

NOTA TÉCNICA / AUTORES INVITADOS

Javier Francisco Abello¹ y Segenet Kelemu¹

ABSTRACT

Endophyte fungi: adaptive advantages within plants

Endophytic fungi often develop a systemic and mutually beneficial association with their hosts. A wide range of economically important plants have been reported to harbor endophytes. In these symbiotic mutualisms, both host and symbiont gain benefits from the association. The fungus obtains nutrients from its host and in return it provides protection from abiotic (environmental stresses) and biotic stresses (pest and insect attacks) to its host plant. Endophytes have been shown to confer enhanced fitness to their hosts such as enhanced tillering, drought tolerance, root growth, overall enhanced plant growth. This work describes the detection, isolation and genetic transformation of an endophytic fungus, *Acremonium implicatum*, from *Brachiaria brizantha* accession CIAT 6780. The results open possibilities for exploiting the qualities of an introduced gene as a reporter and study the interactions between *A. implicatum* and its host *Brachiaria*. Furthermore, it also provides options to use a transformed *A. implicatum* as a vehicle for production and delivery of gene products of agronomic interest into the host plant in order to enhance protective benefits and other traits of agronomic importance that will contribute to improved plant productivity.

Key words: genetic transformation, gene reporter, green fluorescent protein (GFP), plant-endophyte interaction.

Recibido: agosto 11 de 2006.
Aceptado: diciembre 4 de 2006.

1. Investigadores, Interacción Planta-Microbios, Programa de Patología de Forrajes, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira (Valle), A.A. 6713, Cali, Colombia. e-mail: j.f.abello@cgiar.org

Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas

RESUMEN

Los hongos endófitos son organismos inherentes a las plantas que establecen una asociación específica con su hospedero para mutuo beneficio. Existen sinnúmero de especies vegetales de importancia económica que interactúan con especies de hongos endófitos. La planta provee al hongo alimento, hospedaje y protección; por su parte, aunque no hay certeza sobre los mecanismos de acción, los endófitos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas que generen estrés, ya sean de tipo abiótico (salinidad, acidez) o biótico (ataque de plagas). Esta simbiosis otorga mayor habilidad competitiva a las plantas y permite una plena expresión de su potencial genético traducido en altas tasas de germinación, mejor densidad, más biomasa en los tejidos y mayor producción de semilla. Se reporta la detección, aislamiento y transformación del hongo filamentoso endófito *Acremonium implicatum* aislado de la accesión CIAT 6780 del pasto *Brachiaria brizantha* en el laboratorio del Programa de Patología de Forrajes del CIAT. El trabajo abre amplias posibilidades para el estudio de la interacción planta-endófito y permite explorar su potencial como un sistema alternativo de expresión de genes que confieran resistencia a plagas y enfermedades sin recurrir al uso de plantas transgénicas. En los hospederos, los endófitos transgénicos pueden ser usados como vehículo para la producción y entrega de productos generados a partir de genes de interés agronómico, cumpliendo funciones protectoras y proporcionando otras ventajas que se vean reflejadas en una mayor productividad de la planta.

Palabras clave: transformación genética, gen reportero, proteína verde fluorescente (GFP), interacción planta-endófito.

INTRODUCCIÓN

LA AGRICULTURA SE DESARROLLA EN un entorno dinámico en el que es natural la incidencia de factores que limitan el buen desempeño de los cultivos. Por este motivo, la investigación en diferentes áreas involucradas con la actividad agrícola se ha encaminado en la búsqueda de herramientas que permitan obtener los mejores beneficios, tratando de reducir al máximo los efectos nocivos que presenta un ecosistema constantemente intervenido. Hasta la fecha la protección de cultivos se ha enfocado en los productos de síntesis química; aunque se hacen grandes esfuerzos en la búsqueda de alternativas menos agresivas con el ambiente, las soluciones hasta ahora planteadas en muchos casos resultan ser controversiales. Sin embargo, puede que la solución se haya estado gestando por siglos de forma natural a partir de las interacciones entre organismos, tal es el caso de los hongos endófitos.

