Primeras Jornadas de transferencia de I+D+i para una Producción Sostenible del Plátano en las RUPs

ICIA - Valle de Guerra – 19 octubre de 2010

HONGOS ENDÓFITOS EN PLATANERA

R. Cabrera

Unid. FITOPATOLOGÍA, FACULTAD DE BIOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n. 38206. LA LAGUNA. TENERIFE. CANARIAS. ESPAÑA.

Una posible alternativa a los fitosanitarios químicos de síntesis es la utilización de los hongos endófitos, que tiene un extraordinario interés por diferentes motivos

Son hongos que viven en el interior de las plantas, de forma asintomática, y que le proporcionan al vegetal mecanismos de defensa química frente a organismos dañinos, al mismo tiempo que la planta les proporciona a ellos alimento. Se trata por tanto, de una asociación simbiótica, de gran complejidad y que debe ser considerada junto con las condiciones ambientales en las que se desarrolla la interacción (Shulz and Boyle, 2005).

Por otro lado, los hongos endófitos, se perfilan como una fuente importante de moléculas bioactivas, que podrían constituir una alternativa al empleo de productos químicos en campo (Giménez, C. et al 2007)

Adicionalmente, los hongos endófitos tienen un extraordinario interés puesto que se conocen numerosas aplicaciones en el campo de la farmacología y medicina (Gunatilaka, 2006; Ma, 2004), ya que producen sustancias químicas de gran importancia (antibióticos, …..). La facilidad de producir grandes cantidades de biomasa fúngica y sus metabolitos hace que muchas empresas farmacéuticas tengan a estos hongos entre sus líneas de investigación prioritaria

El control del picudo de la platanera se ha basado en el empleo de feromonas y en la aplicación de distintos insecticidas, nematodos y hongos entomopatógenos, con resultados generalmente poco alentadores.



El control de patógenos como *F. oxysporum* responsable del mal de Panamá, *es muy difícil*, habiéndose utilizado fungicidas o la aplicación de hongos antagonistas que compiten por la colonización de los sistemas radiculares y dificultan la entrada de los patógenos.

En este trabajo se ha realizado una búsqueda de los hongos endófitos de la platanera, para evaluar su utilidad y determinar si efectivamente estos organismos pueden ser considerados como una alternativa en campo para controlar estos problemas.

Desarrollo del trabajo

1.- PROYECTO INTERFRUTA II



2.- CONVENIO CON ASPROCAN

3.- BIOMUSA (ULL)



Se han realizado muestreos en plataneras de Tenerife y La Palma (Canarias), Madeira y Terceira (Azores)

En La Palma se localizaron dos fincas (en Tazacorte y Los Sauces) con una edad comprobada de 120 años (hay constancia de que en 1885 ya estaban sembradas de platanera y se han mantenido en producción de forma ininterrumpida desde entonces. Las edades de las fincas en Tenerife es mucho menor, puesto que no superan los 20 años. En el caso de Madeira y Terceira no hemos podido constatar la antigüedad, aunque parece ser que en ambos casos se trata de fincas de al menos 15 años.

Las plantas seleccionadas son asintomáticas, de la variedad pequeña enana, preferentemente de fincas antiguas.

Limpieza superficial del rizoma con lejía







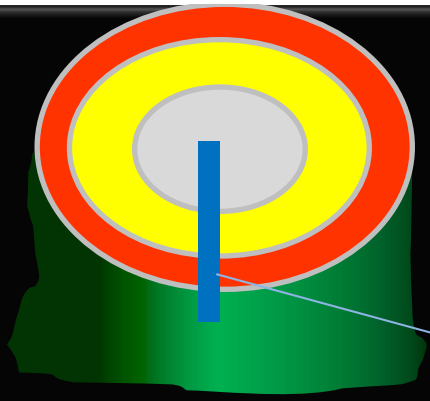
Tubos de aluminio estériles de 25 cm de longitud y 1 cm de



