



**INOCULACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS EN
PLATANERA: CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN Y
EFECTO EN LA PRODUCCIÓN**

Raimundo Cabrera Pérez, Cristina Giménez Mariño,
Santiago Perera González y Tomás Martín Toledo

Noviembre 2017

INOCULACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS EN PLATANERA: CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN Y EFECTO EN LA PRODUCCIÓN

Cabrera Pérez, Raimundo⁽¹⁾, Giménez Mariño, Cristina⁽¹⁾, Perera González, Santiago⁽²⁾, Martín Toledo, Tomás⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología vegetal. Universidad de La Laguna. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez, s/n. Campus de Anchieta 38071. La Laguna. Tenerife. Islas Canarias. España.

⁽²⁾ Unidad de Experimentación y Asistencia Técnica Agraria. Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural. Cabildo Insular de Tenerife. Calle Alcalde Mandiño Tejera, 8 38007 Santa Cruz de Tenerife. Tenerife. Islas Canarias. España.

1.- RESUMEN

Los hongos endófitos constituyen una herramienta natural fundamental para que las plantas adquieran protección frente a plagas y enfermedades que provocan cuantiosas pérdidas en la agricultura. Se llevó a cabo un ensayo de inoculación de 4 hongos endófitos en plantas de platanera variedad Brier. Dichos endófitos habían sido obtenidos previamente a partir de muestras de platanera, y resultaron activos en laboratorio frente a *Chrysodeixis chalcites*, *Cosmopolites sordidus* o *Fusarium oxysporum*. Para el estudio, los endófitos se desarrollaron sobre arroz estéril en el laboratorio. En campo, se sembraron cinco parcelas, con 10 plantas para cada endófito y parcela con un diseño de bloques al azar. Los objetivos planteados fueron, por un lado, y tras la inoculación de los hongos endófitos, comprobar su capacidad de colonización de los tejidos vegetales, y por otro, determinar si la presencia de estos endófitos produce algún efecto en la producción del cultivo. Se realizaron tres muestreos a lo largo de un año, a los 4, 8 y 15 meses tras la inoculación, consiguiendo recuperar los endófitos inoculados en los dos primeros muestreos. De forma adicional, y de cara a continuar estudios relacionados con el control de plagas y enfermedades de la platanera, se llevó a cabo una única observación de la incidencia de plaga (lepidópteros, mosca blanca) así como de la presencia de plantas con síntomas de enfermedad. Además se valoró el peso de los racimos al final del cultivo. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos preliminares ponen de manifiesto que son necesarias nuevas inoculaciones para que el endófito se asiente por más tiempo en el vegetal. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al peso de los racimos.

Palabras clave: Interacción endófito-planta, metabolito secundario, compuesto bioactivo.

2.- INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Los hongos endófitos son un grupo de microorganismos, de enorme diversidad biológica, que viven en las plantas durante al menos una parte de su ciclo de vida sin causar ninguna manifestación visible de la enfermedad (Bacon and White, 2000). Se trata de una asociación planta-microbio única de costo-beneficio definida por "ubicación" que es transitoriamente asintomática, discreta y establecida enteramente dentro de los tejidos vivos de la planta huésped (Kusari and Spiteller, 2012). Durante esta asociación, ninguno de los organismos que interactúan se perjudica perceptiblemente. Como consecuencia de la interacción que se establece entre el endófito y la planta, se han observado efectos que mejoran la adaptación de la planta al ecosistema en el que habita al aumentar su tolerancia al estrés, a los cambios de temperatura y salinidad, a su crecimiento (Zheng *et al.*, 2016) y a su resistencia frente a las enfermedades, bacterias, nematodos, herbívoros, insectos y hongos patógenos (Aly *et al.*, 2011). En los últimos años se ha investigado también la capacidad de los microorganismos endófitos para reducir la toxicidad de los metales a las plantas y así mejorar la eficiencia en el proceso de fitorremediación (Deng *et al.*, 2017).

