrotrófico) [4]. Después de la penetración en la célula huésped, el *Colletotrichum lindemuthianum* establece una interacción biotrófica, iniciando con la adición de un conidio a la superficie de la hoja, posteriormente, se forman apresorios melanizados y como etapa final de este ciclo, la formación de vesículas y brote de la hifa primaria. El ciclo necrotrófico comienza con el brote de la hifa secundaria, ocasionando la desintegración necrótica de las células del huésped y finalmente se lleva a cabo la formación del acervo y de las conidias [5]. Se conoce que, cuando una planta es infectada, emite compuestos orgánicos volátiles (COVs) [6], estos compuestos generalmente son utilizados por las plantas como un mecanismo de defensa contra patógenos [7] y herbívoros [8] y también como un mecanismo de comunicación entre plantas [9]. Por esta razón se ha determinado que una planta no puede dejar de emitir estos compuestos orgánicos volátiles [12].

Actualmente no existen mecanismos de detección de antracnosis en etapa temprana que se pueden desarrollar directamente en el campo [7].

En este estudio proponemos a los compuestos orgánicos volátiles como marcadores bioquímicos de detección más temprana de la antracnosis en contraste con otros marcadores bioquímicos y moleculares descritos anteriormente en el laboratorio. Se evaluó la eficiencia de los COVs en

comparación con el ergosterol como marcador bioquímico (componente exclusivo de las membranas de los hongos, el cual es empleado como indicador de biomasa fúngica) [12] y con la amplificación de las regiones ITS (Interspace Transcribed Regions), (regiones conservadas del DNA) del *Colletotrichum lindemuthianum* como marcador molecular [13].

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó el hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, cepa 1088, la cual se aisló en el estado de Durango en México de cultivos de frijol [10]. El hongo fue activado en medio sólido PDA (BD Difco Potato Dextrose Agar). Posteriormente, fue incubado a 28 °C en un período de 15-20 días con obscuridad.

Como modelo de estudio principal, se utilizó *Phaseolus vulgaris*, variedad Negro San Luis [14]. El experimento se llevó a cabo en condiciones de invernadero, bajo temperaturas que oscilan entre los 18-32°C, teniendo un riego semanal y luz durante la mañana. Para los experimentos de cuantificación de ergosterol y la amplificación de las regiones ITS, se eligieron 3 plantas control y 3 plantas para la infección en cada uno de los tiempos, siendo los tiempos establecidos en horas, a las 24, 48, 72, 96h y 7 días post infección (dpi). En el caso de las pruebas con volátiles, se establecieron de igual manera, 3 plantas control y 3 plantas para infección, realizando el perfil de COVs en los tiempos de 0,15, 30 y 760 minutos y 24, 48, 72 y 96 h post infección (dpi). Cuando las plantas alcanzaron 1 mes de crecimiento, se llevó a cabo la infección después de la aparición de la tercera hoja trifoliada, justo antes de entrar a la etapa reproductiva de la planta [15]. Las plantas fueron infectadas con una solución concentrada de esporas (1×10^7 c/ml) del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* [16] [10]. Las hojas infectadas con el hongo se colectaron en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -70°C para los estudios posteriores.

Cuantificación de ergosterol

Se cuantificó la concentración de ergosterol a las 24, 48, 72, 96h y 7 días post infección (dpi). Las muestras de hoja infectadas con el hongo

Colletotrichum lindemuthianum, fueron pulverizadas en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido y posteriormente, se llevó a cabo la extracción mediante el método de 2 fases [16], usando como solvente, etanol grado HPLC (KARAL 1170 ®). Las muestras obtenidas se hicieron pasar por filtros SEP-PAK C18 (Waters Associates Inc., Milford, MA, EE.UU.) para su purificación, realizando 3 lavados con etanol grado HPLC entre cada muestra. Finalmente, las muestras se corrieron en el equipo HPLC (Shimadzu clase 10A, Kyoto, Japón) con dos bombas LC-10AT y equipadas con el software Clase LC-10At series, versión 5.03 (Shimadzu, Kyoto, Japón) utilizando una columna Zorbax C - 18 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) [7]. Las concentraciones de ergosterol se obtuvieron mediante una curva de calibración estándar (1mg/µl) con el compuesto puro (Ergosterol ≥95.0% HPLC 45480 Sigma Aldrich ®).

