

Inducción fúngica de defensas químicas en *Annona muricata* L. (Anonaceae)

Christian Anabí Riley-Saldaña
Alma Rosa González-Esquinca

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal. Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente núm. 1150, colonia Lajas Maciel, C.P. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. E-mail: christian.riley@unicach.mx.

RESUMEN

Annona muricata es la especie de Anonaceae más cultivada en México, debido a sus frutos son apreciados por su agradable sabor, es una planta capaz de producir 16 alcaloides y 90 acetogeninas. En este artículo se relata un método para inducir respuestas químicas en esta planta. Se usan como modelo de estudio plantas con 6 hojas infectadas con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Los resultados señalan que el método es eficiente y que permite estudiar a la especie sin necesidad de utilizar ejemplares adultos.

Palabras Clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, antracnosis, *Annona muricata*.

ABSTRACT

Annona muricata is the most important crop species of Annonaceae family because its fruits are appreciated by their tasty flavor. It is able to produce almost 16 alkaloids and 90 acetogenins. In this research a method to induce chemical responses in this plant is reported using 6-leave-plants as a model of infected plant with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. This method result very efficient to study chemical induction in seedling.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, antracnosis, *Annona muricata*.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de su ciclo de vida las plantas se encuentran en continua interacción con el medio en el que habitan, por tanto, están sometidas frecuentemente a estrés abiótico y/o biótico, este último incluye hongos, bacterias y herbívoros. Las plantas no pueden defenderse con facilidad, son sésiles y al parecer carecen de sistema inmune, no obstante la muerte por enfermedad es una situación excepcional (Whenham *et al.*, 1986), ello supone el desarrollo y perfeccionamiento a lo largo de la evolución, de sistemas de defensa altamente efectivos para detener o contrarrestar infecciones por microorganismos o del ataque de herbívoros, a fin de cuentas, mecanismos que les permiten sobrevivir en ambientes diversos y adversos.

Las plantas producen metabolitos secundarios, también llamados metabolitos especializados (Pichersky *et al.*, 2011) que constituyen una de las formas de defensa química ante el ataque de diversos organismos, en general, pueden ser constitutivos o inducidos. Los constitutivos son producidos (biosintetizados) por la planta, previo a

la presencia de un patógeno o herbívoro, aminorando o deteniendo el posible daño a los tejidos de la planta. Son barreras químicas preformadas cuya información genética ha sido heredada resultando una diversidad de moléculas entre ellas alcaloides, fenoles, polifenoles, aceites esenciales y terpenos (Dixon, 2003).

Si a pesar de las barreras constitutivas el patógeno se establece, las plantas pueden activar mecanismos de defensa con el fin de detener la infección, a través de los llamados mecanismos de defensa inducidos, que involucran reacciones de biosíntesis o activación de moléculas que se inducen por los tejidos en contacto con el o los patógenos o herbívoros, en las que también intervienen los tejidos no infectados, las moléculas producidas como respuesta al ataque de patógenos, son comúnmente llamadas fitoalexinas (fenoles, flavonoides, alcaloides, terpenos) (Müller & Börges, 1941). En contraste con la resistencia constitutiva, la resistencia inducida se basa en el reconocimiento del invasor y un evento subsecuente de transducción de señales que conduce a la activación de las defensas.

Estas señales involucran en primer lugar una respuesta denominada respuesta hipersensitiva o hipersensible (HR), que implica el colapso de las células dañadas; en segundo lugar se da la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS); la activación de genes relacionados con la defensa, síntesis de fitoalexinas y cambios estructurales de las paredes celulares y la. Esta respuesta localizada ocurre en el sitio de ataque del patógeno y el resultado son lesiones claramente delimitadas y circundadas por tejido sano (Boljakova & Hadjilvakova, 2001, Chisholam *et al.*, 2006, Castro & García, 2009).

Un patógeno habitual de la guanábana (*Annona muricata*) es *Colletotrichum gloeosporioides*, que provoca una enfermedad denominada antracnosis, la cual se caracteriza por atacar hojas, botones florales, frutos y tallos. Por ello el objetivo de este trabajo es dar a conocer uno de los métodos que pueden ser utilizados para inducir metabolitos secundarios en plantas.

