

PLANTAS DE CULTIVO: HONGOS ENDÓFITOS vs HONGOS FITOPATÓGENOS

Elena Martín Trujillo¹, Andreea Cosoveanu^{1*}, Yeray Cabrera Hernández¹, Gema Hernández Pérez¹, Cristina Giménez¹ y Raimundo Cabrera¹.

¹Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Universidad de La Laguna. Aptado. 456. La Laguna CP 38200. Tenerife. Islas Canarias. España.

*Autora para la correspondencia: andreeacosoveanu@gmail.com.

RESUMEN

Los hongos endófitos han sido ampliamente estudiados en los últimos tres decenios para su potencial uso en agricultura, industria y farmacia. Aunque mayoritariamente el interés en ellos les ha llevado a los investigadores en busca de residentes fúngicos de plantas medicinales, las plantas de cultivo no deberían ser infravaloradas como hospederos. Una de las cualidades más estimadas sería la protección frente a un fitopatógeno obtenida a través de control biológico. Cuando se trata del control biológico con un microorganismo, uno de los niveles primarios requeridos es el establecimiento inocuo en la propia planta a proteger. Por lo tanto, la búsqueda de hongos endófitos antagónicos provenientes de plantas de cultivo sería más interesante debido a que el riesgo de enfermedad del nuevo hospedero (en este caso el mismo) estaría disminuido. Hongos endófitos de plataneras, tomates y viña se han aislado y ensayado con el fin de probar su actividad antagónica sobre tres especies fitopatógenas: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Del hospedero *Vitis vinifera*, 40,9 % de los aislados ensayados han sido activos (inhibición del patógeno a más de 2 mm de distancia). En *Musa acuminatum* se encontraron 16,66 % de los aislados como antagónicos y de *Solanum lycopersicum* únicamente 4,34 %. Los endófitos antagónicos más activos fueron *Bionectria ochroleuca*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium spirochaete*, *Alternaria* sp., *Acremonium strictum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus versicolor*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopycnis vagum*.

Palabras clave: Hongos endófitos, Platanera, Tomate, Vid.

CULTIVATION PLANTS: ENDOPHYTUS FUNGI vs PHYTOPATHOGEN FUNGI

ABSTRACT

Endophytic fungi have been widely studied in the last three decades for their potential use in agriculture, industry and pharmacy. Although the most interest in relation to them has led researchers to search for fungal residents of medicinal plants, crop plants should not be undervalued as hosts. One of the most esteemed qualities would be the protection in front of a phytopathogen, obtained through a biological control. When it is a biological control with a microorganism, one of the required primary levels is the innocuous establishment in the protected plant. Therefore, the search for antagonistic endophytic fungi from cultivation plants would be more interesting because the new host risk (the same in this case) would be reduced. Banana trees, tomatoes, and vineyard Endophytic fungi have been isolated and tested in order to prove their antagonistic

activity in relation to three phytopathogenic species: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. From *Vitis vinifera* host, 40,9 % tested isolated have been active (pathogen inhibition to more than 2 mm away). In *Musa acuminatum*, 16,66 % isolated were found as antagonistic and only 4,34 % of *Solanum lycopersicum*. The most active antagonistic endophytes were *Bionectria ochroleuca*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium spirochaete*, *Alternaria* sp., *Acremonium strictum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus versicolor*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizopycnis vagum*.

Keywords: Endophytic fungi, banana, tomatoes, vineyard.

INTRODUCCIÓN

Desde 1960, el manejo de las plagas y enfermedades en los países industrializados ha sido basado en pesticidas químicos de síntesis. No obstante, el uso de los pesticidas sintéticos ha llegado a ser más y más difícil debido a varios factores. Es un requerimiento urgente encontrar tácticas alternativas que hagan más sostenible la protección de los cultivos.

Los hongos endófitos son una fuente de nuevas drogas y los metabolitos pertenecen a varios grupos químicos como fenoles, esteroides, flavonoides, quinones, terpenos, xantonos, alcaloides e isocumarinas.