Colecta de COVs

Los COVs fueron recolectados a partir de min, estableciendo los tiempos de 0,15,30 y 720 min, hasta los tiempos en horas, 24,48,72 y 96h mediante la técnica de extracción en fase sólida [7] la cual, se basa en el uso de las fibras de microextracción (SPME) [19]. Para coleccionar los COVs, se colocaron bolsas de polietileno (Polietilenos Azteca ®), las cuales no emiten COVs, se cubrió totalmente a la planta para crear una atmosfera y se introdujeron las fibras, dejándose expuestas durante los tiempos establecidos post infección (dpi). Como se menciona anteriormente en la sección de materiales y métodos. Posteriormente fueron coleccionadas las fibras y seguidamente fueron inyectadas directamente en el equipo: cromatógrafo de gases acoplado a espectrofotometro de masas (GC-MS) (an Agilent 7890 series gas chromatograph interfaced to an Agilent 5975 electronic ionization mass-selective triple detector; Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA), con la columna (HP-5MS column Agilent 15, 9, 0.25, 0.25; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) empleando las siguientes condiciones: La temperatura inicial fue de 60°C, la cual incrementó a 80°C, a 5°C por minuto, posteriormente a 210°C, 8°C y finalmente se mantuvo a 10°C por 5 min. Los compuestos encontrados fueron identificados con ayuda de la biblioteca de espectros de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) [10].

Amplificación de las regiones ITS

Para la extracción de DNA, las muestras se pulverizaron en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido, posteriormente, se llevó a cabo la extracción de hojas infectadas con el hongo a las 24, 48, 72, 96h y 7 dpi mediante el método de extracción de DNA [22]. Las muestras fueron cuantificadas mediante Nanodrop (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer Thermo scientific ®) con un promedio total de 1903.44 ng/µl por muestra y finalmente, la amplificación de las regiones ITS mediante la técnica de PCR dúplex, utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 [20] y los primers específicos del *Colletotrichum lindemuthianum* CD1 y CD2, cuyas secuencias son específicas para la detección de este hongo [24]. El protocolo de PCR fue el siguiente: ciclo a 95°C por 5 min, 94°C por 30 s, 47°C por 20 s, 72°C por 20 s y finalmente 72°C por 7 min, con 30 ciclos [20]. Finalmente se corrió un gel de agarosa al 1.1% (UltraPure™ Agarose invitrogen ®) en una cámara de electroforesis (Horizontal Electrophoresis Systems mini10 Select Bio Products ®) empleando una fuente de poder (Power supply 18-1130-01 Healthcare Life Sciences ®) con un voltaje de 100 V durante 25 min para analizar las amplificaciones de las regiones ITS obtenidas. Finalmente se compararon con el control positivo (DNA del hongo puro) [21]. El análisis de la imagen se llevó a cabo mediante el uso del software Image lab™ (Bio Rad software).

Análisis estadístico para ergosterol

El análisis estadístico fue realizado mediante el software R (Rx64 2.12.2), empleando una ANOVA ($\alpha=0.05$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas de la infección son visibles hasta los 4 días.

Nosotros realizamos la infección de las plantas de frijol en base a la metodología anteriormente descrita [16]. Observamos que los síntomas de infección por el hongo en los tiempos de 0 (Imagen 1A), 15 min (Imagen 1B), y 24h (Imagen 1C) no fueron visibles. Sin embargo, los síntomas aparecieron a partir de los 4dpi post infección, siendo completamente notorios a los 7dpi (Imagen 1D).

Las lesiones son visibles principalmente en las nervaduras del envés de las hojas, apareciendo las manchas color café características de la antracnosis (Imagen 1D).

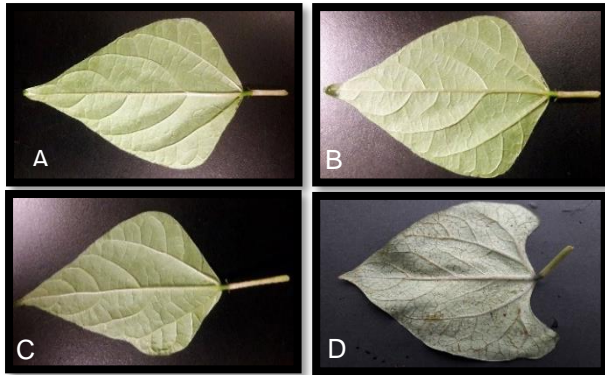


IMAGEN 1: Síntomas de la infección en nervaduras del envés de hojas de frijol común, variedad Negro San Luis. A representa la infección en el tiempo 0. B la infección a los 15 min. C a las 24 h y D la infección a los 7dpi.

La cuantificación de ergosterol permite detectar al hongo a las 24 h post infección.

Nosotros detectamos al hongo con el marcador bioquímico, ergosterol, a partir de las 24 h después de la infección mostrando un aumento en la concentración (ng/μl) directamente proporcional al incremento del tiempo de infección (Imagen 2). En base a esta aseveración, a los 7 dpi detectamos los mayores niveles de concentración de ergosterol.