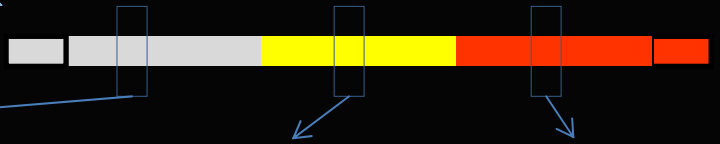


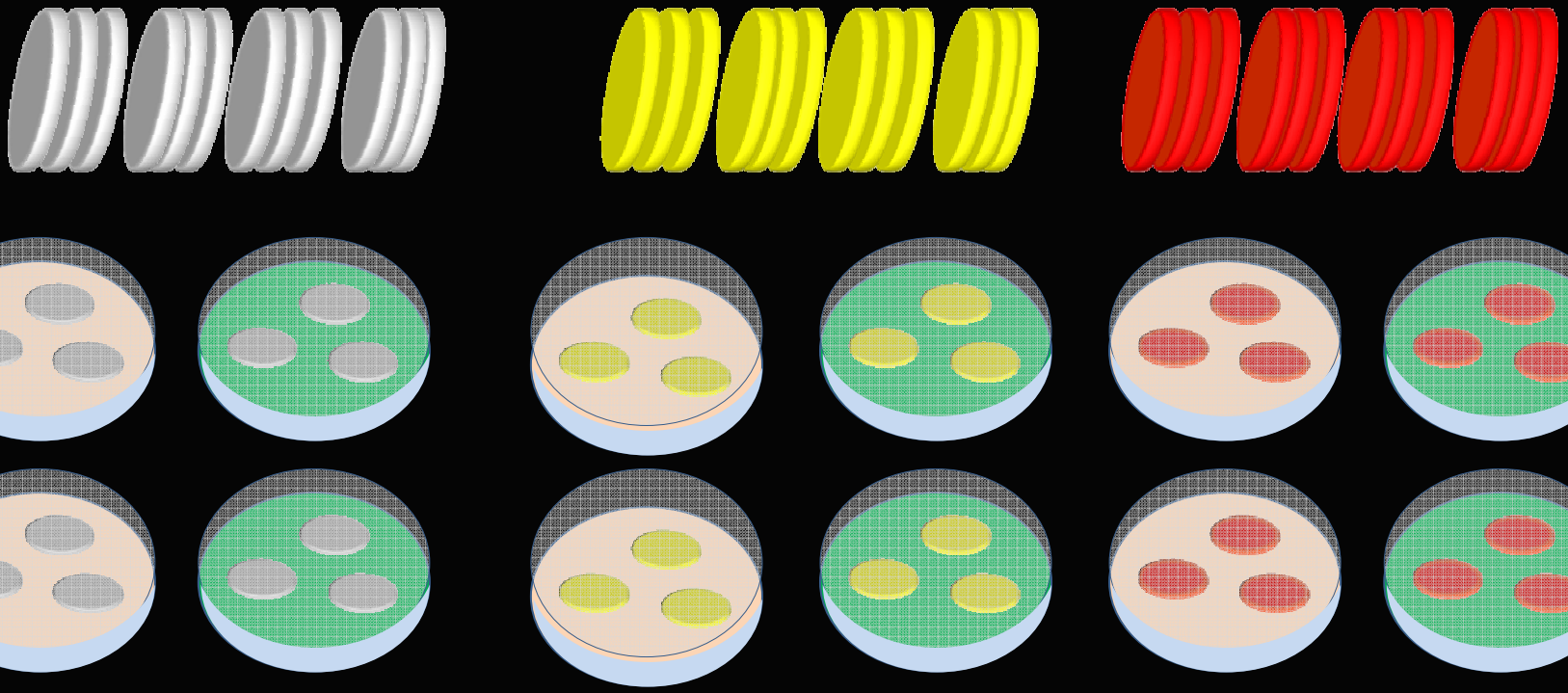
El tubo con el tejido en su interior se cierra y se lleva al laboratorio





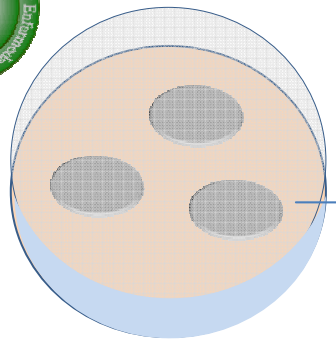
•Esterilización superficial del cilindro de tejido (Rodríguez, 1994):
•1 minuto en etanol al 75%.
•10 minutos en Hipoclorito sódico al 50%.
•30 segundos en etanol al 75%.
•Agua destilada estéril.