MÉTODO

Aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides se aisló de hojas jóvenes de *Annona muricata* infectadas; se hicieron cortes de tejido infectado de 5 x 5 mm que se desinfectaron con hipoclorito al 1.5 % por tres minutos y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, se dejaron secar sobre papel filtro estéril en una campana de flujo laminar durante 15 minutos, cada sección de tejido fue sembrada en cajas petri con agar dextrosa-papa (PDA, Bioxon®) e incubada a 27°C ± 2 en una incubadora marca RIOSSA™, al cuarto día, de las cajas con crecimiento micelial semejante al de *C. gloeosporioides*, se tomaron muestras y se resembraron tres veces en agar PDA; una vez verificada la pureza se tomó una porción de PDA con hifas, los trozos fueron transferidos a cajas petri con este medio de cultivo y fueron incubados a 27 °C durante 7 días (Agostini *et al.*, 1992).

Obtención de cultivos monospóricos

Para la obtención de cultivos monospóricos se siguió el método propuesto por Manadhar *et al.*, 1995 modificado por Santos, 2006 (Santos, 2006). Para ello, en condiciones de esterilidad, se tomaron colonias de ocho días de edad desarrolladas en cajas petri con PDA, se depositó al centro de cada caja 200 µL de agua destilada estéril con una micropipeta. Con la ayuda de una aguja de disección previamente se mezclaron los micelios y conidios con el agua; posteriormente se recuperó la solución que se ajustó a 5 mL con agua estéril. Se tomaron 500 µL de la suspensión conidial y se distribuyeron en las cajas con PDA, este cultivo fue incubado

a 27 °C durante 24 h. De cada aislamiento y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se seleccionó un conidio individual germinado y se transfirió a medio de cultivo PDA. Los aislamientos con características de *C. gloeosporioides* fueron seleccionados y se mantuvieron en PDA a 27°C. La especie fue identificada por la doctora Graciela Huerta Palacios, del Departamento de Fitopatología del Colegio de la Frontera Sur. Y verificada frente a una cepa NCBI HM562712 adquirida del laboratorio GeMBio del Centro Investigaciones Científicas de Yucatán.

Inoculación de plántulas con *Colletotrichum gloeosporioides*.

Para establecer las condiciones adecuadas para la inoculación. Se seleccionaron 75 plántulas de *Annona muricata* con 6 hojas. Mediante aspersión se inoculó cada planta, con caldo dextrosa papa (5 mL) con 1x10⁶ conidios mL⁻¹, cerciorándose que la aspersión fuera homogénea en todas las hojas, la aspersión se llevó a cabo con un aspersor manual. Cada plántula se cubrió con una bolsa de plástico transparente para crear un ambiente húmedo (figura 1). Se colocaron en una germinadora Conviron® con condiciones controladas (27 °C, 50 % de humedad relativa, 12 h luz/12 h oscuridad). Se monitorearon los síntomas todos los días. Una vez que se observaron los síntomas característicos de la patología en las hojas, se colectaron las hojas, tallos y raíces, se dejaron secar a temperatura ambiente y se procedió a la extracción de acetogeninas y alcaloides (González-Esquinca, 2001). Tras la obtención de los extractos se realizó el análisis de esto bajo técnicas químicas y cromatográficas usuales para comparar lo perfiles químicos.



FIGURA 1

Plántulas de *A. muricata*. A. Tratamiento. B. Control

RESULTADOS

La inoculación por aspersión de cultivos monospóricos a $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ esporas de *C. gloeosporioides* en las hojas de plántulas con 6 hojas de *A. muricata* resulta ser un método eficaz para inducir la aparición de síntomas de antracnosis, tales como necrosis foliar en los ápices, haz y bordes, necrosis en el cuello del tallo, así como deformaciones de las hojas (figura 2). El 60 % de las plantas presentaron estos síntomas 8 días posteriores a la inoculación.



FIGURA 2

Síntomas característicos de antracnosis en *A. muricata* causada por *C. gloeosporioides*

El análisis del perfil químico de las plantas sanas vs infectadas de *A. muricata* mediante este método permitió determinar la inducción de un nuevo alcaloide en las hojas el cual se identificará por métodos químicos y espectrofotométricos (cuadro 1).

