

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS AISLADOS DE TEJIDOS DE FRÍJOL CON SÍNTOMAS DE ANTRACNOSIS

Molecular Identification of Fungi Isolated from Bean Tissues with Anthracnose Symptoms

KATHERIN M. VANEGAS BERROUET¹, I.A.; PABLO A. GUTIÉRREZ SÁNCHEZ¹, Ph. D.; MAURICIO A. MARÍN MONTOYA¹, Ph. D.

¹ Laboratorios de Microbiología Industrial y Biología Celular y Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59A # 63 - 20, Bloque 19A, Medellín, Colombia. kmvanega@unal.edu.co, paguties@unal.edu.co, mamarinm@unal.edu.co
Autor de correspondencia: Mauricio Marín Montoya, mamarinm@unal.edu.co

Presentado el 1 de agosto de 2013, aceptado el 1 de octubre de 2013, fecha de reenvío el 12 de diciembre de 2013.

Citation / Citar este artículo como: VANEGAS BERROUET KM, GUTIÉRREZ SÁNCHEZ PA, MARÍN MONTOYA MA. Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de fríjol con síntomas de antracnosis. Acta biol. Colomb. 2014;19(2):143-154.

RESUMEN

En este estudio se realizó el aislamiento de hongos en tejidos foliares y vainas de fríjol con síntomas de antracnosis, procedentes de cultivos de diferentes municipios del departamento de Antioquia (Colombia). La identificación de los aislamientos se realizó con base en la secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal y se confirmó por observación microscópica de estructuras reproductivas en aquellos aislamientos que esporulaban en medios de cultivo. En todas las muestras sintomáticas, se logró el aislamiento del agente causal de la antracnosis, *Colletotrichum lindemuthianum*, siendo confirmada su identidad por PCR dúplex con cebadores específicos CD1/CD2 y CY1/CY2. En adición se obtuvieron 17 hongos endófitos, 14 de los cuales no esporularon en medio de cultivo (*Mycelia sterilia*), siendo identificados mediante análisis filogenéticos de regiones ITS como miembros de los Ascomycetes *Leptosphaerulina* (tres aislamientos), *Diaporthe* (tres aislamientos), *Gibberella* (un aislamiento), *Plectosphaerella* (un aislamiento) y *Biscogniauxia* (un aislamiento); y de los géneros mitospóricos: *Phoma* (dos aislamientos), *Alternaria* (dos aislamientos) y *Stemphylium* (un aislamiento). Los tres hongos restantes se identificaron con base en caracteres morfológicos y secuenciación como miembros de los géneros *Fusarium* (dos aislamientos) y de la especie *Curvularia lunata* (un aislamiento). Este estudio aumenta el conocimiento de la micobiota de leguminosas, como base para el desarrollo de estudios futuros que permitan evaluar el efecto de estos hongos sobre el desarrollo de enfermedades como la antracnosis y de otros problemas bióticos y abióticos del cultivo del fríjol.

Palabras clave: ADNr, endófitos, PCR, *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT

In this work, endophytic fungi from leaves and pods of bean presenting anthracnose symptoms were isolated from plants collected at different municipalities in the province of Antioquia (Colombia). Isolates were identified by sequencing the rDNA ITS regions together with the examination of reproductive structures during sporulation in culture media. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of anthracnose was isolated in all samples showing symptoms of this disease. These results were confirmed by duplex PCR using the specific primers CD1/CD2 and CY1/CY2. Additionally, 17 endophytic fungi were obtained. Fourteen isolates did not sporulate in culture media (*Mycelia sterilia*) but were identified by phylogenetic analysis of the ITS regions as the Ascomycetes: *Leptosphaerulina* (3), *Diaporthe* (3), *Gibberella* (1), *Plectosphaerella* (1) and *Biscogniauxia* (1) and the mitosporic genera *Phoma* (2), *Alternaria* (2) and *Stemphylium* (1). Three isolates were identified combining morphological

and molecular analysis as *Fusarium* (2) and *Curvularia lunata* (1). This work increases our knowledge of the mycobiota of legume plants and will serve as support of future studies aimed at determining the effect of these fungi on the development of anthracnose as well as other problems affecting the bean crop.

Keywords: endophytes, PCR, *Phaseolus vulgaris*, rDNA.

INTRODUCCIÓN

La antracnosis del fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, es una de las enfermedades más limitantes de este cultivo en el mundo, pudiendo ocasionar pérdidas en los rendimientos de hasta el 95 %, especialmente cuando se cultivan variedades susceptibles al patógeno en regiones húmedas y montañosas (Pastor-Corrales y Tu, 1989), como ocurre en diferentes departamentos de Colombia. En este país, la siembra de fríjol se extiende a cerca de 120000 ha, siendo el 93 % cultivado en la zona andina (Fenalce, 2010). El departamento de Antioquia es uno de los principales productores de fríjol con cerca del 27 % del volumen de producción nacional (~110.000 ton/año) y un área de siembra cercana a 26000 ha/año (Arias *et al.*, 2007).

La antracnosis afecta diferentes tejidos del fríjol, incluyendo folíolos, pecíolos, tallos y vainas; en estas últimas se presentan lesiones necróticas que pueden transformarse en chancros hundidos con centros de color salmón que representan las masas de conidias del hongo (Chaves, 1989). Las semillas afectadas pueden presentar decoloración de la testa, aunque es frecuente su infección latente (asintomática), situación que representa un problema epidemiológico, dada la eficiente transmisión de *C. lindemuthianum* por esta vía (Chen *et al.*, 2012).

El manejo de la antracnosis del fríjol se fundamenta en la siembra de semilla certificada libre del patógeno, el control químico con fungicidas sistémicos y protectantes y la siembra de variedades resistentes al hongo (Schwartz *et al.*, 2005); siendo aún poco explorada la utilización de estrategias de control biológico de *C. lindemuthianum*, bien por antagonismo directo o por inducción de resistencia en su hospedante.

En los últimos años, diferentes estudios han demostrado que la utilización de consorcios microbiales (hongos y bacterias) endófitos impactan positivamente la sanidad de las plantas inoculadas, gracias a la inducción de cascadas de defensa asociadas a los mecanismos de resistencia sistémica adquirida (SAR), resistencia sistema inducida (ISR) y resistencia a insectos mediada por ácido jasmónico (Schulz *et al.*, 2005; Selim *et al.*, 2012). Debido a esto, es posible el tratamiento de semillas o plántulas con bioformulaciones de endófitos que colonicen los tejidos del hospedante y compitan eficientemente contra microorganismos fitopatógenos en la rizosfera y/o filosfera (Schulz y Boyle, 2005).