PDA (6 discos) YMA (6 discos) PDA (6 discos) YMA (6 discos) PDA (6 discos) YMA (6 discos)

PDA: Potato Dextrosa Agar *YMA: Yeast Malta Agar.*



Repicaje aislamiento

Incubación a 25ºC



Cultivo Puro

Identificación mediante AMPLIFICACIÓN (PCR) Y

1.- EXTRACCIÓN DEL DNA FÚNGICO: REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit, Sigma aldrich

2.- AMPLIFICACIÓN DEL DNA

PRIMERS GENERALES ITS1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC

	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94ºC	2 min 30 seg	1
Desnaturalización	94ºC	0 min 30 seg	40 ciclos
Hibridación	58ºC	0 min 30 seg	
Extensión	72ºC	1 min	
Extensión final	72ºC	10 min	1
Mantenimiento	4ºC	indefinido	

3.- PURIFICACIÓN DEL DNA Y SECUENCIACIÓN

4.- COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA CON LAS EXISTENTES EN GENE-BANK permiten la identificación de la especie

ENSAYOS DE TOXICID
(inyección en hemolinfa

Cultivo del endófito en PDA

Extracción del micelio con Etanol

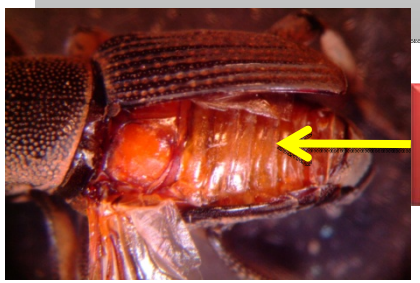
Concentración en rotavapor

Solución de trabajo: 40 mg/ml de agua

Adultos de picudo

Capturas en campo

Mantenimiento en laboratorio sobre tejidos de platanera

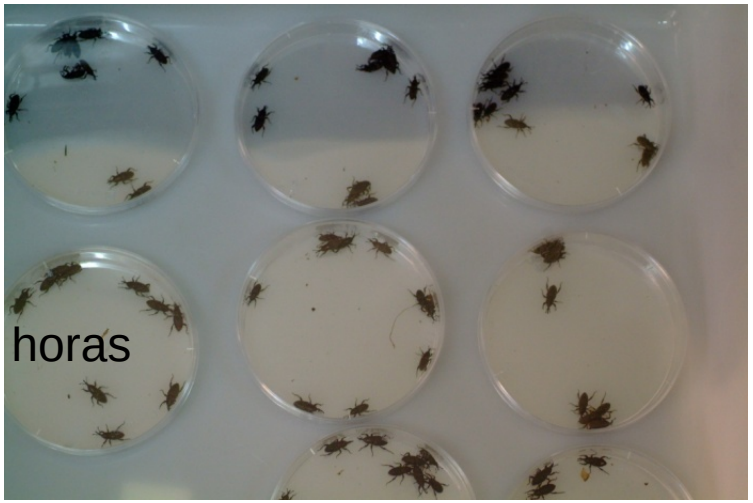


Inyección de 5 µl en la zona tergal del abdomen = 0,2 mg extracto/a

10 adultos /tratamiento

10 adultos inyectados con 5 µl de agua

10 adultos sin inyectar



Recuento de adultos muertos a las 24, 32, 48, 60 y 72 horas

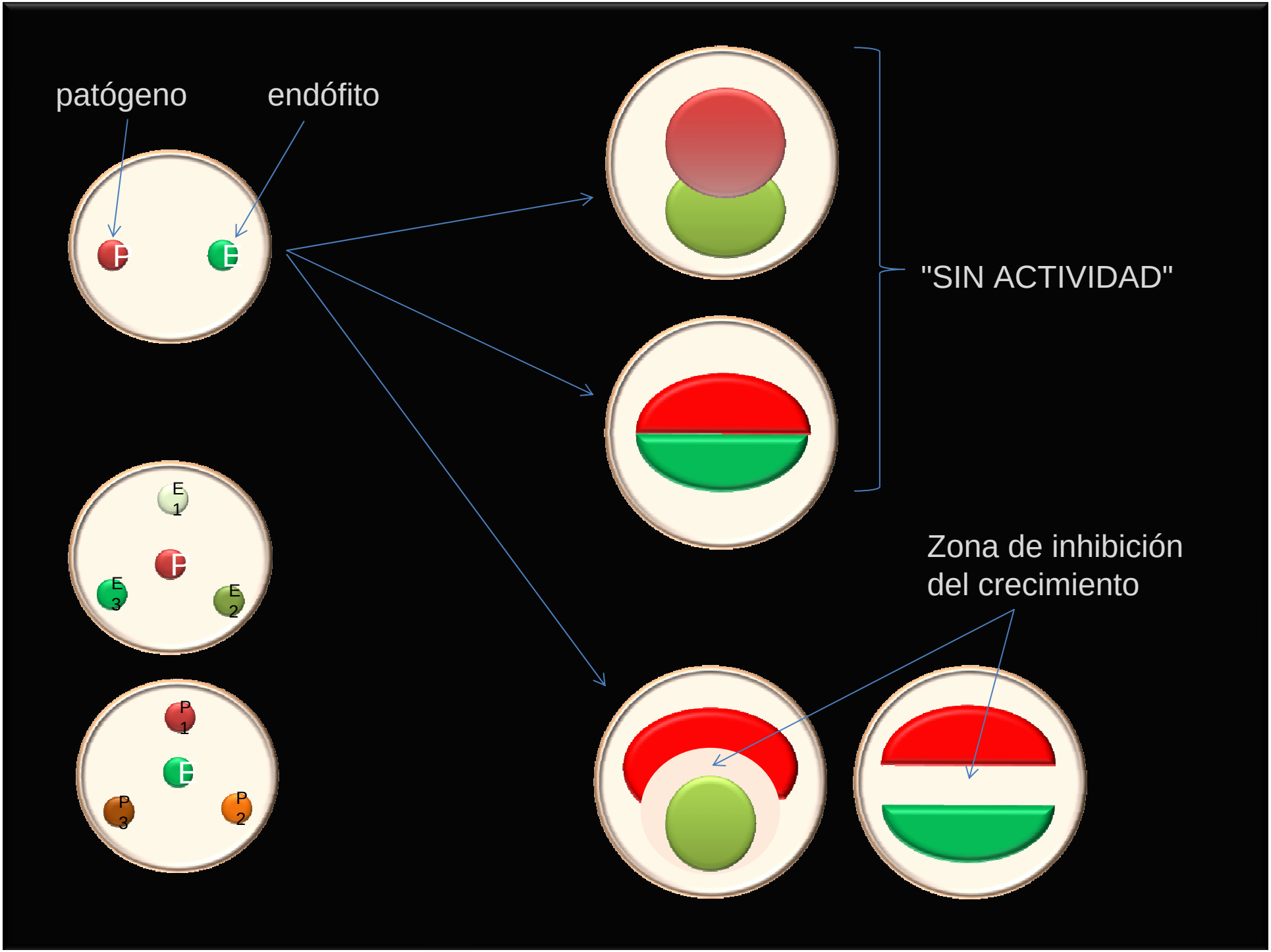
ENSAYOS DE ANTAGONISMO FRENTE A F. oxy

Se cultiva el hongo endófito aislado en placas donde se siembra también el hongo patógeno.

Cuando ambas colonias han crecido se estudia la zona de interacción, interesándonos aquellos casos donde se observa una inhibición del crecimiento del patógeno