Plantas de platanera que han sido inoculadas con cepas no patógenas de *Fusarium oxysporum*, muestran una mejora en el desarrollo de sus tejidos, (Machungo, 2009), mayor resistencia contra el picudo de la platanera (*Cosmopolites sordidus*) (Paparú et al., 2009), el mal de Panamá (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*) (Dagamac et al., 2008) y los nematodos *Radopholus similis* (Vu et al., 2006; Mendoza et al., 2009) y *Pratylenchus goodeyi* (Mwaura et al., 2010).

En la actualidad, la gestión integrada de plagas (GIP), que promueve su manejo mediante métodos más respetuosos con el medio ambiente, es una cuestión obligatoria en toda la Unión Europea (Directiva 2009/128/CE, DOUE 24-XI-2009, L309:71-86; con transposición en España a través del Real Decreto 1311/2012, BOE-A-2012-11605). Por ello, se hace necesario encontrar nuevas herramientas que minimicen los riesgos a la salud humana y medio ambiental y que actúen eficazmente en el control de las plagas y enfermedades.

3.- OBJETIVO

En este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Comprobar su capacidad de colonización de los tejidos vegetales tras la inoculación de los hongos endófitos.
- Determinar si la presencia de estos endófitos producen algún efecto sobre la producción del cultivo.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Hongos endófitos seleccionados

Los endófitos empleados para hacer los ensayos fueron *Fusarium oxysporum* Schldt, *Penicillium pinophilum* Thom C., *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn y *Aspergillus flavus* Link (foto 3), aislados previamente a partir de muestras de platanera, y que resultaron activos en laboratorio frente a insectos plaga y hongos fitopatógenos de dicho cultivo (Martin, 2007).

Se sembraron en erlenmeyer con arroz previamente esterilizado (foto 1). Transcurridas entre dos y tres semanas de crecimiento, se tomó el arroz inoculado y se transfirió a pequeñas bolsas de plástico con agua destilada estéril (foto 2). El material así preparado es trasladado a campo para llevar a cabo la inoculación de las plantas de platanera.



Foto 1.- Erlenmeyer con arroz inoculado con los hongos endófitos.



Foto 2.- Bolsitas con hongos endófitos preparadas para la inoculación.



Foto 3.- Siembra en placa de los hongos endófitos inoculados: arriba izq.: *Aspergillus oryzae*; arriba der.: *Aspergillus flavus*; abajo izq.: *Fusarium oxysporum*; abajo der.: *Penicillium pinophilum*.

4.2.- Localización del ensayo, diseño y evaluación

El ensayo se realizó en la finca experimental “La Quinta Roja”, perteneciente al Cabildo Insular de Tenerife, y ubicada en el municipio de Garachico (foto 4). El material vegetal empleado corresponde a plantas de platanera procedente de cultivo *in vitro* de la variedad Brier.



Foto 4.- Vista aérea de la finca con las 5 parcelas objeto del ensayo.

El inóculo se aplicó cuando la planta estaba en maceta efectuando un riego posterior para incorporar el inóculo al cepellón. Cada platanera fue etiquetada con la identificación del hongo inoculado, y posteriormente se realizó la plantación de las mismas en las cinco parcelas, con 10 plantas para cada endófito y parcela (foto 5, 6, 7 y 8). El diseño estadístico del ensayo fue en bloques al azar con 6 tratamientos: 4 hongos endófitos, 1 en blanco (arroz libre del indófito) y 1 testigo (sin inóculo), y 5 repeticiones (parcelas).



Foto 5.- Aplicación del hongo endófito.



Foto 6.- Plantas con el hongo endófito aplicado.



Foto 7.- Colocación de las plantas inoculadas en parcela.



Foto 8.- Planta inoculada en el momento de la plantación.

Se realizaron tres muestreos (a los 4, 8 y 15 meses de la inoculación) en cada uno de los cuales fueron seleccionadas al azar dos plantas por tratamiento y repetición (parcela).

Con un sacabocado se obtuvieron cilindros de pseudotallo que fueron llevados al laboratorio para proceder a su desinfección superficial (Giménez, 2006) (foto 9). Pequeños fragmentos de cada muestra fueron sembrados en placas con medio de cultivo y se llevó a cabo una observación diaria para detectar el crecimiento en placa de los posibles endófitos presentes.