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es uno de los cultivos más importantes del mundo, el cual sufre importantes pérdidas por plagas y enfermedades. Para el control de enfermedades de este cultivo se han utilizado microorganismos y extractos con distinto éxito, y la búsqueda continua de forma activa. Por ejemplo, se han probado sustancias volátiles de origen fúngico contra *Botrytis cinerea* (Li *et al.*, 2012). Los hongos endófitos han sido investigados, pueden aumentar la defensa del tomate frente a razas de *Verticillium dahliae* (Shittu *et al.*, 2009), *Rhizoctonia solani* (Goudjal *et al.*, 2014), *Fusarium oxysporum*, o *Colletotrichum gloeosporioides* (Wang *et al.*, 2012), nematodos (Singh *et al.*, 2012, 2013), insectos (Jallow *et al.*, 2004, Martinuz *et al.*, 2012; Menjivar *et al.*, 2012). En las Islas Canarias se encuentra una variedad asilvestrada de tomate (*Solanum lycopersicum*), originada a partir de variedades que fueron abandonadas hace más de cien años por otras variedades comerciales más productivas (Márquez y Quintana, 1996). El cultivo de la platanera se sitúa en cuarto lugar detrás del arroz, el trigo y el maíz. La mayor producción de plátano se sitúa en las zonas tropicales, siendo cultivado en más de 130 países lo que se traduce en una de sus principales fuentes de ingresos. En las Islas Canarias el sector platanero supone un 30 % de la producción total agraria. Dentro de las estrategias de control biológico los hongos endófitos representan una alternativa interesante para reducir el ataque de plagas y enfermedades, ya que se localizan en el interior de las plantas sin causar síntoma de enfermedad y las hacen ser resistentes ante las plagas. Plantas de platanera que han sido inoculadas con cepas no patógenas de *Fusarium oxysporum*, muestran mayor resistencia contra el picudo de la platanera (*Cosmopolites sordidus*) (Paparú *et al.*, 2009), el mal de panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) y el nematodo *Radopholus similis* (Griesbach, 2000; Pocasangre *et al.*, 2000, Sikora *et al.*, 2003).

En la actualidad la producción mundial de uva (*Vitis vinífera*) (67 067 129 toneladas) está liderada por China, con una producción de 9 600 000 t, seguida de Estados Unidos, Italia, Francia y España con 5 238 300 t (FAO, 2014). España es el país que

más hectáreas tiene dedicadas a la vid con 954 000, seguido de Francia, Italia y China. A nivel mundial, el aumento del precio del vino en el mercado internacional responde a una cosecha menor y a un cambio en los mercados. En el territorio europeo continental las plagas y enfermedades son numerosas y en ocasiones virulentas, debido a las grandes extensiones y la facilidad dispersión en ellas.

Consideramos importante aislar los hongos endófitos de la variedad de tomate asilvestrada que no se encuentra sometida a prácticas agrícolas como también de platanera y vid que se encuentran bajo cultivos de producción sin pesticidas de síntesis química y estudiar su actividad antagónica frente a hongos fitopatógenos de variedades de tomates, viña y platanera que se cultivan en Canarias con fines comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los hongos endófitos fueron aislados a partir de ramas de vid de 12 variedades recolectadas el 1 de abril de 2013 de la isla La Palma, Islas Canarias. Los aislados de platanera empleados en este trabajo procedieron de rizomas, *Musa acuminata*, de la variedad "Pequeña Enana". Se realizaron muestreos en plataneras distribuidas a lo largo del Archipiélago Macaronésico a excepción de las islas de Cabo Verde. En el norte y sur de la isla de Tenerife (Buenavista y Las Galletas), La Palma San Andrés y Saucos, Tazacorte). Madeira (Funchal) y en Azores (Terceira: Porto Judeus). Para la obtención del material vegetal del que se obtuvieron los hongos endófitos, (Toledo, 2007) se eligieron plataneras sin síntomas de enfermedad que tuvieran aspecto sano y que la piña recién cortada. El material vegetal de tomates (hojas, tallos, raíces y semillas), para el aislamiento de hongos endófitos, se recolectó en tres localidades de Tenerife, Islas Canarias: Tegueste, Bajamar y San Juan de la Rambla.

El material vegetal se embolsó y se llevó al laboratorio, donde a las 24 horas se procedió con el aislamiento de hongos endófitos. Los fragmentos se esterilizaron superficialmente (Cosoveanu *et al.*, 2016) y se sembraron en medio de cultivo PDA, 25 °C en oscuridad. A medida que los hongos endófitos se desarrollaron en las muestras vegetales y el medio se repicaron en placas Petri con PDA y cloranfenicol, para la obtención de cultivos puros y posterior identificación.

Para la identificación de los hongos endófitos se empleó la técnica de microscopía y la técnica molecular donde se extrajo el DNA genómico siguiendo el protocolo de Cosoveanu *et al.* (2016) y amplificando la región 5,8s rDNA y los dos espaciadores ITS1 e ITS2 (White *et al.* 1990) utilizando el protocolo de Shu *et al.* (2014). Los productos de amplificación fueron secuenciados por los Servicios de Secuenciación SEGA (La Laguna, España). Las secuencias se sometieron a la búsqueda BLASTN utilizando el programa Megablast (National Center for Biotechnology Information) donde las más similares identidades de secuencias y sus números de acceso fueron obtenidos.