El término endófito es amplio, dadas sus raíces griegas de las

palabras *endon* (dentro) y *phyton* (planta) y por tanto, su utilización biológica no ha carecido de controversia (Schulz y Boyle, 2005). Por esto en términos generales se refiere a cualquier microorganismo que viva en el interior de los tejidos vegetales, y cuyos efectos pueden ser neutros, benéficos o detrimentales (Stone *et al.*, 2000). Sin embargo, en un sentido más limitado, es frecuente utilizar esta denominación para aquellos hongos y bacterias que colonizan una planta sin causarle síntomas visibles (Schulz y Boyle, 2005).

Estudios recientes en diferentes plantas han demostrado que los hongos endófitos son ubicuos al reino vegetal (Ganley *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009). Además de los beneficios en la protección vegetal, los hongos endófitos han sido reconocidos como fuente importante de nuevos productos naturales para la industria farmacéutica, agrícola e industrial (Huang *et al.*, 2009). Schulz *et al.* (2002), reportan que de 6500 hongos endófitos aislados de diferentes plantas herbáceas, árboles y algas filamentosas de Alemania y Costa Rica, el 80 % presentaban efectos antibacteriales, fungicidas, alguicidas o herbicidas. Los principales metabolitos hasta ahora caracterizados en estos hongos incluyen policétidos, isoprenoides, esteroides, xanthonas, fenoles, isocumarinas, derivados de perileno, quinonas, furandionas, terpenoides, depsipéptidos y citochalasininas (Tan y Zou, 2001; Selim *et al.*, 2012), siendo un ejemplo claro de su gran potencial biotecnológico, el descubrimiento del taxol (paclitaxel), un potente alcaloide inhibidor de células cancerígenas, en el hongo endófito *Taxonomyces andreanae* aislado de la planta gimnosperma *Taxus chinensis* var. *mairei* (Stierle *et al.*, 1993).

Los hongos endófitos pueden dividirse en tres grupos básicos: las micorrizas, los balansiáceos y los no-balansiáceos. Los primeros son hongos que establecen relaciones simbióticas con raíces de plantas, favoreciendo la toma de nutrientes, especialmente de fósforo por parte de éstas; mientras que los segundos son hongos de la familia Balansiaceae (Ascomycetes), y específicamente de los géneros *Epichloë* y *Balansia* y de sus estados anamórficos *Neotyphodium* y *Ephelis*. Estos hongos se caracterizan por su desarrollo sistémico en tejidos de gramíneas y por su transmisión vertical (por semilla sexual) (Schulz y Boyle, 2005). El tercer grupo corresponde a todas aquellas especies de hongos endófitos que no pertenecen a la familia Balansiaceae, siendo la gran mayoría Ascomycetes o sus formas asexuales; algunos ejemplos de estos hongos son: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis* y *Colletotrichum* (Schulz *et al.*, 2002; Schulz y Boyle, 2005).

Desde el punto de vista experimental, el estudio de hongos endófitos tiene varios desafíos, siendo uno de los más limitantes la imposibilidad de esporular que presentan muchos de los aislamientos en medios de cultivo; por esta razón es común encontrar en los reportes de este tipo de investigaciones, la ocurrencia de una alta frecuencia de hongos categorizados morfológicamente como *Mycelia sterilia* (Lacap

et al., 2003). Afortunadamente, la disponibilidad actual que ofrecen las técnicas moleculares para complementar los estudios taxonómicos de hongos, brinda herramientas que posibilitan la identificación de hongos endófitos, aún en ausencia de esporas (Huang *et al.*, 2009).

El conocimiento de la diversidad de hongos endófitos asociados a tejidos infectados por fitopatógenos es fundamental para la comprensión de las interacciones hospedante-patógeno y puede ser fuente importante de posibles agentes de control biológico o de promoción de mecanismos de defensa en las plantas (Punja y Utkhede, 2003). Porque el conocimiento que se tiene de la microbiota endófitica en ambientes altoandinos es muy limitado, en esta investigación se evaluó la diversidad de hongos asociados a lesiones de antracnosis de frijol variedad Cargamanto, a partir de su aislamiento de diferentes cultivos del departamento de Antioquia (Colombia), realizándose su identificación con base en análisis filogenéticos de secuencias de regiones ITS del ADN ribosomal (ADNr).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de hongos

Se realizaron colectas de tejidos de frijol en los municipios de Antioquia: Carmen de Viboral (06° 05' 06" N 75° 20' 19" W, altitud 2150 m s. n. m.), La Unión (05° 58' 28" N, 75° 21' 43" W, altitud 2400 m s. n. m.), Marinilla (06° 10' 36" N 75° 20' 21" W, altitud 2120 m s. n. m.), Santa Rosa de Osos (06° 38' 51" N 75° 27' 37" W, altitud 2550 m s. n. m.), Sonsón (05° 42' 44" N 75° 18' 50" W, altitud 2475 m s. n. m.) y Urrao (006° 18' 55" N 76° 08' 03 W, altitud 1800 m s. n. m.). En estos municipios se colectaron al menos diez muestras de vainas y folíolos de frijol variedad Cargamanto con síntomas de antracnosis. Las muestras utilizadas para el aislamiento de hongos, consistieron de porciones de tejido de aproximadamente 1 cm² de las zonas de avance de las lesiones, que se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al

1 % durante 1 min, se lavaron con agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) suplementado con penicilina y tetraciclina (100 mg L⁻¹). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente (20-24 °C) durante 5-7 días, bajo un fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad, realizándose transferencias a nuevos medios PDA de todas las colonias morfológicamente identificadas como *C. lindemuthianum* y de al menos uno de los otros morfotipos obtenidos. Los aislamientos se encuentran conservados a 4°C en el Laboratorio de Microbiología industrial de la Universidad nacional de Colombia sede Medellín. En todos los aislamientos se realizaron montajes microscópicos para evaluar la presencia de estructuras reproductivas y sus características morfológicas comparadas con las descripciones disponibles en Mycobank (www.Mycobank.org). De cada municipio, se seleccionó al menos un aislamiento presumiblemente de *C. lindemuthianum* de vaina y de tejido foliar para la confirmación molecular de su identidad.

Identificación molecular de los hongos

Extracción de ácidos nucleicos. Cada aislamiento purificado se colocó en matraces conteniendo 20 mL de medio líquido extracto de malta al 2 % (ME), incubándose a temperatura ambiente en oscuridad por 16-20 días. El ADN del micelio obtenido se extrajo por el método del CTAB 3X, siguiendo el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1990) modificado por Santa *et al.* (2012). La integridad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, suplementado con bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹). Los geles se fotodocumentaron con el sistema digital Bio Doc Analyze (Biometra, Alemania). La concentración y pureza del ADN se evaluó por lecturas a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo, E.E. U.U.).