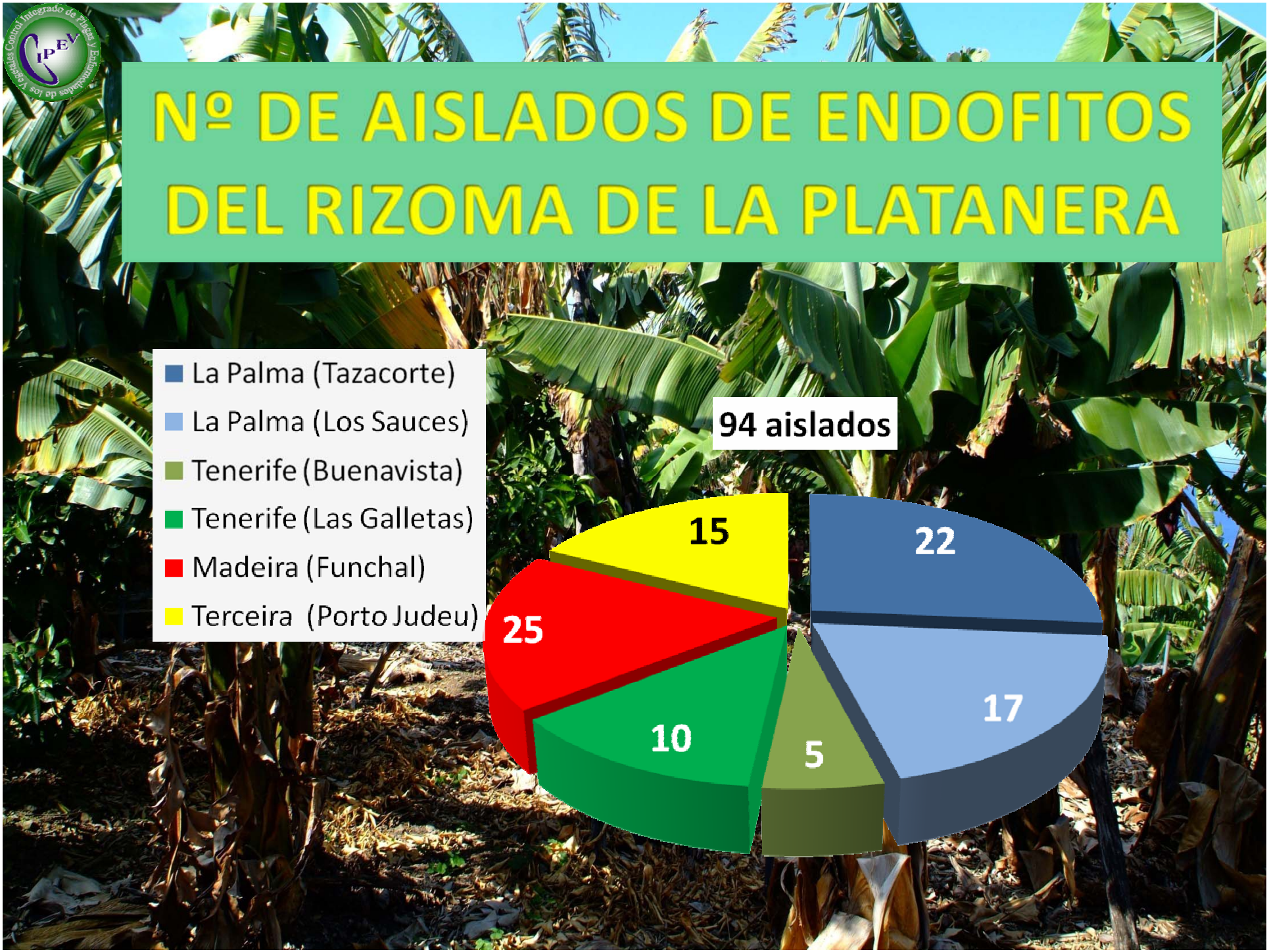
Se aíslan los metabolitos presentes en el medio de cultivo y en el hongo endófito para detectar moléculas activas frente al patógeno

Se inocula el endófito en plataneras para comprobar su inocuidad y verificar si su presencia confiere resistencia a la planta frente al patógeno


patógeno
endófito
P
E
"SIN ACTIVIDAD"
E 1
E 3
E 2
P 1
P 3
P 2
Zona de inhibición del crecimiento