El mantenimiento de los hongos endófitos y los fitopatógenos se realizó en PDA, 25 °C, oscuridad. Los hongos fitopatógenos empleados para este estudio fueron cepas de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

Los ensayos de cultivo dual de antagonismo enfrentan un hongo endófito y un hongo fitopatógeno con el fin de detectar los hongos endófitos que muestran actividad antagónica. En placas Petri con medio de cultivo PDA y cloranfenicol (50 mg.mL⁻¹) se sembró el hongo endófito y a 4 cm de distancia el fitopatógeno. Después de 7 días se

observó el comportamiento de los hongos en base a los criterios de descripción de antagonismo:

0 - no hay efecto

1 - contacto con formación de barrera por zona oscura

2 - zona estrecha de inhibición (1-2 mm)

3 - inhibición a una distancia mayor de 2 mm

Los resultados que resultan más interesantes son aquellos que aparece una inhibición del crecimiento fúngico, ya que el hongo está produciendo unos metabolitos secundarios que difunden al medio e impiden el desarrollo del hongo diana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando las plantas de vid, en total se obtuvieron 43 aislados y 22 especies en total, con únicamente tres en común para ambas variedades blancas y negras. La frecuencia de colonización de los aislados endófitos de la vid se recoge en la publicación de Cosoveanu *et al.*, 2014. En los ensayos de antagonismo, de los 22 aislados, nueve inhibieron el crecimiento del patógeno con más de 2 mm. *Bionectria ochroleuca* es otro ejemplo de antagonista encontrado en nuestros experimentos con capacidad para inhibir a los tres patógenos.

De los 24 hongos endófitos estudiados obtenidos del rizoma de la platanera, 9 tuvieron algún tipo de actividad antagónica y 4 de ellos se observaron con el criterio 3 (inhibición mayor de 2 mm). Previamente se han obtenido aislados de *Penicillium* spp. antagonistas de hongos fitopatógenos (Cosoveanu *et al.*, 2016; Nicoletti y De Stefano, 2012).

Fueron ensayados 46 aislados de tomates pertenecientes a 21 especies de hongos endófitos en el cultivo dual y dos de ellos se mostraron como antagónicos con el criterio más alto (i.e. criterio 3). *Rhizopycnis vagum* aislada de las raíces de tomates en Bajamar, es una especie descrita recientemente que se ha detectado asociado a raíces de plantas de melón ocasionando síntomas de “colapso de melón” en diversas zonas productoras de este cultivo en España (Armengol *et al.*, 2000). De nuestros conocimientos es la primera vez cuando una cepa de esta especie se muestra antagonista de otra cepa fúngica, en este caso *Botrytis cinerea*.

Considerando las 3 especies de plantas hospederas, aunque se ensayaron cepas endófitas que pertenecen a la misma especie fúngica, no se han encontrado coincidencias en cuanto a la actividad antagónica. Los aislados y especies que mostraron el más alto criterio de inhibición son recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Plantas hospederas con las especies y cepas endófitas que expresaron el criterio 3 (más de 2 mm de inhibición).

Planta	Cepa hongo endófito	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Bionectria ochroleuca</i>	x	x	x
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	x		x
	HV22	x		
	<i>Chaetomium spirochaete</i>	x	x	x
	<i>Alternaria</i> sp.	x		
	HV27	x	x	x
	<i>Acremonium strictum</i>		x	
	HV32	x		x
	HV43	x		
<i>Musa acuminata</i>	<i>Penicillium</i> sp. P1	x		x
	<i>Penicillium</i> sp. P3			x
	<i>Aspergillus versicolor</i>	x		
	<i>Fusarium oxysporum</i>			x
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Rhizopycnis vagum</i>		x	
	HT9		x	

BIBLIOGRAFÍA

- ARMENGOL, I.; I. PELLICER; A. VICENT; R. SALES; B.D. BRUTON y J. GARCIA-JIMENEZ. 2000. *Rhizopycnis vagum* D.F. Farr, un nuevo *Coelomycete* asociado a raíces de plantas de melón con síntomas de colapso en España. *Bol. San. Veg. Plagas*, 26:103-112.
- COSOVEANU A.; M. HERNANDEZ; B. IACOMI-VASILESCU; X. ZHANG; S. SHU; M. WANG and R. CABRERA. 2016. Fungi as endophytes in Chinese *Artemisia* spp.: juxtaposed elements of phylogeny, diversity and bioactivity. *Mycosphere*, 7(2):102-117.
- COSOVEANU, A.; C. GIMENEZ-MARIÑO; Y. CABRERA; G. HERNANDEZ and R. CABRERA. 2014. Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against phytopatogenic fungi. *Intl J of Agr Crop Sci*, 7(15):1497-1503.
- FAO, 2014. FAOSTAT - FAO Dirección de estadística 2015 | 20-032015. Producción de banana por continentes y países.
- GOUDJAL, Y.; O. TOUMATIA; A. YEKKOUR; N. SABAOU; F. MATHIEU and A. ZITOUNI. 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol Res.*, 169(1):59-65.
- GRIESBACH, M. 2000. Occurrence of mutualistic fungal endophytes in bananas (*Musa* spp.) and their potential as biocontrol agents of banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) in Uganda. Ph.D Thesis, University of Bonn, Bonn, Germany.