Identificación molecular de *C. lindemuthianum*. De cada municipio, se seleccionó al menos un aislamiento de vaina y de tejido foliar (Tabla 1), morfológicamente identificado como

Tabla 1. Aislamientos de *Colletotrichum lindemuthianum* obtenidos en tejidos de plantas de frijol variedad Cargamanto de diferentes municipios del departamento de Antioquia (Colombia). La confirmación de su identidad se realizó mediante PCR dúplex con cebadores CD1/CD2 y CY1/CY2.

Aislamientos	Procedencia	Prueba PCR dúplex
K3, K4	Vaina, Carmen de Viboral	+
K6	Folíolo, Carmen de Viboral	+
K41	Vaina, Sonsón	+
K22, K23, K25	Folíolo, Sonsón	+
K29, K30	Vaina, Urrao	+
K28, K38	Folíolo, Urrao	+
K39	Vaina, Marinilla	+
K40	Folíolo, Marinilla	+
K43	Vaina, Santa Rosa de Osos	+
K42	Folíolo, Santa Rosa de Osos	+
K44	Vaina, La Unión	+
K45	Folíolo, La Unión	+

C. lindemuthianum para la confirmación molecular de su identidad mediante la prueba de PCR dúplex diseñada por Wang *et al.* (2008), que utiliza dos pares de cebadores específicos: CY1CY2 (CY1: 5'-CTT TGT GAA CAT ACC TAA CC-3'; CY2: 5'-GGT TTT ACG GCA GGA GTG-3') y CD1CD2 (CD1: 5'-ACC TGG ACA CAT AAG TCA AAG-3'; CD2: 5'-CAA CAATGC CAG TAT CAG AG-3'), dirigidos a las regiones ITS del ADNr y al pseudogen de permeasa de hierro *FTR1*, respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µL, conteniendo 15,3 µL H₂O, 1X Buffer PCR, 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0,2 µM de cada cebador, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, Lituania), 0,4 µL de BSA (10 mg µL⁻¹) y 1 µL de ADN. El programa de amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 32 ciclos a 94 °C por 45 s, 62 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los amplicones obtenidos fueron separados por electroforesis de gel de agarosa al 1,8 % y su tamaño verificado por comparación con el marcador de peso molecular Generuler 100 pares de bases Plus (Fermentas). En dos de los aislamientos (K39 y K41) se purificaron directamente del gel los fragmentos obtenidos, utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Alemania). Con el fin de confirmar la naturaleza de los amplicones mediante secuenciación en ambas direcciones con la metodología de *Big Dye Terminator Cycle* (Applied Biosystems, E.E. U.U.), en un secuenciador ABI Prism 3730XL (PE Applied Biosystems) de la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las

secuencias obtenidas con cada cebador, se editaron y ensamblaron los consensos mediante Bioedit 6.0.6. (Hall, 1999), para proceder a su comparación con la base de datos de GenBank, mediante Blastn y Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Identificación molecular de hongos endófitos. La identificación molecular de los aislamientos endófitos se realizó con base en la amplificación por PCR con los cebadores universales ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990) y su posterior secuenciación, tal como se indicó anteriormente. En adición, se obtuvieron secuencias de referencia de diferentes especies de hongos reportados como endófitos en la literatura (Schulz *et al.*, 2002; Schulz y Boyle, 2005; Selim *et al.*, 2012), para realizar un alineamiento con el algoritmo Clustal W incluido en el *software* Bioedit 6.0.6. (Hall, 1999). La matriz obtenida fue empleada para realizar análisis filogenéticos basados en los algoritmos de *Neighbor Joining* (NJ) y Máxima verosimilitud (ML), con distancia genética calculada por el método de Kimura dos-parámetros, mediante el *software* Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). El soporte de la topología interna de los árboles filogenéticos se realizó mediante análisis de *bootstrap* con 1.000 iteraciones (Felsenstein, 1985).

RESULTADOS

En total se obtuvieron 34 aislamientos de hongos, 17 correspondieron a *C. lindemuthianum* y 17 a hongos endófitos aso-

Tabla 2. Resultados de identidad en GenBank de secuencias ITS del ADNr de hongos aislados de tejidos foliares y de vainas de plantas de frijol variedad Cargamanto en cultivos del Departamento de Antioquia.

Aislamiento	Procedencia	Identidad en GenBank	Tamaño (pb)*	Identidad**
K1	Folíolo, Carmen de Viboral	JN400714 <i>Fusarium oxysporum</i>	522 (100 %)	100 %
K2	Vaina, Carmen de Viboral	HQ832825 <i>Pleosporales</i> sp.	588 (100 %)	99 %
K8	Folíolo, Carmen de Viboral	KC288118 <i>Curvularia lunata</i>	574 (99 %)	100 %
K10	Folíolo, La Unión	KC339218 <i>Diaporthe</i> sp.	550 (99 %)	99 %
K12	Folíolo, La Unión	GUS66269 <i>Leptosphaerulina chartarum</i>	587 (99 %)	100 %
K13	Folíolo, Sonsón	JQ936191 <i>Ampelomyces</i> sp.	512 (99 %)	100 %
K16	Folíolo, Sonsón	JQ936191 <i>Ampelomyces</i> sp.	522 (99 %)	100 %
K17	Folíolo, Sonsón	JN712494 <i>Leptosphaerulina australis</i>	519 (99 %)	99 %
K18	Folíolo, Sonsón	KC577196 <i>Fusarium graminearum</i>	520 (99 %)	100 %
K20	Folíolo, Sonsón	AB302247 <i>Phomopsis</i> sp.	580 (100 %)	99 %
K26	Folíolo, Marinilla	JX164072 <i>Stemphylium</i> sp.	558 (99 %)	100 %
K27	Folíolo, Santa Rosa de Osos	KC288119 <i>Alternaria</i> sp.	543 (100 %)	100 %
K32	Vaina, Urrao	FJ884075 <i>Biscogniauxia</i> sp.	675 (96 %)	100 %
K33	Folíolo, Santa Rosa de Osos	JQ796755 <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	542 (100 %)	99 %
K34	Folíolo, Santa Rosa de Osos	AB302247 <i>Phomopsis</i> sp.	551 (100 %)	99 %
K35	Folíolo, Santa Rosa de Osos	KC288119 <i>Alternaria</i> sp.	544 (100 %)	100 %
K36	Vaina, Marinilla	KC254033 <i>Fusarium oxysporum</i>	517 (100 %)	100 %
K39, K41	Vaina, Urrao	JX546806 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	530 (100%)	99 %

* Entre paréntesis se presenta el porcentaje de cobertura. **Valor (e) para todas las comparaciones: 0,0.

ciados a los tejidos de frijol, siendo evidente la diferencia en el número de aislamientos obtenidos en tejido foliar (14) con relación a aquellos de tejido de vaina (tres) (Tabla 2). La identificación morfológica de *C. lindemuthianum* se logró en los siete aislamientos obtenidos de vainas, presentando conidias hialinas cilíndricas y unicelulares (promedio \pm SD: $15,75 \pm 2,44 \times 4,76 \pm 0,46$) y micelio septado de colores gris a negro oliva (Liu *et al.*, 2013). Para el caso de los hongos endófitos, solo se logró la observación de esporas en tres aislamientos, los que fueron identificados morfológicamente a nivel de género como *Curvularia* (K8) y *Fusarium* (K1 y K36). Los 14 aislamientos endófitos restantes fueron catalogados según el criterio de Lacap *et al.* (2003) como *Mycelia sterilia*, debido a la ausencia de estructuras reproductivas en sus medios de cultivo.

