

Hongos endófitos aislados de tejidos de platanera (*Musa acuminata*) de los archipiélagos de la región macaronésica

Grupo de Investigación CIPEV de la Universidad de La Laguna

Introducción

El principal cultivo de exportación de las Islas Canarias es el plátano que ha supuesto prosperidad en diversos ámbitos: económico, político, paisajístico, social y cultural, destacando el económico. Uno de los mayores inconvenientes de este cultivo es la pérdida de productividad debido a ciertas plagas y enfermedades que le afectan, algunos de estos patógenos son la cochinilla, araña roja, moscas blancas, trips, picudo de la platanera, nemátodos y hongos (mal de panamá, punta de cigarro y el moteado)

El control biológico de plagas y enfermedades es una herramienta interesante como estrategias de cultivo bio-racionales. En este sentido los hongos endófitos (HE) poseen un gran potencial como agentes de control biológico pues se hallan de forma natural en las plataneras, siendo factible que reduzcan plagas y enfermedades como son el picudo, los hongos vasculares y los nematodos. Además, suponen una alternativa viable para hacer frente a las cada vez más exigentes normativas de fitosanitarios de la Unión Europea. Lo comentado hasta ahora es extensivo para el archipiélago de Azores y Madeira que, al igual que Canarias, pertenecen a las Regiones Ultraperiféricas de la UE y sus cultivos están afectados por las mismas plagas y regulados por las mismas normativas.

Los microorganismos endófitos (hongos y bacterias) viven en los espacios intercelulares (apoplasto) de los tejidos vegetales pero también lo hacen en el interior de las propias células (simplasto), sin que aparentemente causen perjuicios a la planta hospedera. Entre ambos organismos se pueden establecer interacciones de mutualismo en la que los dos obtienen beneficios. En este proceso es frecuente que la planta con endófitos asociados tenga ventajas sobre la que no los presenta (por ejemplo, una mayor resistencia frente a hongos patógenos o herbívoros), con lo que pueden aumentar su biomasa y su distribución, que se traducirá, a su vez, en una mayor disponibilidad de recursos para el hongo endófito (mayor cantidad de tejido sobre el que desarrollarse).

Se han sugerido tres mecanismos principales por el que los HE restringe el crecimiento de hongos patógenos que son: antibiosis, competición y micoparasitismo; aunque también puede ser debido a la inducción de la respuestas de defensa en el hospedador, proceso denominado “resistencia sistémica inducida”. Entre todos los mecanismos mencionados, la antibiosis es considerando el mecanismo más importante, en el cual el antagonista produce una serie de metabolitos secundarios como antibióticos y toxinas, que contribuyen a la actividad supresora del hongo patógeno por parte del endófito.

Materiales y Métodos

1. Muestreo, aislamiento y caracterización de los HE

Se muestrearon distintos **cultivos de plataneras en Canarias, Azores, Madeira y Cabo Verde** en distintas épocas del año. El material vegetal se muestreó a partir de la cabeza, raíz, cormo y hojas, en este último tejido se diferenció entre lámina y nervio.

Los ejemplares a partir de los cuales se recogieron las muestras se seleccionaron teniendo en cuenta los siguientes criterios: plantas adultas y sanas con la piña de plátano formada y preparada para cortar o recién cortada. A la hora de evaluar si las plantas estaban sanas se examinaron para observar posibles síntomas externos de alguna enfermedad o plaga, en los casos en los que era posible se cortó la planta por la base para comprobar que no presentaba síntomas de mal de panamá y/o picudo.

Las muestras se **esterilizaron superficialmente** con alcohol, lejía y agua destilada estéril; se secaron en papel de filtro estéril y se cortaron con un bisturí estéril en fragmentos de aproximadamente 4mm².

Los fragmentos se colocaron en placas Petri con PDA y cloroanfenicol (50mg/L) y en placas Petri con YMA y tetraciclina (50mg/L) y se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad, cuando se observó micelio creciendo sobre el medio de cultivo, se tomaron muestras con un asa de siembra y se sembraron en placas con PDA y cloroanfenicol (50mg/L) para su posterior identificación.

Los aislados fueron **caracterizados morfológicamente** a nivel de colonia (características macroscópicas) y mediante preparaciones microscópicas para tener información a la hora de clasificarlos en morfotipos e identificarlos. Por otro lado, los HE se llevaron a secuenciar al Servicio de Genómica de La Universidad de La Laguna para **identificarlos mediante técnicas moleculares**. Toda la información sobre las muestras y los HE aislados se almacenó en una base de datos de Access diseñándose un sistema de códigos para identificar las muestras y los aislados.

Todos los aislados se **conservaron mediante diversos métodos a corto y largo plazo**. Estos se recuperarán cada cierto tiempo para comprobar su viabilidad y seleccionar el mejor método de conservación en cada caso.