- JALLOW, M.F.A.; D. DUGASSA-GOBENA and S. VIDAL. 2004. Indirect interaction between an unspecialized endophytic fungus and a polyphagous moth. *Basic Appl. Ecol.*, 5(2):183:191.
- LI, Q.; P. NING; L. ZHENG; J. HUANG; G. LI and T. HSIANG. 2012. Effects of volatise substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biological Control*, 61:113-120.
- MÁRQUEZ, J. y F. QUINTANA. 1996. Una mirada crítica a la agricultura canaria: la obra periodística de José Mauricio Rodríguez 1959-1989. Edita: Cabildo Insular de Gran Canaria. 518p.
- MARTINUZ, A.; A. SCHOUTN; R.D. MENJIVAR and R.A. SIKORA. 2012. Effectiveness of systemic resistance toward *Aphis gossypii* (Hom., Aphididae) as induced by combined applications of the endophytes *Fusarium oxysporum* Fo162 and *Rhizobium etli* G12. *Biological Control*, 62:206-212.
- MENJIVAR, R.D.; J.A. CABRERA; J. KRANZ and R.A. SIKORA. 2012. Induction of metabolite organic compounds by mutualistic endophytic fungi to reduce the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (westwood) infection on tomato. *Plant Soil*, 352(12): 233-241.
- NICOLETTI, R. and M. DE STEFANO. 2012. *Penicillium estriatum* as an antagonist of plant pathogenic fungi. Dynamic biochemistry, process Biotechnology and Molecular Biology 6 (Special issue 2): 61-69.
- PAPARU, P.; T. DUBOIS; D. COYNE and A. VILJOEN. 2009. Dual inoculation of *Fusarium oxysporum* endophytes in banana: effect on plant colonization, growth and control of the root burrowing nematode and the banana weevil. *Biocontrol Science and technology*, 19(6):639-655.
- POCASANGRE, L.E.; R.A. SIKORA; V. VILICH and R.P. SCHUSTER. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of the burrowing nematode (*Radopholus similis*). *Acta-Horticulturae* 531, 283-289.
- SHITTU, H.O.; D.C.M. CASTROVERDE; R.N. NAZAR and J. ROBB. 2009. Plant-endophyte interplay protects tomato against a virulent *Verticillium*. *Planta*, 229(2): 415-426.
- SHU, S., X. ZHAO, W. WANG; G. ZHANG; A. COSOVEANU, Y. AHN and M. WANG. 2014. Identification of a novel endophytic fungus from *Huperzia serrata* which produces huperzine A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 3101-3109.
- SIKORA, R.A.; B. NIERE and J.U. KIMENJU. 2003. Endophytic microbial biodiversity and plant nematode management in African agriculture. In: Neuenschwander, P., Borgemeister, C., Langewald, J. (Eds.), *Biological Control in IPM Systems in Africa*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 179-191.
- SINGH, U.B.; A. SAHU; N. SAHU; B.P. SINGH; R.K. SINGH; RENU; D.P. SINGH; R.K. JAISWAL; B.K. SARMA; H.B. SINGH; M.C. MANNA, A. SUBBA RAO and S. RAJENDRA PRASAD. 2013. Can endophytic *Arthrobotrys oligospora* modulate accumulation of defence related biomolecules and induced systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) against root knot disease caused by *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology*, 63:45-56.

- 240 SINGH, U.B.; A. SAHU; N. SAHU; R.K. SINGH; RENU; R. PRABHA; D.P. SINGH, B.K.
241 SARMA and M.C. MANNA. 2012. Co-inoculation of *Dactylaria brochopaga* and
242 *Monacrosporium eudermatum* affects disease dynamics and biochemical responses
243 in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to enhance bio-protection against
244 *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 35:102-109.
- 245 WHITE, T.J.; T. BURNS; S. LEE and J. TAYLOR. 1990. Amplification and sequencing of
246 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A.; D.H. Gelfand; J.J.
247 Sninsky; T.J. White. (eds). PCR protocols. A guide to methods and applications. San
248 Diego, Calif: Academic Press, Inc. 315-322.