Identificación molecular de los hongos

El método de extracción de ADN basado en el uso de CTAB 3X permitió obtener ADN en la cantidad y calidad adecuada, con un promedio de concentración de $625,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (SD: $\pm 670,7$) y relaciones de 260 nm:280 nm de 1,63 (SD: $\pm 0,24$). **Identificación molecular de *C. lindemuthianum*.** Las reacciones de PCR dúplex con el par de cebadores CD1/CD2 y CY1/CY2,

generaron los fragmentos del tamaño esperado de 638 pb y 442 pb, respectivamente, en los aislamientos identificados morfológicamente como *C. lindemuthianum*, pero no en los otros morfotipos encontrados (Fig. 1A). Las secuencias obtenidas para dos de los aislamientos (K39 y K41) confirmaron la naturaleza de los amplicones, al obtener como primeros hits del resultado de Blastx para CD1/CD2, niveles de identidad de 34 a 37 % (valores e: $1 \times 10^{-12,-14}$, coberturas: 71-74 %) con respecto a proteínas permesas de hierro de diferentes hongos, incluyendo miembros del género *Colletotrichum* (ej. Acciones EJP66635, EGX90976, ELA 37854). Para el caso de los amplicones generados con CY1/CY2, el análisis de Blastn identificó sus secuencias como parte de la región ITS del ADNr de *C. lindemuthianum* (ej. JX546806, JX546807, GU227800, EU400129), con 99 % de identidad y valores de 0,0 (cobertura: 99 %).

Identificación molecular de hongos endófitos. La amplificación de los productos de PCR de las regiones ITS del ADNr de los hongos endófitos aislados, generó fragmentos de 600 a 700 pb con los cebadores ITS1 e ITS4. Dichas variaciones de tamaño eran una evidencia inicial de que correspondían a diferentes especies (Fig. 1B). El análisis con Blastn, confirmó esta observación al obtenerse como primeros *hits* con valores de

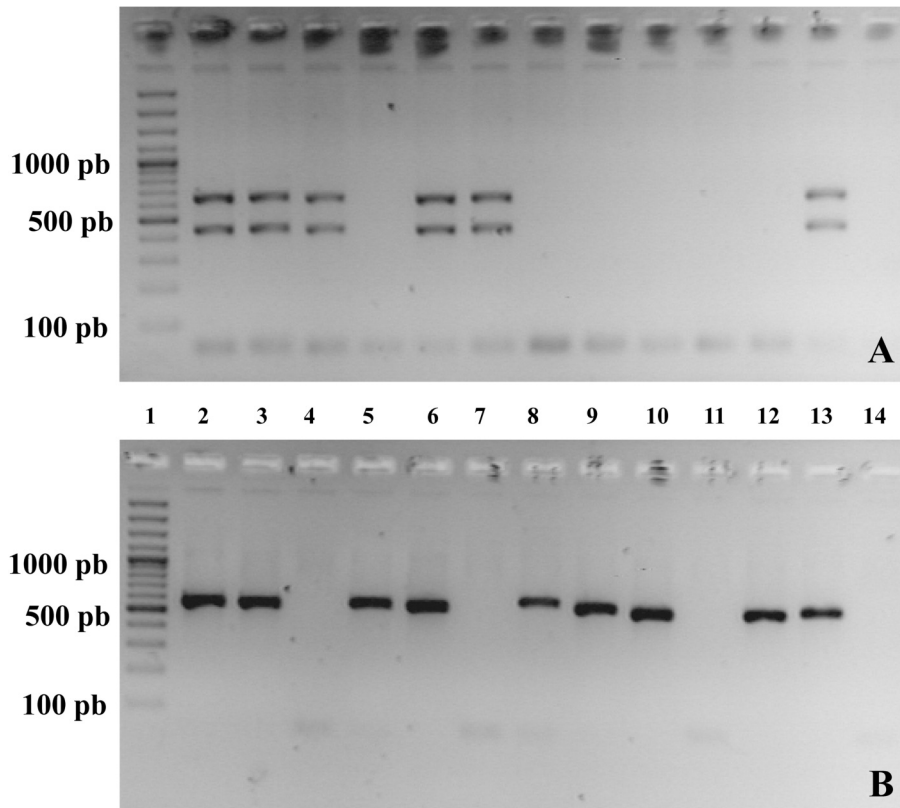


Figura 1. Productos amplificados por PCR con los cebadores (A) CD1/CD2 (638 pb) y CY1/CY2 (442 pb), (B) ITS1/ITS4 (600-700 pb) a partir de ADN obtenido de micelio de hongos aislados de tejidos de frijol variedad Cargamanto con síntomas de antracnosis en cultivos de Antioquia (Colombia). Línea 1: marcador de peso molecular 100 pb plus (Fermentas); 2 a 7: aislamientos identificados en el estudio como *Colletotrichum lindemuthianum*; 8 a 12: aislamientos de hongos endófitos; 13: control positivo (ADN de *Colletotrichum lindemuthianum*); 14: Control negativo (H₂O).

identidad >99 % y valores $e: 0,0$, a los hongos que se presentan en la tabla 2. Los resultados de las comparaciones con Blastn corresponden a un alineamiento local que conduce a identificaciones putativas. Por lo tanto, para tener mayor confiabilidad en la identificación se realizaron análisis filogenéticos separados para Ascomycetes de las clases Sordariomycetes y Dothideomycetes, siendo posible en la mayoría de aislamientos bajo estudio la inferencia de la identidad taxonómica genérica, aunque para algunas cepas fue posible plantear su hipótesis de identidad en cuanto a la especie.