Foto 9.- Toma de muestra con sacabocado en el corno de la planta.



Foto 10.- Extracción en laboratorio de la muestra del sacabocado.



Foto 11.- Corte de la muestra para siembra.

En total, por planta, se prepararon 4 placas: tres de ellas, con cuatro fragmentos de pseudotallo, correspondientes a la parte exterior, media e interior del mismo (foto 12 y 13). La otra placa, la denominada “huella” se preparó pasando sobre el medio de cultivo el fragmento de platanera desinfectado, para asegurarnos que la esterilización superficial se había realizado de forma correcta.

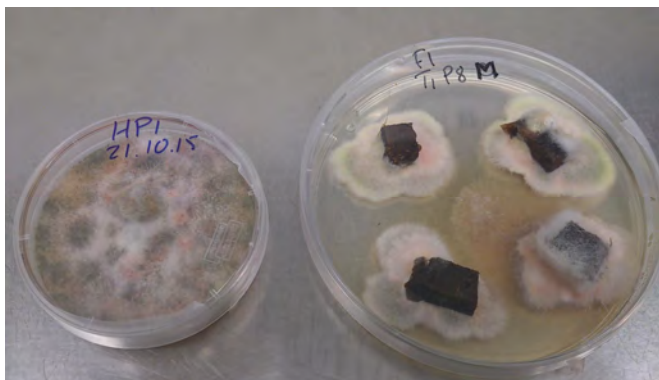


Foto 12.- Fragmentos de pseudotallo con crecimiento de hongo inoculado.

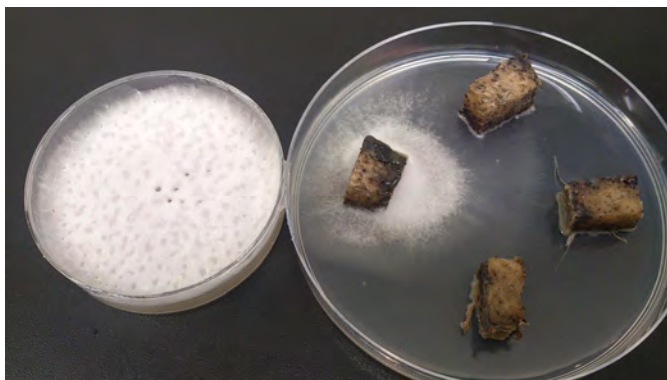


Foto 13.- Fragmentos de pseudotallo con crecimiento de hongo inoculado.

De forma adicional, y de cara a continuar estudios relacionados con la capacidad de los hongos endófitos en el control de plagas y enfermedades de la platanera, se llevó a cabo una única observación de la incidencia de las plagas así como de la presencia de plantas con síntomas de enfermedad. Para determinar la presencia de mosca blanca se estimó el porcentaje ocupado del área foliar del envés de la hoja de las últimas cuatro hojas emitidas por planta, mientras que para la lagarta se tuvo en cuenta el porcentaje de área foliar con daños de las últimas cuatro hojas emitidas por planta (Hernández *et al.*, 2017; Perera *et al.*, 2009).

Para poder determinar el efecto de la inoculación sobre la producción del cultivo, se pesaron todos los racimos en el momento de la recolección, tanto los tratados, como los seleccionados como blanco y testigo, realizándose un análisis estadístico de los resultados obtenidos con el programa Statistix 10,0.