LITERATURA CITADA

- AGOSTINI J.P., L.W. TIMMER & D.J. MITCHELL, 1992. Morphological and Pathological Characteristics of Strains of *Colletotrichum gloeosporioides* Citrus. *Etiology* 82 (11): 1377-1382.
- BOUÉ S. M., C. H CARTER, K. C. EHRLICH & T.E. CLEVELAND, 2000. Induction of the Soybean Phytoalexins Coumestrol and Glyceollin by *Aspergillus*. *Journal Agricultur Food Chemical*. 48 (6): 2167-2172.
- CASTRO M.E. Y P.E. GARCÍA, 2009. La inmunidad innata en las plantas: una batalla Molecular entre receptores y estimuladores. *Biológicas* 11: 43-47.

Alcaloides	Abundancia relativa (%)	
	Control	Inoculadas
A	93 ± 3a	100 ± 1a
B	100 ± 7a	96.3 ± 2a
C	100 ± 2a	95.2 ± 3a
D	100 ± 2a	98.5 ± 3 ^a
E	0	100 ± 2a

CUADRO 1

Alcaloides en hojas de plantas control e inoculadas con *C. gloeosporioides*.

Los métodos llevados a cabo para la inducción fúngica de fitoalexinas en su mayoría son realizados en cultivos celulares, en los cuales interaccionan las células con inductores de respuesta implicados en la vía de señalización por el ejemplo el Ca^+ , ácido jasmónico y ácido salicílico, también son frecuentemente utilizados elicitores fúngicos que son compuestos señal que estimulan la aparición de cualquier respuesta defensiva que incluyen componentes de las superficies celulares entre ellos oligosacáridos, glicoproteína proteica o lipídica (Nef *et al.*, 1991, Boué, 2000, Hahlbrock *et al.*, 2003, Conciencao *et al.*, 2006, Robles-Zepeda *et al.*, 2009).

El método por aspersión supone varios escenarios más allá de la búsqueda de moléculas de respuesta ante un ataque o infección por hongos, este método puede, además ser utilizado en biotecnología para el estudio del metabolismo secundario con la finalidad de diseñar estrategias para incrementar la resistencia de cultivos importantes y asegurar una mejor de producción.

CONCLUSIÓN

La aspersión de esporas es una buena opción para inoculación de plántulas para evaluar la expresión de metabolitos secundarios en plantas.

- CHISHOLM S.T., G. COAKER, B. DAY & B.J. STASKAWICZ, 2006.** Host—Microbe Interactions Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*. 124: 803-814.
- CONCEICAO, L. F. R., FERRERE, F., R.M. TAVARES & A.C.P DIAS, 2006.** Induction of Phenolic Compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloesporioides* elicitation. *Phytochemistry*. 67: 149-155.
- DIXON R.A. 2003.** Natural Products and Plant Disease Resistance. *Nature* 411: 843-847.
- HAHLBROCK, K., P. BEDNAREK, I. CIOLKOWSKI, B. HAMBERGER, A. HAMBERGE, H. LIEDGENS, E. LOGEMANN, I. SCHMELZER, I. SOMSSICH & J. TAN, 2003,** Non-Self Recognition, Transcriptional Re-programming, and Secondary Metabolite Accumulation During Plant/Pathogen Interactions *100* (2): 14569-14576.
- MÜLLER K.O & H. BÖRGER, 1941,** Experimentelle untersuchungen uber die phytophthoraesistenz der kartoffel. *Arb Biol Reichsanstalt Landw Forstw*. 23:189-2317.
- ODJAKOVA M., Y C. HADJIIVANOVA, 2001.** The Complexity of Pathogen Defense in Plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 27 (1-2): 101-109.
- PICHERSKY E Y E. LEWINSOHN 2011.** Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Ann. Rev. Plant Biol.* 62: 549-66.
- ROBLES-ZEPEDA R.E., M. JIMENEZ-ESTRADA, A. NAVARRO-OCAÑA, I. SAAD-VILLEGAS, I. BRUNNER & E. RUIZ BUSTOS, 2009.** Secondary Metabolites Induction in *Mammillaria huitzilopochtli* (cCactaceae) and Evaluation of the Fungicidal Activity. *African Journal of Biotechnology*. 8 (16): 3874-3878.
- SANTOS-OROZCO, M., 2006.** *Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de Colletotrichum acutatum Simmonds de cítricos en México.* Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Colima, México. 106 p.
- WHENHAM R.J., R.S.S FRASER, L.P. BROWN & J.A. PAYNE, 1986.** Tobacco Mosaic Virus-Induced Increase in Abscic Acid Concentration in Tobacco Leaves: Intracellular Location in Light and Dark-Green Areas, and Relationship to Symptom Development. *Planta* 168: 592-598.