



Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia

Catalina Salgado Salazar y María Caridad Cepero de García

Centro de Investigaciones Microbiológicas CIMIC, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Resumen Se determinó la existencia de la micobiota endofítica asociada a plantas de rosa (*Rosa hybrida*). Los hongos endofitos se aislaron en agar MPY a partir de hojas sanas de diez plantas de rosas ornamentales de jardines de casas particulares. De esta selección se sembraron un total de 560 fragmentos de hojas, 56 por muestra. El 16,4% de los fragmentos presentaron colonización por hongos endofitos. Se encontraron 41 aislamientos que fueron descritos como micelio estéril, ya que no presentaron estructuras de reproducción que permitieran su identificación; de un total de 92 aislamientos, 31 se identificaron hasta género o especie y 20 no pudieron ser identificados. Los hongos endofitos más aislados fueron *Nigrospora oryzae*, *Xylaria* spp, *Aureobasidium* spp y *Acremonium*. Los hongos *Nodulisporium* sp, *Gliocladium virens*, *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp, *Phoma* sp y *Chaetomium globosum* se aislaron una única vez cada uno. Dado que los hongos endofitos son reconocidos por su capacidad de producir metabolitos con actividad biológica se plantea la posibilidad de que los microorganismos encontrados en este estudio posean cierto potencial como antagonistas de patógenos que atacan a las rosas.

Palabras clave Endofito, *Rosa* sp

Endophytic fungi in rose (*Rosa hybrida*) in Bogota, Colombia

Summary We have investigated the presence of endophytic fungi associated with rose plants (*Rosa hybrida*) in Colombia. Endophytic fungi were isolated from healthy leaves of ten ornamental rose's plants from gardens cultured in malt extract, peptone, yeast extract agar plates (MPY). We sampled 560 leaves fragments, 56 per sample. Endophytic fungi comprised 92 isolates (16,4%); of these isolates 41 were classified as sterile mycelium (without reproductive structures that allowed their identification) 31 isolates were identified to genus or to species, and 20 isolates could not be identified at all. The identified endophytic fungi were as follow: *Nigrospora oryzae*, *Aureobasidium* spp, *Acremonium* spp. The fungi *Nodulisporium* sp, *Gliocladium virens*, *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp, *Phoma* sp and *Chaetomium globosum* were represented by one isolate each. Since the endophytic fungi are known for their capacity to produce metabolites with biological activity, it is possible that the microorganisms found in this study have potential as antagonist of rose pathogens.

Key words Endophytic fungi, *Rosa* sp

Dirección para correspondencia:

Catalina Salgado Salazar
Centro de Investigaciones Microbiológicas CIMIC
Departamento de Ciencias Biológicas
Universidad de los Andes
Carrera 1 No 18^a-10
Bogotá, Colombia
Tel.: +57 1 3394949; ext. 2768
Correo electrónico: cat-salg@uniandes.edu.co

Aceptado para publicación el 15 de febrero de 2005

Los hongos endofitos son organismos que viven en asociación con plantas en la mayor parte o en todo su ciclo de vida, y se encuentran en las hojas y los tallos de muchas plantas. Son simbioses, no producen síntomas de enfermedad en la planta, aunque algunas veces pueden presentar un grado de patogenicidad leve, estando relacionados taxonómicamente con los hongos fitopatógenos [5]. Viven en los espacios intercelulares y, algunas veces, intracelularmente en hojas, tallos y flores, absorbiendo nutrientes de la planta. En algunos casos, los hongos endofitos confieren beneficios a la planta que pueden resultar mutuos: utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y ésta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen [2]. En gramíneas se ha demostrado que brindan resistencia a herbívoros mediante la producción de metabolitos secundarios que resultan tóxicos o reducen la palatabilidad para los organismos que las consumen (insectos, mamíferos) [5]. En plantas no gramíneas, aunque los hongos endofitos no se han relacionado con un incremento en la resistencia a la herbivoría, en ocasiones pueden reducir la incidencia y proteger a las plantas de infecciones causadas por microorganismos patógenos [1,9]; aunque muchos de ellos producen diversos metabolitos secundarios bioactivos, aún no se ha esclarecido su función exacta dentro de las plantas [16,17].

Debido a la capacidad de algunos endofitos para producir metabolitos secundarios bioactivos nos propusimos determinar la presencia de hongos endofitos en plantas de *Rosa hybrida* mediante el uso de técnicas convencionales de aislamiento e identificación, con el fin de evaluar posteriormente dichos aislamientos en pruebas de antagonismo contra fitopatógenos de rosas de corte.