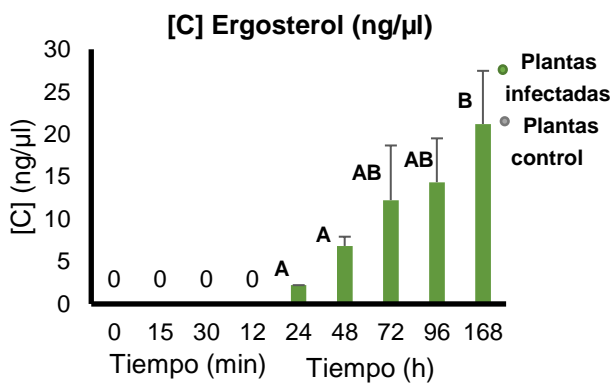


IMAGEN 2: Cuantificación de la concentración de ergosterol a las 24, 48, 72, 96 y 168h como respuesta a la infección con el hongo *C. lindemuthianum*. ANOVA ($\alpha=0.05$)

La amplificación de las regiones ITS detectaron al hongo a las 24 h post infección.

El marcador molecular empleado, las regiones ITS, permitieron la detección del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, al igual que el marcador bioquímico, ergosterol, a las 24 h después de la infección, indicando la presencia de hongo en todos los tiempos de infección establecidos (Imagen 3).

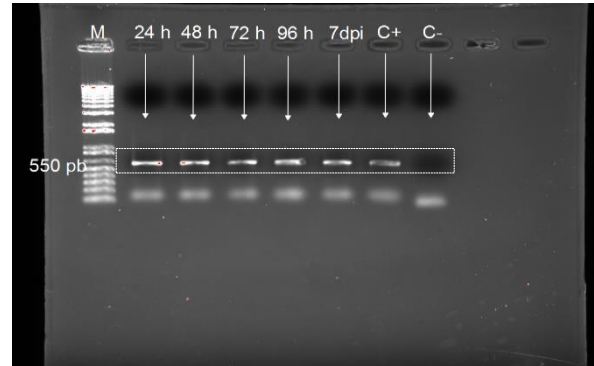


IMAGEN 3: Producto de PCR de hojas infectadas con el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* a los primeros 4 y 7 dpi. *M= marcador de pares de bases (1 Kb), *h= horas, *dpi= días post infección, *C+=Control positivo, *C-=Control negativo.

Los COVs detectaron al hongo a los 15 min post infección.

Por otro lado, los COVs, empleados como marcadores bioquímicos, mostraron 9 volátiles diferenciales de respuesta a la antracnosis a los 15 min después de la infección (Imagen 4) y 31 volátiles diferenciales a las 24 h después de la infección (Imagen4). En base al diseño experimental, los COVs diferenciales son los volátiles emitidos por las plantas infectadas.

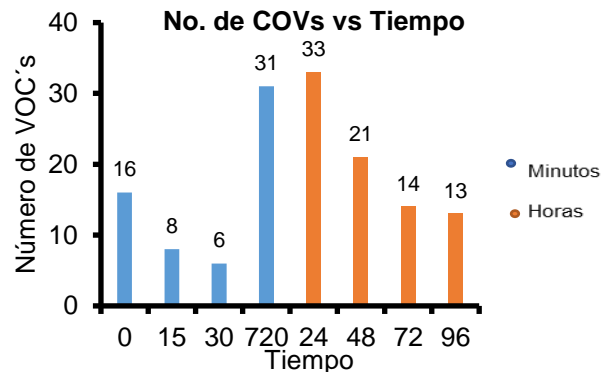


IMAGEN 4: Número de COVs emitidos a los 0, 15, 30 y 72 min, y a las 24, 48, 72 y 96h como respuesta a la infección con el hongo *C. lindemuthianum*.

El volátil ácido oxálico, etil neopentil éster, se encontró a los 15 min como respuesta inmediata a la infección (Imagen 4 y 5). Los volátiles Isopropil meristato y ácido metoxiacético, 2-tetradecil éster, se detectaron a las 24 h después de la infección (Imagen 4 y 5). Nosotros sugerimos estos COVs como los marcadores bioquímicos de detección inmediata de la enfermedad. Estos COVs según la bibliografía, han sido detectados como respuesta a patógenos y en control biológico.

COVs marcadores

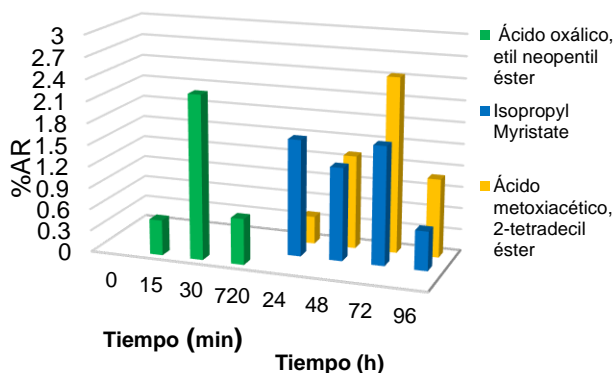


IMAGEN 5: COVs diferenciales emitidos a los 0, 15, 30 y 720 min y a las 24, 48, 72 y 96h como respuesta a la infección con el hongo *C. lindemuthianum*. %AR representa el porcentaje de abundancia relativa en los tiempos establecidos.