2. Ensayos *in vitro*

Con el objetivo de evaluar la capacidad antagonista de los HE aislados, se realizaron **cultivos duales**, es decir cultivando cada HE enfrentado a un hongo patógeno en placas Petri con PDA. Los hongos patógenos usados como dianas fueron: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Smith) causante del mal de panamá o veta amarilla; *Botrytis cinerea* Pers. (BC), agente causal de la “podredumbre gris”; *F. moniliforme* (Sheldon), *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Scheldt) y *F. solani* (Mart), los tres últimos causantes de importantes daños y pérdidas en diversos cultivos.

Los HE: P3, P12 y P15 fueron algunos de los que mostraron capacidad de antagonismo por un mecanismo de antibiosis, es decir se formaba un halo de inhibición cuando interactuaban ambos hongos. Estos se seleccionaron para su fermentación en arroz, además el hongo codificado como P3 también fue cultivado en medio líquido PDB para estudiar las posibles diferencias entre ambos métodos de fermentación.

Una vez se obtuvo suficiente cantidad de micelio de los hongos fermentados se extrajeron con disolventes orgánicos, principalmente acetato de etilo, a continuación se concentró en un rotavapor hasta obtener un extracto sólido.

Los **ensayos de dilución en placa** se realizaron para cuantificar la capacidad de inhibición de los extractos obtenidos en el crecimiento de los hongos patógenos u organismos diana. Los hongos patógenos que se usaron en estos ensayos fueron: *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, *B. cinerea*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Alternaria alternata*. El extracto se incorpora al medio de cultivo PDA en una concentración P/V definida.

Las placas fueron incubadas en oscuridad a temperatura de 21°C durante 48 horas. En el caso de los hongos que hemos empleado como diana, este tiempo es suficiente para que las

colonias alcancen un diámetro suficiente y no lleguen a confluir unas con otras. Una vez pasado este tiempo se midió el diámetro de las colonias para evaluar el crecimiento de cada una de ellas en las distintas placas del bioensayo. Para ello, se digitalizó la imagen de cada placa y se midió el diámetro de las colonias con el programa ImageJ.

Resultados

Se obtuvieron 40 aislados de los cuales 27 ya han sido identificados mediante técnicas moleculares a nivel de género y en algunos casos a nivel de especie.

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos en los ensayos de antagonismo mediante cultivo dual, figurando aquellos HE que al interactuar con los hongos patógenos formaban una zona donde el patógeno no crecía (halo de inhibición). De estos hongos con actividad antagónica fueron fermentados los siguientes P3, P15 y P12. Los extractos de estos hongos se usaron en ensayos de dilución en placa para valorar la inhibición producida en el crecimiento de los patógenos. Los resultados de estos ensayos se cuantificaron como positivo (+) si existía una correlación dosis-respuesta, a mayor concentración del extracto menor crecimiento del hongo patógeno.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de antagonismo y de dilución en placa

HE	Antibiosis frente a / los hongo/s patógeno/s	Fermentación y extracción	Resultado de los ensayos de dilución en placa
G6	FOC + BC	-	-
P12	FOC	Fermentado en arroz y extraído con EtAc:Met	+ BC
	BC		
G10	BC	-	-
G1	BC	-	-
G12	BC	-	-
S2	FOC + FOL + FM	-	-
	BC		
P1	TODOS	-	-
P3	BC	Fermentado en arroz extraído con EtAc:Met / EtAc. Fermentado en PDB extraído con EtAc.	Ext. Con PDB + FOC
	FOC+FS+FOL+ FM		
P4	FOC + FOL	-	-
	BC+FM	-	-
P5	FS	-	-
P6	FS + BC	-	-
P7	FOC+FS	-	-
P15	TODOS	Fermentado en arroz y extraído con EtAc	+ FOC / + BC
G30	BC	-	-
P2	FOC+FOL+FM	-	-
TF2	FOC+BOC	-	-
	FS+FOL+FM		
TF5	FOC	-	-
S5	BC	-	-
S8	TODOS	-	-

FOC, *F. oxysporum* f.sp *ubense*; BC, *B. cinerea*; FS, *F. solani*; FM, *F. moniliforme*; FOL, *F. oxysporum* f.sp *lycopersici*; AA, *A. alternata*.

Conclusiones

De todos los extractos de hongos ensayados hasta el momento, dos de ellos han mostrado actividad frente a *F. oxysporum* f.sp *ubense* y otros dos frente a *B. cinerea*. El



siguiente paso será realizar ensayos *in vivo* para comprobar que los resultados obtenidos hasta ahora se repiten para el control del mal de panamá en platanera. Cabe pensar que existe un amplio campo por explorar con estos microorganismos como posibles agentes de control biológico y como fuente de metabolitos secundarios interesantes a nivel agronómico.