Materiales y métodos

Recolección de material y aislamiento de hongos endofitos. Las áreas de muestreo fueron dos zonas en el sector urbano de Bogotá (Colombia), zona nororiental y noroccidental durante septiembre y noviembre de 2003. Se recolectaron hojas de diez plantas de jardín del género *Rosa* (*Rosa hybrida*), no tratadas con fungicidas, maduras (≥ 2 años), sanas, sin sintomatología de enfermedades causadas por hongos, para determinar la presencia de hongos

endofitos. De cada planta de rosa se tomaron seis hojas que se almacenaron a 4 °C y se procesaron dentro de las 48 h siguientes. La esterilización superficial se realizó por inmersión consecutiva durante 1 min en alcohol 70% (v/v), 3 min en hipoclorito de sodio 0,8%, 1 min en alcohol 70% (v/v) y cinco lavados de 1 min cada uno con agua destilada estéril. La efectividad del proceso de esterilización superficial se comprobó mediante impresión del tejido sobre medio de cultivo con antibiótico antibacteriano [14]. Después de la esterilización, el material se cortó en secciones pequeñas (3-5 mm²) entre la nervadura central y el borde de la hoja y se sembró en agar MPY (agar 1,5%, extracto de malta 2%, extracto de levadura 0,5%, peptona 1%) con antibiótico (cloranfenicol 500 mg/l). Se sembraron cajas de Petri con cinco a seis subfragmentos de hoja para un total de 56 subfragmentos por planta, esto es 560 subfragmentos en total.

Todo el material se incubó a 27-28 °C en oscuridad durante 30 días. Cada colonia se transfirió a medio fresco para facilitar la identificación. Posteriormente, para inducir esporulación se cultivaron en seis medios diferentes: agar jugo V8, agar avena, agar extracto de malta, agar extracto de malta enriquecido, agar patata dextrosa y agar hojas de rosa. La identificación de los aislamientos se realizó mediante métodos convencionales utilizando claves taxonómicas [3,4,7,12,18,19]. Aquellas colonias que no esporularon tras la incubación en los diferentes medios de cultivo durante 30 días se clasificaron como micelio estéril.

Resultados

De los 560 subfragmentos sembrados, 92 (16,4%) presentaron colonización por hongos endofitos (Tabla 1). Cada subfragmento de hoja colonizado presentó un solo aislamiento. Las colonias crecieron en las cajas de Petri a partir del tercer día hasta el día 30, después de este tiempo no se presentaron nuevos aislamientos. De los hongos endofitos aislados, 41 presentaron micelio estéril, 31 aislamientos se identificaron hasta género o especie y 20 no pudieron ser identificados. Entre los hongos identificados *Nigrospora oryzae* y *Xylaria* sp fueron los que presentaron mayor número de aislamientos, cuatro cada uno. *Xylaria* sp

Tabla 1. Especies y número de aislamientos de hongos endofitos de *Rosa hybrida*.

Taxón	Muestra n°									
	R1*	R2*	R3*	R4*	R5+	R6+	R7+	R8+	R9+	R10+
Acremonium sp 1				2						
Acremonium sp 2				1						
Alternaria sp					1					
Aureobasidium spp		1		1	1	1	1	1		
Cladosporium sp				1						
Chaetomium globosum Kunze ex Steud			1							
Gliocladium virens Miller, Giddens & Foster									1	
Nigrospora oryzae (Berk. & Br.) Petch			1				2	1	1	
Nodulisporium sp						1				
Phoma sp				1						
Xylaria sp 1									2	
Xylaria sp 2						1				
Xylaria sp 3					1					
Coelomycete										7
Micelio Estéril	1	2		3	5	7	4	2	10	7
Hongos no identificados										20
Número de fragmentos colonizados	1	3	2	9	8	10	7	4	14	34
Porcentaje de colonización (Total: 16,4)	0,2	0,5	0,4	1,6	1,4	1,8	1,3	0,7	2,6	6,0

*: Muestra tomada en la zona nororiental

+: Muestra tomada en la zona noroccidental (zona urbana de Bogotá DC, Colombia)

presentó tres morfotipos, clasificados de acuerdo al color de la colonia y apariencia de los estromas, mientras que *Acremonium* spp presentó tres aislamientos, todos correspondientes a una sola muestra (Tabla 1).

En este estudio se encontraron seis aislamientos con características morfológicas de colonia similares a *Aureobasidium* spp. Dichos aislamientos están por confirmar, debido a que las estructuras características usadas para su identificación no se observaron. *Alternaria* sp, *Chaetomium globosum*, *Nodulisporium* sp, *Phoma* sp, *Gliocladium virens* y *Cladosporium* sp fueron hongos endofitos que se presentaron con un solo aislamiento (Tabla 1).

Discusión

Los hongos aislados en este estudio han sido encontrados como hongos endofitos en gran variedad de especies vegetales, incluyendo géneros pertenecientes a la misma familia del género *Rosa*, como los género *Prunus* y *Rubus* [15,20]. *Alternaria*, *Chaetomium globosum*, *Phoma* sp, *Gliocladium virens*, *Cladosporium* sp y *Nodulisporium* sp se han descrito como aislamientos endofíticos de baja frecuencia [10].