Los análisis filogenéticos se realizaron con base en 642 pb para ambas clases, siendo los dendrogramas generados similares para los dos algoritmos de agrupamiento utilizados (NJ y ML), aunque con variaciones topológicas menores en la ubicación de los clados. Por motivos de espacio se presenta solo el dendrograma NJ. Para el caso de los Dothideomycetes, el dendrograma se dividió en dos clados principales (I y II) representando las familias Pleosporaceae y Didymellaceae del orden Pleosporales (Fig. 2). El primer clado se subdividió a su vez en tres subclados (IA, IB, IC) con valores de *bootstrap* de 100 %. El IA correspondió al género teleomórfico *Pleospora* y a diferentes especies de *Stemphylium*; en este clado se ubicó además la secuencia del aislamiento K26 con un nivel de identidad de 0,994 con respecto a este último género mitospórico (matriz no mostrada). El subclado IB correspondió al género anamórfico *Alternaria*, e incluyó dos aislamientos colectados en este estudio (K27 y K35), con niveles de identidad de 1 con respecto a miembros de este género; mientras que el subclado IC agrupo a las formas perfectas e imperfectas (*Curvularia lunata*) de la especie *Cochliobolus lunatus* con el aislamiento K8, con quienes compartió niveles de identidad de 0,994.

Por otra parte el clado II se dividió en dos subclados (IIA y IIB), con valores de *bootstrap* >99 %, separando en el IIA a la especie *Leptosphaerulina chartarum* de otras especies de este género (ej. *L. americana*, *L. trifolii*) y de formas mitospóricas picnidiales como *Phoma*, *Coniothyrium* y *Ampelomyces* sp. La matriz de identidad generada, permite plantear la hipótesis taxonómica que el aislamiento K12 pertenece a dicha especie (identidad: 0,996), pero no así el aislamiento K2, pues solo presentó un valor de identidad de 0,9 con esta. En el subclado IIB se ubicaron en diferentes posiciones los aislamientos K13, K16 y K17; los dos primeros compartieron niveles de identidad de 0,996 con especies de *Phoma*; y el último de 0,994 con las especies *L. americana* y *L. trifolii*, además de *Coniothyrium aleuritis*, por lo que no fue posible identificar dichos aislamientos a nivel de especie.

Con respecto al dendrograma generado para los Sordariomycetes, este presentó cinco clados principales (I a V), con valores de *bootstrap* >99 % (Fig. 3). El clado I correspondió a la familia Nectriaceae del Orden Hypocreales, e incluyó además de diferentes especies del género *Fusarium* o de su forma sexual *Gibberella*, a tres de los aislamientos obtenidos en este estudio (K1, K18 y K36). La matriz de identidad resultante,

permite plantear que estos aislamientos están filogenéticamente asociados con las especies *F. equiseti*, *F. oxysporum* y *Gibberella zeae* (An. *F. graminearum*), respectivamente, al presentarse niveles de identidad con respecto a secuencias de referencia de dichas especies superiores a 0,992. Por su parte, los clados II y III representan las familias Plectosphaerellaceae y Glomerellaceae del orden Glomerellales, respectivamente, siendo posible identificar como miembro de la especie *Plectosphaerella cucumerina* al aislamiento K33 (identidad: 0,988) y confirmar la identidad de los dos aislamientos de referencia K39 y K41, como *C. lindemuthianum*. El clado IV representa al orden Diaporthales al contener tanto formas perfectas del género *Diaporthe* como a estados mitospóricos de *Phomopsis*. En este clado se presentaron además los aislamientos obtenidos en este estudio K10, K20 y K34, siendo el primero identificado como *D. novem* con un valor de 0,994 de identidad, y los dos restantes como *D. phaseolorum*, con quien compartió un nivel de identidad de 1. Finalmente en el clado V, se ubicaron especies del género *Biscogniauxia* de la familia Xylariaceae, orden Xylariales. En este clado fue posible identificar solo en cuanto a género al aislamiento K32.

DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó el aislamiento y la identificación de hongos asociados a tejidos de fríjol (foliar y vainas) con síntomas de antracnosis, una de las enfermedades más limitantes para la producción de esta leguminosa en la región andina de Colombia. En todos los tejidos colectados fue posible la obtención de aislamientos de *C. lindemuthianum*, el agente causal de dicha enfermedad, siendo confirmada su identidad mediante PCR dúplex con los cebadores específicos CD1/CD2 y CY1/CY2, diseñados por Wang *et al.* (2008). En dos de los aislamientos, se secuenciaron los amplicones generados, determinándose su identidad con una región del gen de permeasa de hierro FTR1 y de una porción de las regiones ITS1, 5,8S e ITS2 del ADNr de *C. lindemuthianum*, para CD1/CD2 y CY1/CY2, respectivamente. Los aislamientos de *C. lindemuthianum* obtenidos en el presente estudio, serán utilizados en un próximo estudio para evaluar la variabilidad genética de este hongo en Antioquia, con base en la utilización de marcadores moleculares microsatélites diseñados por nuestro grupo.

Además del aislamiento del agente causal de la antracnosis, también se obtuvieron 17 cepas de hongos asociados a los tejidos infectados y que por aislarse del interior de los tejidos de fríjol, previa desinfección superficial, fueron denominados como endófitos, siguiendo la terminología planteada por Stone *et al.* (2000). De este proceso de aislamiento fue evidente una mayor proporción de aislamientos obtenidos en tejido foliar de fríjol (14/17), en comparación con tejido de vaina (3/17). Esta situación era de esperarse, por cuanto el espacio intercelular parenquimático es el sitio donde se presenta en mayor medida la colonización de endófitos en tejidos aéreos de plantas (Schulz y Boyle, 2005; Selim *et al.*,