CONCLUSIONES

Los compuestos orgánicos volátiles fueron los marcadores de detección más rápida. Nosotros concluimos que el uso de los compuestos orgánicos volátiles como marcadores en la detección temprana de la antracnosis es más rápida, específica y rentable para aplicarlos en campo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Martin Heil, jefe titular del laboratorio de Ecología de plantas, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo. A cada uno de los integrantes del laboratorio por siempre ayudarme, a la Dra. Rosario, Dra. Elizabeth y M. en C. Xicoténcatl. En particular, un agradecimiento muy especial al M. en C. Omar Fabián Hernández Zepeda por guiarme y apoyarme a cada momento,

ya que sin sus enseñanzas y consejos este trabajo no hubiese sido posible.

REFERENCIAS

- [1] Ulloa J., Ulloa P., Ramírez J. & Ulloa B. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Revista Fuente 8.
- [2] CESAVEG (2012). Manual de Plagas y Enfermedades en Frijol. In. Gobierno del Estado de Guanajuato.
- [3] Gallego C., Ligarreto G., Garzón L., Oliveros O. & Rincón L. (2011). Rendimiento y Reacción a *Colletotrichum lindemuthianum* en Cultivares de Frijol Voluble (*Phaseolus vulgaris* L.). Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.
- [4] González F., Frías G., García A. & Flores A. (1999). Resistencia de Genotipos de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a Razas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magn.). Revista mexicana de FITOPATOLOGIA, 18.
- [5] Muñoz S., Lingnerb L., Flossa D., Ludwiga N., Sauerb N. & Deising I. (2007). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. 165, 41-51.
- [6] (CIAT) C.I.d.A.T. (1981). La antracnosis del frijol y su control In: Colombia.
- [7] Niederbacher, B., Winkler, J. & Schnitzler, J. (2015). Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping. Vol. 66, No. 18 pp. 5403-5416
- [8] Zheng M., Shi b, J., Shi c, J., Wang, Q. & Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. Biological Control 65 65, 200-206.
- [9] Johnson S., Beneferb, C., Frewa, A., Griffithsc, B., Hartleyd, S., Karleye, A., Rasmannf, S., Schumannng, M., Sonnemannh, I. & Roberti. C. (2016). New frontiers in belowground ecology for plant protection from root-feeding insects. Applied Soil Ecology 108, 96-107.
- [10] Quintana E., Morales A., Molina J., Ádame R., Acosta J. & Heil M. (2015). Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. Journal of ecology, 103, 250-260.
- [11] Heil, M. & Silva, J. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. vol. 104 no. 13, 5467-5472
- [12] Loreto F, Schnitzler JP. 2010. Abiotic stresses and induced BVOCs. Trends in Plant Science 15, 154-166.
- [13] Mohd A., Sariah M., Paterson R., Zainal M. & Lima N. (2011). Ergosterol analyses of oil palm seedlings and plants infected with *Ganoderma*. Crop Protection, 30, 1438-1442.
- [14] FERTINOVA (2016). Frijol Negro San Luis. URL <http://www.fertinova.mx/productos/granos/frijol-negro-san-luis>
- [15] SIAFEG (2012). Antracnosis del Frijol *Colletotrichum lindemuthianum*. URL http://www.siafeg.org.mx/boletin_enfermedad?idproblema=6
- [16] Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J. & Green, J.R. (1999). *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genetics & Biology, 27, 186-198.
- [17] Gessner M., Bauchrowitz, M. & Escautier, M. (1991). Extraction and Quantification of Ergosterol as a Measure of Fungal Biomass in Leaf Litter. Microb Ecol 22, 285-291.
- [18] Mille C., Von Wachenfeldt E. & Tranvik L. (2004). Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. Journal of Microbiological Methods, 59, 253-262.
- [19] Vas G, Vékey K. 2004. Solid-phase microextraction: a powerful samplepreparation tool prior to mass spectrometric analysis. Journal of Mass Spectrometry 39, 233-254.
- [20] Martínez P., Berrouet K., Salazar M., Gutiérrez P. & Marín M. (2014). Detección por PCR de *Colletotrichum lindemuthianum* en cultivos y semillas de frijol en Antioquia, Colombia. Acta agronómica, 63, 377-387.
- [21] Wang W., Tang J. & Wang Y. (2008). Molecular Detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by Duplex PCR. J. Phytopathology 156, 431-437.