Los hongos que produjeron micelio estéril no se agruparon por características macroscópicas de la colonia o morfotipos, ya que microscópicamente se observaron diferencias en el ancho de la hifa y color del pigmento que difunde al medio. Debido a esto, sería importante realizar identificaciones taxonómicas basadas en pruebas moleculares usando secuencias del ADN [8].

El bajo número de aislamientos obtenidos comparado con otros estudios realizados en plantas de diferentes géneros y familias [1,5,10,15] pudo deberse a las características propias de las plantas estudiadas, como son el hecho de no ser nativas y ubicarse en este caso particular en la ciudad de Bogotá DC, un área que está completamente urbanizada, con contaminación atmosférica. Además, los jardines muestreados son pequeños, menores de 10 m², siendo áreas poco ideales para su crecimiento e

interacción con otro tipo de organismos. Lo que más llama la atención de estos resultados es el hecho de que, aún bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se hayan encontrado hongos endofitos asociados a plantas de rosas, lo que sugiere que esta asociación puede encontrarse en ambientes no propicios y que los microorganismos involucrados pueden tener mayor capacidad de subsistir y de interactuar con sus plantas hospedadas y con su entorno.

Puesto que se conoce la capacidad de algunos endofitos para producir metabolitos secundarios bioactivos, nos planteamos para estudios posteriores evaluar su actividad contra diferentes patógenos de rosas, ya sean de origen fúngico, bacteriano o vírico [11]. En Colombia muchos de estos patógenos son causa de pérdidas económicas debido a la reducción en la producción de rosas de corte. Estos patógenos se controlan normalmente con plaguicidas químicos, pero con poca eficacia pues existe un aumento de la resistencia en las plagas, se elevan los costes de producción y originan un gran impacto ambiental por la acumulación de estos compuestos en suelos y corrientes de aguas. Es urgente poder encontrar alternativas biológicas para el control de las plagas que afectan a estos cultivos.

Los hongos endofitos reportados en este estudio pueden tener potencial para ser utilizados en el futuro en pruebas de antagonismo contra fitopatógenos ya que, en otros estudios, han resultado positivas las pruebas para determinar la presencia de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y antifúngica y pueden reducir la incidencia y proteger a las plantas de infecciones causadas por microorganismos patógenos [1,6,13].

Las autoras del artículo expresan sus agradecimientos al Fondo de Investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes por la financiación de este proyecto y al Centro de Investigaciones Microbiológicas, CIMIC, donde se llevó a cabo esta investigación.

Bibliografía

1. Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas IE, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15649-15654.
2. Bacon CW, Hinton DM. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. En: Hurts CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (Eds.) *Manual of Environmental Microbiology*. Washington, ASM Press, 1997: 413-425.
3. Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, APS Press, 1998.
4. Carmichael JW, Kendrick WB, Connors IL, Sigler L. *Genera of Hyphomycetes*. Edmonton, The University of Alberta Press, 1980.
5. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988; 69: 2-9.
6. Chang HL, Wong XZ, Hong L, Ren XT. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *J Biotechnol* 2001; 88: 277-282.
7. Domsch KH, Gams W, Anderson TH. *Compendium of soil fungi Volume I, II*. Braunschweig, IHW-Verlag, 1993.
8. Dong L, Hyde KD, Liew EY. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2001; 20: 1-13.
9. Faeth SH, Fagan F. Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualist. *Integr Comp Biol* 2002; 42: 360-368.
10. Ferreira K, Samuels GA. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycol Res* 1990; 6: 827-830.
11. Horst K. *Compendium of rose diseases*. St. Paul, APS Press, 1983.
12. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. *Introduction to food and airborne fungi*. AD Utrecht, CBS, 2002.
13. Schulz B, Römnert AK, Dammann U, Aust HJ, Strack D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycol Res* 1999; 103: 1275-1283.
14. Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HJ. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: Effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol Res* 1993; 12: 1447-1450.
15. Shamoun SF, Sieber TN. Colonization of leaves and twigs of *Rubus parviflorus* and *R. spectabilis* by endophytic fungi in a reforestation site in British Columbia. *Mycol Res* 2000; 104: 841-844.
16. Strobel GA. Endophytes as source of bioactive products. *Microbes Infect* 2003; 5: 535-544.
17. Strobel GA. Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol* 2002; 22: 315-333.
18. Ulloa M, Hanlin RT. *Illustrated dictionary of mycology*. St. Paul, APS Press, 2000.
19. Von Arx JA. *The genera of fungi sporulating in pure culture* (3rd ed.). Vaduz, J Cramer, 1981.
20. Wu W, Sutton BC, Gange AC. *Dactylaria endophytica* sp. nov., an endophyte from leaves of *Prunus lusitanica*. *Mycol Res* 1996; 100: 524-526.