Estos son hongos filamentosos inherentes a las plantas que les sirven de hospedero con las cuales establecen una asociación específica que genera mutuos beneficios. Existen un sinnúmero de especies vegetales de importancia eco-

nómica que interactúan con especies de hongos caracterizados como endófitos, entre ellas se pueden resaltar la interacción del cacao (*Theobroma cacao*) con los hongos *Heisteria concinna* y *Ouratea lucens* (Arnold *et al.*, 2003); recientemente se aislaron la misma planta más de 800 hongos endófitos con alto potencial biocontrolador (Crozier *et al.*, 2006). Otro ejemplo es el hongo *Guignardia citricarpa* encontrado en varias especies de cítricos (Glienke-Blanco *et al.*, 2002).

Las gramíneas forrajeras son quizás el grupo vegetal en el que más se ha reportado la presencia de hongos endófitos, asociados a los géneros *Lolium*, *Festuca* y *Brachiaria*. Los endosimbiontes de muchas de las especies de endófitos con frecuencia son agrupados en la tribu Balansiae de la familia Clavicipitaceae, cuyos géneros más representativos son *Balansiosis*, *Atkinsonella*, *Myriogenospora*, *Balancia*, *Epichlœ* (Siegel *et al.*, 1987), *Neotyphodium* y *Acremonium*. En este último género resalta la especie *Acremonium implicatum* (J. Gilman y E.V. Abott), la cual se relaciona con algunas especies del género *Brachiaria*. Este endófito fue aislado de la accesión CIAT 6780 del pasto *Brachiaria brizantha* en el laboratorio del Programa de Patología de

Forrajes del Centro Interamericano de Agricultura Tropical -CIAT-.

La interacción planta-endofito se identifica por su carácter asintomático; la planta provee al hongo alimento, hospedaje y protección. Por su parte, aunque se desconoce con certeza el mecanismo de acción, se ha reportado ampliamente que los endófitos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas de tipo abiótico entre las que se pueden mencionar, mayor tolerancia a la sequía y al estrés oxidativo (Zhang y Nan, 2006), tolerancia a suelos ácidos con altos contenidos de Zn y Al, y tolerancia al estrés salino, entre otras (Zaurov *et al.*, 2001; Monnet *et al.*, 2001; Waller *et al.*, 2005). De igual manera la interacción puede reducir el impacto negativo causado por factores bióticos como insectos herbívoros (Schardl y Phillips, 1997; Bourassa *et al.*, 2006) y ácaros que causan importantes pérdidas en los cultivos de cítricos del mundo (Paz *et al.*, 2006).

Entre los beneficios más estudiados de los endófitos se encuentra la capacidad que inducen en el hospedero, mediante la producción de metabolitos secundarios como los alcaloides, de mitigar el efecto de otros hongos causales de enfermedad, como es el caso de *Dechslera sp.* en el pasto *Brachiaria* (Kelemu *et al.* 2001). Se ha reportado recientemente que la relación planta-endófito es tan fuerte que puede llegar a estar involucrada en la resistencia sistémica inducida (Waller *et al.*, 2005). Todos estos mecanismos conducen a una mayor habilidad competitiva en las plantas pues le permiten expresar su máximo potencial genético, exhibir altas tasas de germinación, mayor densidad, más biomasa en los tejidos y mejor producción de semilla, en comparación con las plantas libres de endófitos (Vila-Aiub *et al.*, 2003).

Aunque es claro el valor que presentan los endófitos, surge la pregunta ¿por qué no se ha generalizado el uso de esta estrategia para mejorar las condiciones de los cultivos? Un factor limitante tiene que ver con el tipo de reproducción, pues los endófitos se transmiten de manera vertical, de madre a hija por medio de semillas (Selosse y Schardl, 2006); si las condiciones ambientales son desfavorables el micelio muere antes de alcanzar las inflorescencias e impide que

el simbionte se establezca satisfactoriamente en las semillas, de esta manera se ve reducida la posibilidad de diseminación hasta en 25%. Otro factor que limita la implementación de esta herramienta, especialmente en los países en vía de desarrollo, es la falta de investigación y entendimiento de estos microorganismos, ya que actualmente se prioriza el uso de los recursos para la investigación en temas que generan soluciones a corto plazo, dejando de lado el potencial con que cuentan estos microorganismos y sus interacciones.

UTILIZACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Una forma de aprovechar los hongos endófitos consiste en desarrollar métodos eficientes que faciliten la investigación en este campo. Hasta la fecha los procesos de detección e identificación se limitaban a técnicas dispendiosas como la tinción del micelio, la decoloración del tejido vegetal o el cultivo *in-vitro*, lo que consume mucho tiempo y, con frecuencia, no permite lograr los resultados esperados. Hace algunos años

se han venido implementado técnicas moleculares que han dado lugar a avances considerables. Kelemu *et al.* (2003) desarrollaron un sistema de detección del endófito *A. implicatum* al interior de los tejidos del pasto *Brachiaria*, mediante el uso de la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que ha facilitado la investigación de dicha interacción.

Uno de los avances más significativos para el estudio del sistema *Brachiaria-A. implicatum* se alcanzó recientemente al lograrse la transformación del endófito con el gen reportero mejorado de la proteína verde fluorescente -EGFP- (del inglés, *enhanced green fluorescent protein*). Este gen, que fue clonado de la medusa *Aequorea victoria*, codifica una proteína verde fluorescente (GFP) de 27 kDa que absorbe luz UV entre los 395 y 475 nm y emite fluorescencia a un máximo de 508 nm (Prasher *et al.*, 1992). La proteína ha demostrado ser un exitoso reportero, ya que sólo requiere de luz UV o luz azul en presencia de oxígeno para su observación, sin recurrir a ningún cofactor o sustrato, como es el caso de otros reporteros moleculares (Figura 1).

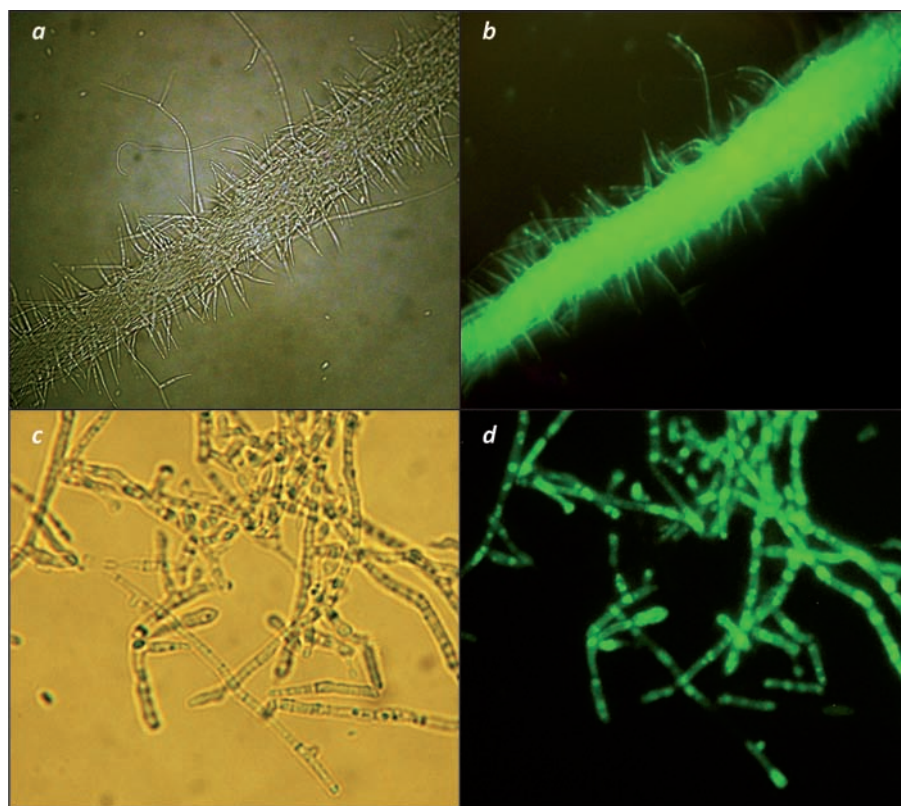


Figura 1. Estructuras del hongo endófito *Acremonium implicatum* 6780 201v transformado con el gen EGFP, observadas a un aumento de 40 X: a) y c) microscopía de luz en campo claro. b) y d) microscopía de fluorescencia en campo oscuro. Se observan micelios del hongo sometidos a luz ultravioleta y con el uso de un filtro Leica H3[®] con un rango de luz UV entre 420 y 490 nm.