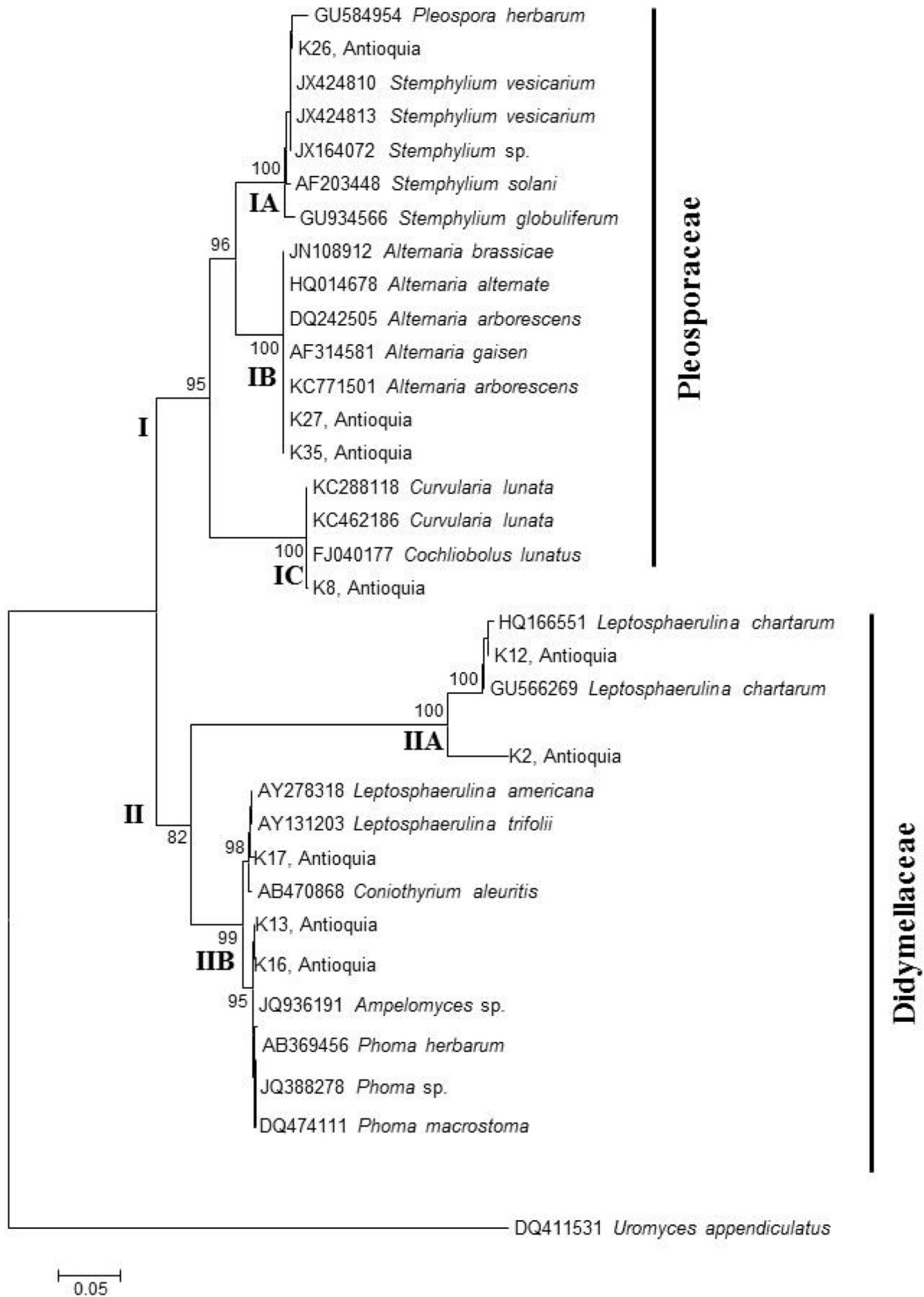


Figura 2. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADNr de hongos Dothideomycetes aislados de tejidos de frijol var. Cargamanto en el departamento de Antioquia (Colombia) (identificados por la letra K). Los números en las ramas indican los valores de *bootstrap* >80 % y los números romanos corresponden a los clados referidos en el texto. En algunas accesiones se indica el nombre del teleomorfo (Ej. *Cochliobolus*), porque así fue depositada la accesión en GenBank.

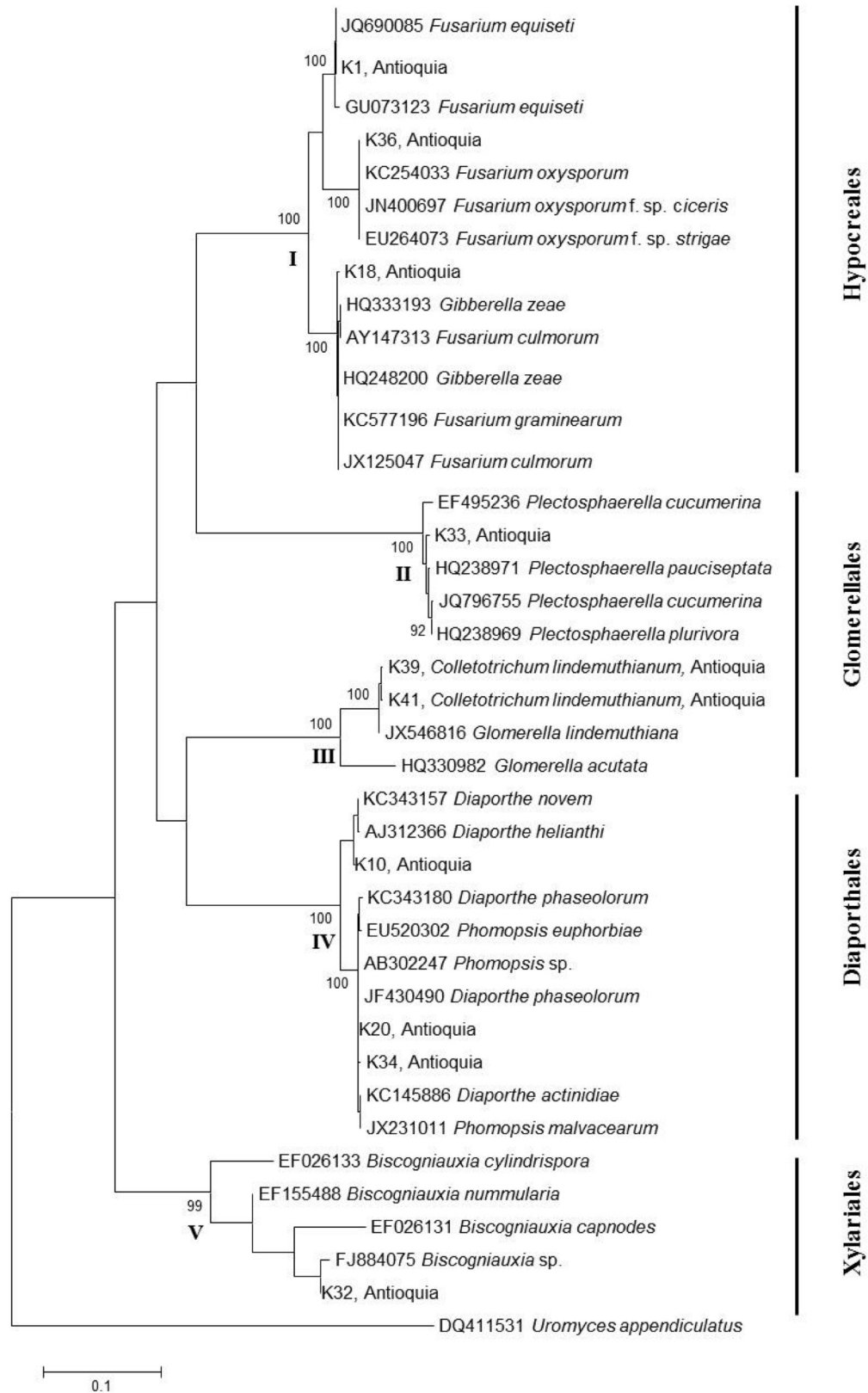


Figura 3. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADNr de hongos Sordariomycetes aislados de tejidos de fríjol variedad Cargamanto en el departamento de Antioquia (Colombia) (identificados por la letra K). Los números en las ramas indican los valores de *bootstrap* >80 % y los números romanos corresponden a los clados referidos en el texto. En algunas accesiones se indica el nombre del teleomorfo (Ej. *Glomerella*), porque así fue depositada la accesión en GenBank.