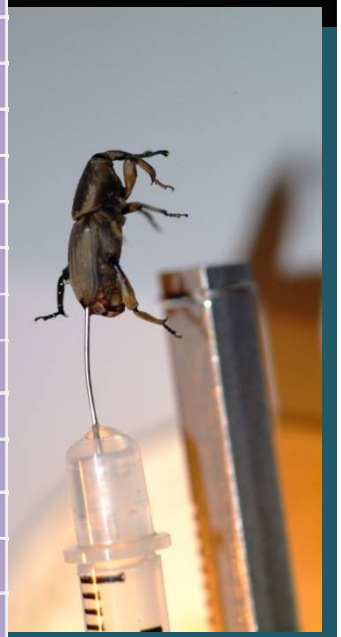

RESULTADOS

Nº DE AISLADOS DE ENDOFITOS DEL RIZOMA DE LA PLATANERA



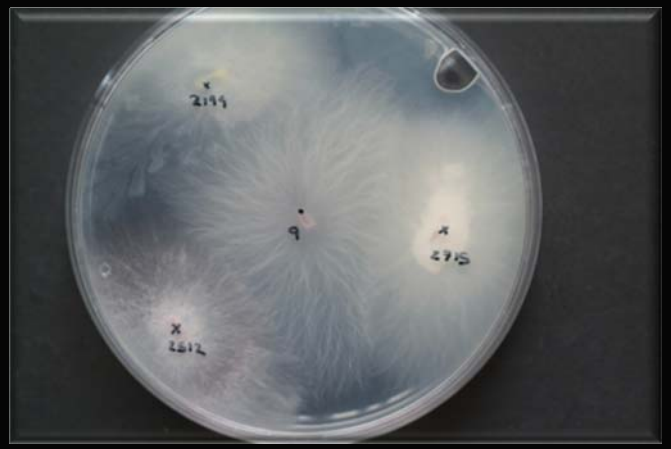
BIOENSAYO POR INYECCIÓN EN LA HEMOLINFA A TRAVÉS DE LA ZONA DORSAL DEL ABDOMEN

	Mortalidad observada				
Aislado Endófito	8 HORAS	24 HORAS	32 HORAS	48 HORAS	56 HORAS
1 (P)	2	3	5	10	-
3 (P)	1	1	6	10	-
4 (P)	**5**	**8**	**10**	-	-
5 (P)	3	3	5	7	10
10 (P)	3	3	7	10	-
11 (P)	2	3	5	7	10
12 (P)	0	2	7	10	-
16 (T)	2	3	6	10	-
21 (T)	0	3	6	8	10
26 (T)	0	2	3	6	10
28 (T)	0	0	2	3	10
32 (P)	1	4	5	8	10
34 (P)	1	3	4	6	8
35 (P)	2	4	6	9	10
36 (P)	4	5	8	10	-
37 (P)	3	5	9	10	-
38 (P)	1	3	6	9	9
39 (P)	2	2	4	10	-
40 (P)	0	2	4	10	-
41 (P)	**5**	**7**	**10**	-	-
59 (AZ)	0	3	7	7	8
60 (AZ)	**5**	**7**	**10**	-	-
69 (AZ)	0	1	4	6	10
H_2O (control)	2	2	4	5	5
Sin pinchar	0	0	1	2	3

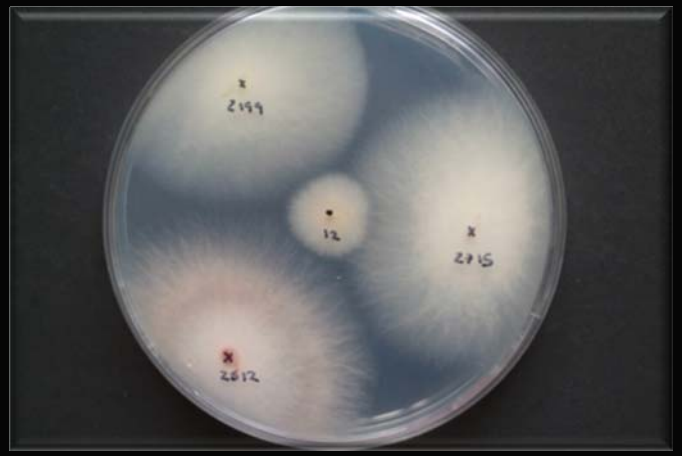


Antagonismo frente a
F. oxysporum (2715)
F. solani (2199) y
F. moniliforme(2512)