Este gen y sus derivados han podido ser expresados en un amplio rango de organismos: plantas, hongos, levaduras y bacterias. Así mismo, se han conseguido aislamientos de hongos transgénicos que expresan GFP, que han sido empleados para analizar la interacción y el desarrollo de hongo patógenos de plantas.

Recientemente se amplió la gama de colores de la fluorescencia mediante la inserción de mutagénesis; así mismo, se obtuvo una mejor emisión del color verde original de la proteína. Estos genes, que ahora son ampliamente utilizados en la investigación biológica, también pueden implementarse como marcadores de proteínas celulares, a manera de reporteros, para monitorear la actividad de promotores o como marcadores para visualizar niveles específicos de tejidos, células u organelos. También han sido utilizados en la localización de proteínas y el monitoreo de la expresión genética.

CONCLUSIONES

Este trabajo proporciona grandes posibilidades para el estudio de la interacción planta-endófito; así mismo, permite explorar el uso potencial de los hongos endófitos como un sistema alternativo de expresión de genes en dicha interacción, proponiendo otra vía para accionar genes que confieran resistencia a plagas y enfermedades sin recurrir al uso de plantas transgénicas. En los hospederos, los endófitos transgénicos pueden ser usados como vehículo para la producción y entrega de productos generados a partir de genes de interés agronómico, cumpliendo funciones protectoras y proporcionando otras ventajas que se reflejen en una productividad mayor de la planta. Adicionalmente, se buscó explotar la calidad de la proteína GFP como indicador reportero para estudiar las interacciones entre *A. implicatum* y su hospedero *Brachiaria*.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Arnold, A., L. Mejía, D. Kylló, E. Rojas, Z. Maynard, N. Robins y E. Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* 100: (26) 15649-15654.
- Bourassa S., J. Brodeur y Y. Carrière. 2006. Endophyte-grass complexes and the relationship between feeding preference and performance in a grass herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. En prensa.
- Crozier J., S. Thomas, M. Aime, H. Evans y K. Holmes. 2006. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*. 55: 783-791.
- Glienke-Blanco, C., C. Aguilar-Vildoso, M. Carneiro, P. Vianna y J. Azevedo. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolates from citrus plant. *Genetic and Molecular Biology*. 25 (2): 251-255.
- Kelemu, S., H. Dongyi, H. Guixiut Y Y. Takayama. 2003. Detecting and differentiating *Acremonium implicatum*: developing a PCR-based method an endophytic fungus associated with the genus *Brachiaria*. *Molecular Plant Pathology*. 4(2): 115- 118.
- Kelemu, S., J. White Jr., F. Muñoz y Y. Takayama. 2001. An endophyte of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*: isolating, identifying, and characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties. *Canadian Journal Microbiology*. 47: 55-62.
- Monnet F., N. Vaillant, A. Hitmi, A. Coudret y H. Sallanon. 2001. Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*. *Physiologia Plantarum* 113: 557-563.
- Paz, Z., S. Burdman, U. Gerson y A. Szejnberg. 2006. Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. *Journal of Applied Microbiology*. Online Early Articles. Accepted.
- Prasher, D., V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast y M. Cormier. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111(2): 229-233.
- Selosse, M. y C. Schardl. 2006. Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist*. En prensa.
- Siegel, M.R., G.C.M. Latch y M.C. Johnson. 1987. Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopath.* 25: 293-315.
- Vila-Aiub M.M., M. Martínez-Ghersa y C. Ghersa. 2003. Evolution of herbicide resistance in weeds: vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities. *Evolutionary Ecology* 17: 441-456.
- Waller F., B. Achatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Hückelhoven, C. Neumann, D. Wettstein, P. Franken y K. Kogel. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* 102 (38): 13386-13391.
- Zaurov D., S. Bonos, J. Murphy, M. Richardson y F. Belanger. 2001. Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. *Crop Science*. 41:1981-1984.
- Zhang Y. y Z. Nan. 2006. Growth and anti-oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability. *Journal Agronomy and Crop Science*. Online Early Articles. Accepted.