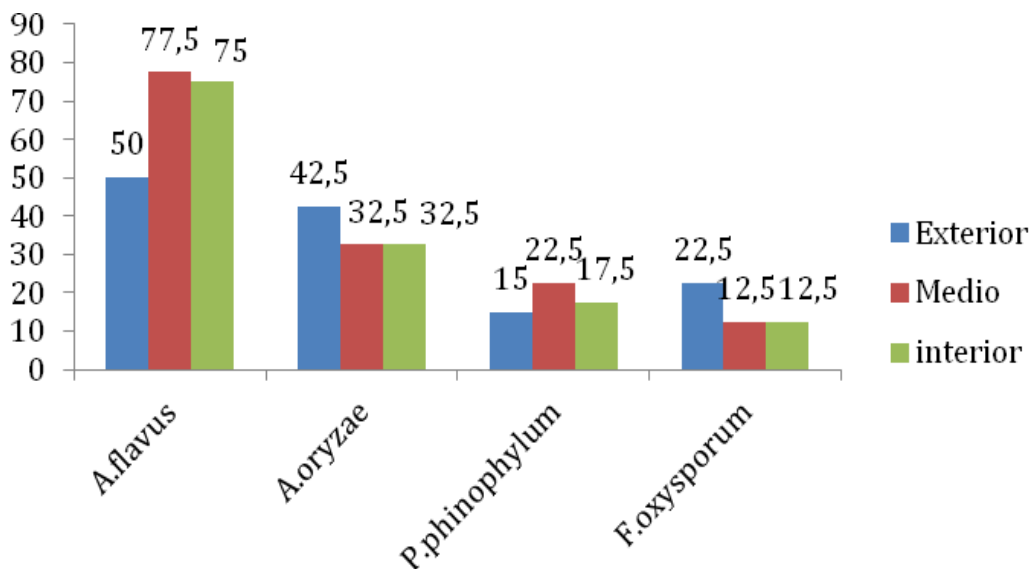
5.- RESULTADOS

Como se puede observar en la tabla 1, en el primer muestreo se recuperan los 4 hongos inoculados y este resultado se extiende a las 5 parcelas, siendo el hongo *A. flavus* el que presenta mayores tasas de aislamiento. Sin embargo, a partir del segundo muestreo los % de aislamiento disminuyen de forma considerable, alcanzando valores nulos en el tercer muestreo. Dado que no se disponen de datos previos a estos ensayos, cabe establecer la hipótesis de que una sola inoculación no es suficiente para que el hongo endófito permanezca en la planta durante todo el ciclo de la misma, por lo que será necesario una nueva inoculación para aumentar la presencia del endófito en la planta.

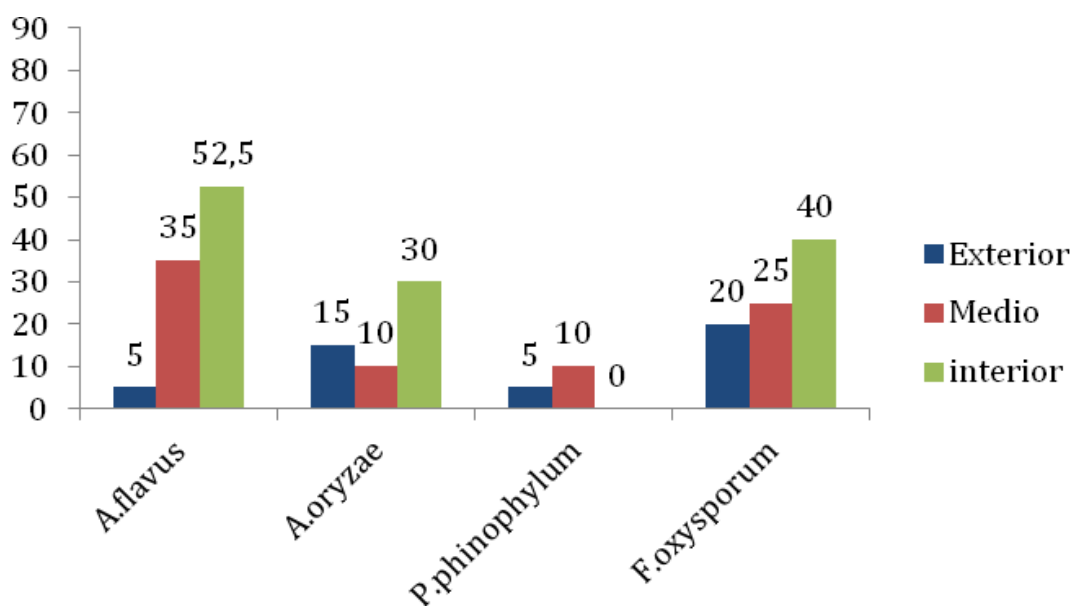
Tabla 1: Porcentaje de aislamiento de cada hongo endófito por parcela y muestreo