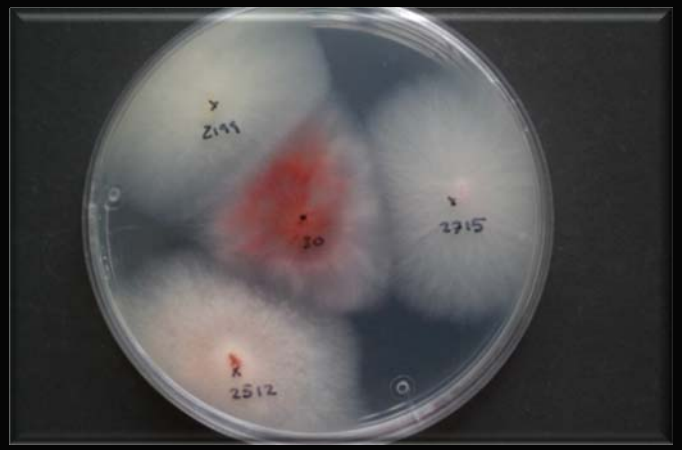
Aislado HE_9



Aislado HE_12



Aislado HE_30

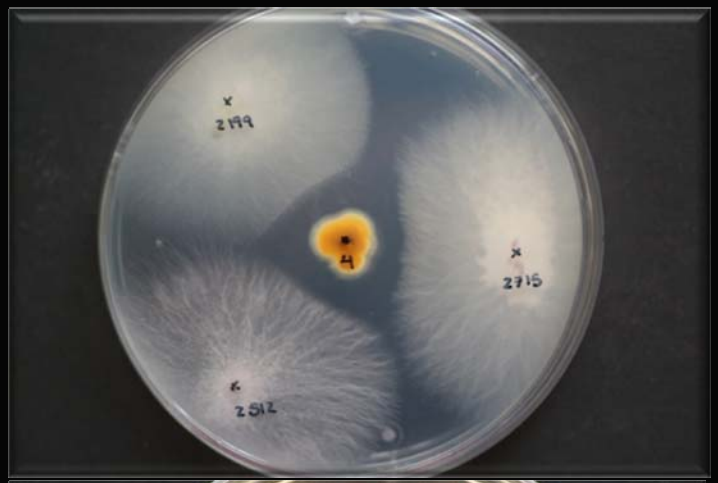


Antagonismo frente a
F. oxysporum (2715)
F. solani (2199) y
F. moniliforme(2512)

Aislado HEPC_2 (Tazacorte)



Aislado HEPC_4 (Tazacorte)



Aislado HEPC_4 (Tazacorte)