2012). Existen además varios reportes que señalan que algunos endófitos están adaptados a ciertos órganos vegetales, por ejemplo *Phyllosticta multicorniculata* lo está en acículas de abetos, *Melanconium apiocarpum* y *Cryptosporiopsis* sp. están confinados a corteza de *Alnus* spp. y *Phialocephala* spp. y *Phialopora* spp., parecen ser específicos solo a raíces de *Quercus* spp. (Schulz y Boyle, 2005). Por esto, la inoculación cruzada de los aislamientos obtenidos en el presente estudio en vaina y tejido foliar, permitirá en el futuro evaluar la hipótesis de especialización de tejidos en endófitos en fríjol.

La secuenciación de las regiones ITS del ADNr de los aislamientos, permitió su identificación taxonómica en el ámbito genérico, aunque para algunas cepas los análisis filogenéticos realizados posibilitaron plantear su identidad en cuanto a especie. Todos los aislamientos obtenidos correspondieron a Ascomycetes de las clases Dothideomycetes o Sordariomycetes y dada la ausencia de estructuras reproductivas en la mayoría de las colonias (14/17), solo fue posible confirmar la identidad morfológica y molecular, en tres cepas: una de *Curvularia lunata* y dos especies de *Fusarium* (*F. oxysporum* y *F. equiseti*).

La presencia de hongos *Mycelia sterilia* en estudios de aislamiento de hongos endófitos en diferentes plantas y tejidos vegetales es frecuente y generalizada (Lacap *et al.*, 2003; Schulz y Boyle, 2005; Selim *et al.*, 2012). Así por ejemplo, Huang *et al.* (2008), encontraron hongos endófitos que no esporulaban en medio de cultivo en 27 de 29 plantas medicinales evaluadas en su trabajo, siendo la frecuencia de aislamientos estériles del 27 %; mientras que Guo *et al.* (2000), al estudiar la biodiversidad de endófitos en *Livistona chinensis*, determinaron que el 16 % de los morfotipos encontrados no esporulaban. Debido a esta situación, el uso de técnicas moleculares basadas en análisis filogenéticos de secuencias de regiones ribosomales y de otras regiones del genoma (ej. β -tubulina, factor de elongación 1) se ha constituido en una herramienta fundamental para lograr la identificación de muchos de los hongos endófitos que actualmente se reportan en la literatura (Schulz y Boyle, 2005; Selim *et al.*, 2012). El presente estudio representa un claro ejemplo de la utilidad de éstas herramientas moleculares, al permitir en 14 aislamientos estériles asociados a tejidos de fríjol, su identificación en cuanto a género, así: *Leptosphaerulina* (tres aislamientos), *Diaporthe* (tres aislamientos), *Phoma* (dos aislamientos), *Stemphylium* (un aislamiento), *Alternaria* (dos aislamientos), *Gibberella* (un aislamiento), *Plectosphaerella* (un aislamiento) y *Biscogniauxia* (un aislamiento). En adición el análisis filogenético permitió plantear la asociación en cuanto a especie de: *G. zaeae*, *P. cucumerina*, *D. novem*, *D. phaseolorum* y *L. chartarum*. La mayor parte de los aislamientos identificados en este estudio, concuerdan con los reportes de los principales géneros de hongos endófitos registrados en la literatura (Schulz *et al.*, 2002; Schulz y Boyle, 2005; Selim *et al.*, 2012). Así por ejemplo, Schulz *et al.* (1998), en un estudio que incluyó más de 6000 endófitos de cerca de 500 plantas diferentes

de la región templada, encontraron que la mayoría de estos hongos pertenecían a géneros ubicuos como: *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geniculosporium*, *Phoma* y *Pleospora*; mientras que Schulz y Boyle (2005) indican que algunos géneros son comunes a las regiones tropicales y templadas (ej. *Fusarium*, *Phomopsis*, *Phoma*). Por otra parte, los miembros del orden Xylariales y de los géneros *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phyllosticta* y *Pestalotiopsis*, predominan como endófitos en los trópicos. En adición, diferentes estudios también han reportado la ocurrencia de endófitos específicos a un hospedante particular, tal como ocurre en el caso del hongo *Lophodermium* spp. en coníferas, *Discula umbrinella* en *Fagus sylvatica* y *Physalospora vaccinii* en *Vaccinium oxycoccus* (Schulz y Boyle, 2005). Una muestra clara de esta situación se aprecia en los resultados de un estudio reportado por estos autores, en el que se inocularon brotes de fríjol con 26 aislamientos de hongos endófitos aislados de esta planta y 19 procedentes de otras especies vegetales, encontrando que el 69 % de los primeros podían colonizar los tejidos de fríjol inoculados, mientras que este valor tan solo alcanzaba el 7 % de los otros aislamientos.

Con relación al aislamiento de hongos endófitos en leguminosas herbáceas, diferentes reportes señalan como algunos de los hongos más frecuentes en estos hospedantes a: *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia lunata*, *Epicoccum nigrum*, *Glomerella cingulate*, *Glomerella glycines*, *Nigrospora sphaerica*, *Colletotrichum truncatum*, *Chaetomium globosum*, *Phoma* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Drechslera* sp., *Penicillium* sp., *Phomopsis longicolla*, *Phomopsis sojiae*, *Phomopsis* sp., *Pleospora herbarum*, *Fusarium* spp. y *Stemphylium* sp., entre otros (Larran *et al.*, 2002; Seena y Sridhar, 2004; Dudeja *et al.*, 2012); siendo destacado el hecho que de los 11 géneros encontrados en el presente estudio, siete, incluyendo a *Colletotrichum*, coinciden con dicho listado. Los cuatro hongos restantes, *Diaporthe* (Gomes *et al.*, 2013), *Plectosphaerella* (Rosa *et al.*, 2012), *Leptosphaerulina* (Suryanarayanan y Murali, 2006) y *Biscogniauxia* (Nugent *et al.*, 2005) son frecuentemente registrados como endófitos de diferentes plantas en el trópico y la región templada.