Muestras	parcela1			parcela2			parcela3			parcela4			parcela5		
	1 ^{er}	2 ^o	3 ^{er}	1 ^{er}	2 ^o	3 ^{er}	1 ^{er}	2 ^o	3 ^{er}	1 ^{er}	2 ^o	3 ^{er}	1 ^{er}	2 ^o	3 ^{er}
<i>A. flavus</i>	95,8	87,5	0	58,3	0	0	45,8	58,3	0	66,6	0	0	70,8	25	0
<i>A. oryzae</i>	25	0	0	29,1	0	0	20,8	25	0	54,1	37,5	0	50	87,5	0
<i>P. phinophyllum</i>	4,1	33,3	0	16,6	0	0	8,3	0	0	16,6	0	0	45,8	0	0
<i>F. oxysporum</i>	12,5	50	0	4,1	62,5	0	12,5	50	0	29,1	50	0	20,8	37,5	0

Las gráficas 1 y 2 muestran el porcentaje de aislamiento en función de la zona del pseudotallo analizada. No se incluye el gráfico correspondiente al tercer muestreo, ya que en éste no se recuperaron los endófitos aislados. En el primer muestreo se observa que el hongo *A. flavus* domina y además tiene una mayor presencia en las partes media e interna de la muestra, lo cual se repite en el muestreo 2 para ese mismo hongo. El siguiente en % de aislamiento es *A. oryzae*, principalmente en el primer muestreo, ya que en el segundo no se aisló en un porcentaje tan elevado. *P. phinophyllum* presenta diferencias visibles entre el primer y segundo muestreo, mientras que *F. oxysporum*, a diferencia del resto, aumenta en el segundo muestreo, dominando en la parte más externa en las primeras muestras, y apareciendo con más frecuencia en la zona interna de pseudotallo en el segundo muestreo.



Gráfica 1: Porcentaje de aislamiento de los endófitos en el primer muestreo, en base a la zona del pseudotallo estudiada.



Gráfica 2: Porcentaje de aislamiento de los endófitos en el segundo muestreo, en base a la zona del pseudotallo estudiada.

Para determinar la posible relación entre presencia del endófito e incidencia de plagas se llevó a cabo un muestreo total de 980 hojas, en 375 (38,26%) de las cuales había presencia de mosca blanca en grado 1 (menos de un 20% de ocupación) y tan sólo 19 (1,93%) mostraron daños por lagarta, también en grado 1 (menos de un 20% de daños). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, blanco y testigo (gráfica 3).