Antagonismo frente a F. oxysporum aislado de plataneras con mal de panamá

Aislado HEPA_25

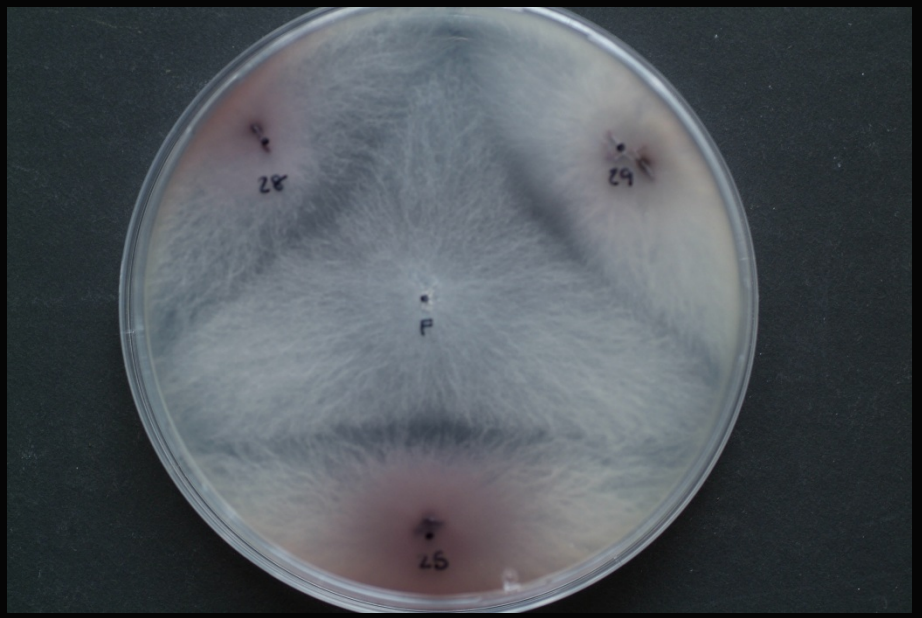
Aislado HEPA_28

Aislado HEPA_29

Aislado HEPA_32

Aislado HEPA_33

Aislado HEPA_34

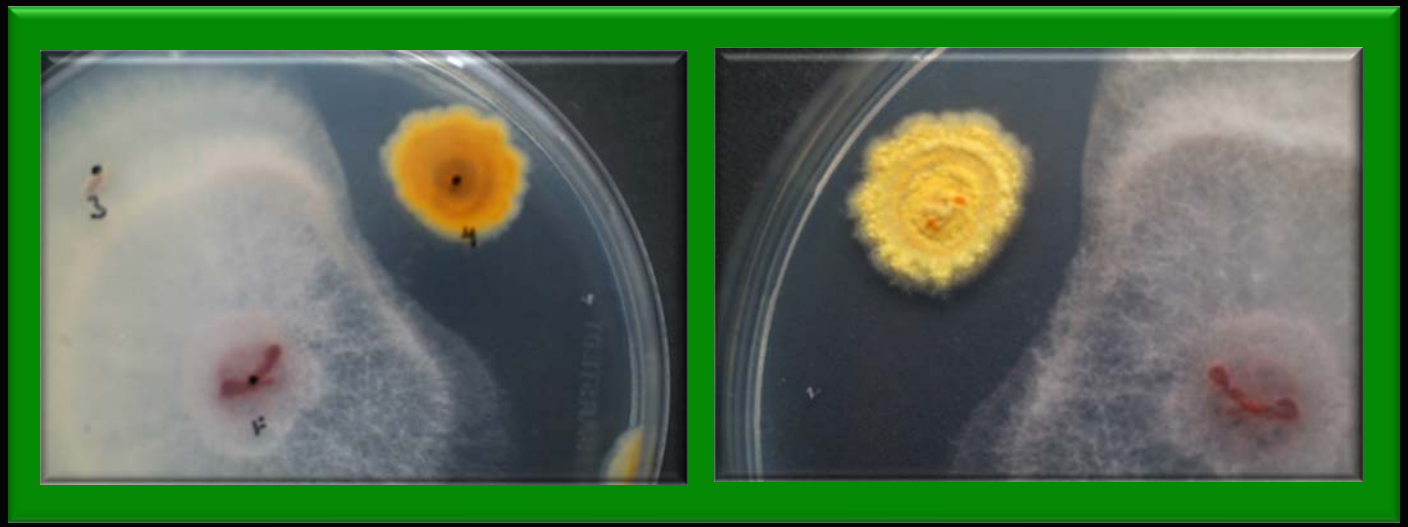




Antagonismo frente a F. oxysporum aislado de plataneras con mal de panamá



Aislado HEPC_20 (Los Sauces)



Aislado HEPC_4 (Tazacorte)

CONCLUSIONES

1.- Se han obtenido 94 aislados de hongos endófitos, probablemente pertenecientes a 53 especies (las últimas identificaciones se están concluyendo estos días)

2.- Se observa una posible correlación entre la antigüedad de la platanera muestreada y la diversidad de hongos endófitos aislados de la misma.

3.- En los ensayos de inyección de extractos fúngicos, de 21 aislados ensayados hasta el momento, **3 resultaron activos a las 32 horas**, 9 a las 48 horas y 8 a las 56 horas, con un porcentaje de actividad del 100%.

4.- **3 especies de endófitos (HEPC2, HEPC4 y HEPC20)** muestran una fuerte inhibición sobre el crecimiento en laboratorio de *Fusarium oxysporum* aislado de platanera con mal de panamá.

5.- Los próximos ensayos previstos se centrarán en ver como podemos inocular estos hongos, especialmente el **HEPC4,** en plantas sanas, evaluar su instalación e inocuidad para la platanera y evaluar el grado de protección que ofrece frente a picudo y a *f.oxysporum* responsable del mal de panamá


GRACIAS POR SU ATENCIÓN