La asociación de hongos endófitos con sus plantas hospedantes resulta en ventajas como la promoción de su crecimiento, la reducción de la severidad de enfermedades, la prevención de la herbivoría y la tolerancia a sequías (Seena y Sridhar, 2004). Además es frecuente el aislamiento y la caracterización a partir de extractos de hongos endófitos, de nuevos compuestos bioactivos y metabolitos secundarios de utilidad en diferentes campos (ej. control biológico de plagas y enfermedades, drogas antitumorales y antibióticas, análogos de hormonas vegetales) (Schulz *et al.*, 2002; Selim *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

El presente trabajo representa un primer reporte de la microbiota asociada a cultivos de fríjol de las regiones altoandinas del departamento de Antioquia. El efecto de dichos

hongos sobre el desarrollo epidemiológico de enfermedades como la antracnosis del fríjol o incluso de ataques de insectos plagas, es hasta ahora desconocido y debería ser abordado en un próximo estudio en el que se realicen pre-inoculaciones individuales y en consorcios de estos hongos. En este sentido, en un estudio reciente Akutse *et al.* (2013), reportaron la utilidad de la inoculación de diez hongos pertenecientes a los géneros: *Beauveria* (3), *Hypocrea* (1), *Gibberella* (1), *Metarhizium* (2), *Trichoderma* (1) y *Fusarium* (2) para reducir el efecto del minador la arveja y el fríjol, *Liriomyza huidobrensis*, encontrando que ocho de los aislamientos una vez colonizaron los tejidos de las plantas, fueron patogénicos al minador, causando un 100 % de mortalidad luego de 13 a 15 días de contacto con el insecto. En adición, la emergencia de los adultos fue significativamente reducida cuando se inoculó con *Hypocrea* spp. (21,4 %) y *Beauveria* spp. (38 %). Se espera que los resultados de la presente investigación estimulen la realización de estudios bioprospectivos que conduzcan al mejoramiento de las condiciones sanitarias de los cultivos de fríjol en nuestro medio y/o que permitan identificar compuestos que generen valor agregado a la cadena productiva de leguminosas en Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, proyecto: 20101009932. Convocatoria Nacional para el fortalecimiento de los Grupos de Investigación y Creación Artística de la Universidad Nacional de Colombia. 2010-2012. Se agradece al Profesor Mauricio Salazar Yepes por su apoyo en la colección y el aislamiento de los hongos.

BIBLIOGRAFÍA

Akutse KS, Maniania NK, Fiaboe KK, Van Den Berg J, Ekesi S. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera:Agromyzidae). *Fungal Ecol.* 2013;6(4):293-301.

Arias JH, Rengifo T, Jaramillo M. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Fríjol Voluble. Medellín: FAO; 2007. p. 198.

Chaves, G. Anthracnose. En: Schwartz H, Galvez G, editors. Bean production problems. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); 1989. p. 39-54.

Chen, YY, Conner RL, Gillard CL, McClaren DL, Boland GJ, Balasubramanian PM, *et al.* A quantitative real-time PCR assay for detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in navy bean seeds. *Plant Pathol.* 2012;62(4):900-907.

Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990;12:13-15.

Dudeja SS, Giri R, Saini R, Suneja-Madan P, Kothe E. Interaction of endophytic microbes with legumes. *J. Basic Microbiol.* 2012;52(3):248-260.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39(4):783-791.

FENALCE. El cultivo de fríjol. Historia e importancia. El cerealista. 2010. Mayo-junio:30-31.

Ganley RJ, Brunsfeld SJ, Newcombe G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(27):10107-10112.

Gomes RR, Glienke C, Videira SI, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia.* 2013;31(1):1-41.

Guo LD, Hyde KD, Liew EC. Identification of endophytic fungi from *Livingstonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytol.* 2000;147(3):617-630.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95-98.

Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diver.* 2008;33(1):61-75.

Huang WY, Cai YZ, Surveswaran S, Hyde KD, Corke H, Sun M. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diver.* 2009;36(1):69-88.

Kumar DS, Hyde KD. Biodiversity and tissue specificity of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diver.* 2004;17(1):69-90.

Lacap DC, Hyde KD, Liew ECY. An Evaluation of the fungal "morphotype" concepts based on ribosomal DNA sequence. *Fungal Diver.* 2003;12(1):53-66.

Larran S, Rollán C, Bruno H, Alippi HE, UrrutiA MJ. Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Invest. Agr. Prod. Agr Prod Prot Veg.* 2002;17(1):173-178.

Liu B, Cai L, Crous PW, Damm U. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. *Mycologia.* 2013;105(4):844-860.

Nugent LK, Sihanonth P, Thienhirun S, Whalley AJ. *Biscogniauxia*: a genus of latent invaders. *Mycologist.* 2005;19(1):40-43.

Rosa LH, Tabanca N, Tehen N, Pan Z, Wedge DE, Moraes RM. Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smallanthus* maintained *in vitro* as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Can J Microbiol.* 2012;58(10):1202-1211.

Pastor-Corrales MA, Tu JC. Anthracnose En: Schwartz H, Galvez G, editors. Bean production problems. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); 1989. p. 77-104.

Punja ZK, Utkhede RS. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* 2003; 21(9):400-407.

Santa C, Marín M, Díez MC. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Rev Mex Micol.* 2012;35(1):23-34.

- Schwartz HF, Steadman JR, Hall R, Forster RL. Compendium of Bean Diseases. 2nd ed. St Paul: APS Press; 2005. p. 109.
- Schulz B, Guske S, Dammann U, Boyle, C. Endophyte host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis*. 1998;25(1):213-227.
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res*. 2002;106(9):996-1004.
- Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. *Mycol Res*. 2005;109(6):661-686.
- Seena S, Sridhar KR. Endophytic fungal diversity of 2 sand dune wild legumes from the southwest coast of India. *Can J Microbiol*. 2004;50(12):1015-1021.
- Selim KA, El-Beih AA, Abdel-Rahman TM, El-Diwany AI. Biology of Endophytic Fungi. *CREAM*. 2012;2(1):31-82.
- Stierle A, Strobel GA, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science*. 1993;260(5105):214-216.
- Stone JK, Bacon CW, White JF. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. En: Bacon CW, White JF, editors. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker; 2000. p. 3-30.
- Suryanarayanan TS, Murali TS. Incidence of *Leptosphaerulina crassiasca* in symptomless leaves of peanut in southern India. *J. Basic. Microbiol*. 2006;46(4):305-309.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2439-2442.
- Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*. 2001;18(4):448-459.
- Wang W, Tang JH, Wang YC. Molecular detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by Duplex PCR. *J Phytopathol*. 2008;156(7):431-437.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. New York: Academic Press; 1990. p. 315-322.
- Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep*. 2006;23(5):753-771.