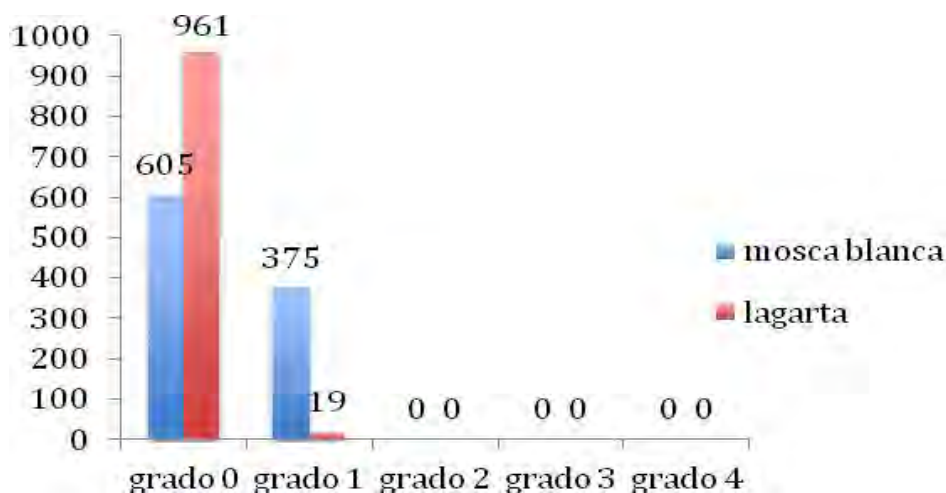
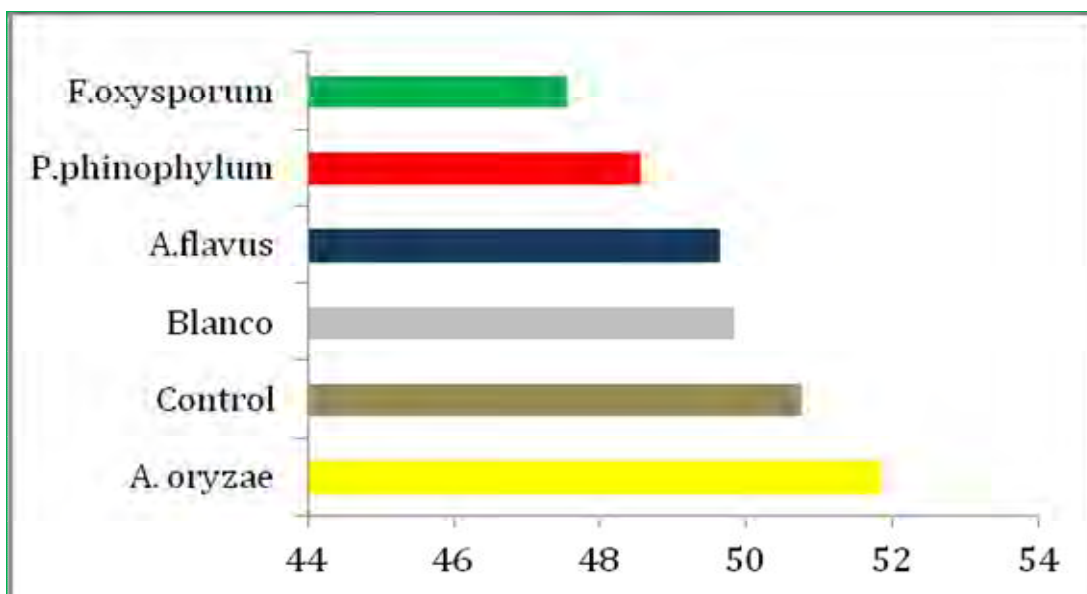


Gráfico 3: Número de hojas muestreadas y grado de incidencia de plagas

En relación al peso de los racimos, se llevó a cabo el análisis estadístico basado en el test HSD de Tukey (gráfico 4). Los valores obtenidos indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Cabe considerar que este resultado parece estar relacionado con la disminución en el porcentaje de aislamiento de los endófitos en el segundo muestreo, y la desaparición de los mismos en el tercero. Si tal y como muestran los resultados, el endófito no se asienta de forma definitiva con una sola inoculación, parece lógico que no haya diferencias significativas en el pesado de la fruta.



Gráfica 4. Promedio de peso por racimo y tratamiento. Para cada valor representado, las barras designadas con la misma letra indican que no hay diferencias significativas, para un alfa de 0,05.

En base a los resultados obtenidos, se plantea la necesidad de realizar nuevos ensayos, queda patente que una única inoculación a comienzo del cultivo no es suficiente para que el hongo endófito permanezca y se asiente en los tejidos vegetales, por lo que serían necesarias nuevas inoculaciones que proporcionen nuevos datos sobre la capacidad de colonización de los hongos endófitos y su posible influencia en la producción del cultivo, así como posibles tolerancias a determinadas plagas y enfermedades.

6.- AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos agradecer al personal de la finca experimental “La Quinta Roja” y a los Agentes de Extensión Agraria Tomás Suárez Encinoso y Eduardo Pérez Álvarez por su buena disposición y apoyo para la correcta ejecución de este ensayo.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P., (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90:1829–1845.

ASPROCAN (Asociación de Organizaciones de Productores de Plátanos de Canarias). Estadísticas cultivo del plátano en Canarias 2016. http://platanodecanarias.net/wp-content/uploads/2016/10/DOSSIER-ESTADISTICA_300617ok.pdf. [En línea]. [Consulta: 25/9/2017].

Bacon, C.W., White, J.F. (2000). An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. In: Bacon, C.W. and White, J.F., Eds., *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, New York, 3-29.

Dagamac, N., Sogono, P., Cabalfin, R., Adducu, A., de la Cruz, T. (2016). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Chemosphere* 168: 1100 -1106.

Deng, Z., Cao, L. (2017). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Chemosphere* 168:1100-1106.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) 2013.FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/TP/visualize> [en línea] [consulta el 2/12/2016]

Giménez C. (2006). Productos bioactivos de plantas canarias y sus hongos endófitos: detección de actividad y utilización en el control de plagas y enfermedades agrícolas. Tesis doctoral. Dpto. Biología vegetal (Fitopatología). Universidad de La Laguna.

Hernández Rizza, R., Perera González, S., Hernández Suárez, E. (2017). Ensayo de eficacia en el control de la mosca blanca espiral (*Aleurodicus floccissimus*) en platanera. 12 pp. Cabildo Insular de Tenerife. [en línea]. DirecciónURL: http://www.agrocabildo.org/publicaciones_detalle.asp?id=628 [Consulta: 27 de septiembre de 2017]

Kusari, S., and Spiteller, M. (2012). Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*: 241–266.

Machungo, C, Losenge, T., Kahangi, E., Coyne, D., Dubois, T. Kimenju, J. (2009). Effect of endophytic *Fusarium oxysporum* on growth of tissue-cultured banana plants. *African Journal of Horticultura Science* 2:160-167.

Martín Toledo, T. (2007). *Cosmopolites sordidus* (German) y *Chrysodeixis chalcites* (Esper), plagas de la platanera: nuevas herramientas para su control. Trabajo fin de carrera. Escuela técnica superior de ingeniería agraria. Dpto. Universidad de La Laguna.

Mendoza, A., Sikora, R. (2009). Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl* 54:263–272.

Mwaura, P., Dubois, T., Losenge, T., Coyne, D., Kahangi, E. (2010). Effect of endophytic *Fusarium oxysporum* on paralysis and mortality of *Pratylenchus goodey*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (8):1130-1134.

Paparu, P., Dubois, T., Coyne, D., Viljoen, (2009) A. 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: 639-655.

Perera González, S., Hernández Suárez, E., Del Pino Pérez, M., Alonso Pérez, A., Hernández Santana, M.P. (2009). Ensayo de eficacia de productos fitosanitarios en el control de la lagarta (*Chrysodeixis chalcites*) en el cultivo de la platanera. 28pp. Cabildo Insular de Tenerife [en línea]. Dirección URL: [http:// www.agrocabildo.org/publicaciones_detalle.asp?id=237](http://www.agrocabildo.org/publicaciones_detalle.asp?id=237) [consulta: 25 de febrero de 2017].

Vu, T., Hauschild, R., Sikora, R.A. (2006). *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. *Nematology*, 2006, Vol. 8(6): 847-852.

Zheng YK., Qiao XG., Miao CP., Liu K., Chen YW., Xu LH., Zhao LX. (2016). Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol.* 66:529–54.

Agencias de Extensión Agraria y Desarrollo Rural

Oficina	Dirección	Teléfono	e-mail
Ud. Central S/C de Tenerife	C/ Alcalde Mandillo Tejera, 8.	922 239 275	servicioagr@tenerife.es
La Laguna	Plaza del Adelantado, 11 Ed. Apartamentos Nivaria	922 257 153	aeall@tenerife.es
Tejina	C/ Palermo, 2.	922 546 311	aeate@tenerife.es
Tacoronte	Ctra. Tacoronte-Tejina, 15	922 573 310	aeata@tenerife.es
La Orotava	Plaza de la Constitución, 4.	922 440 009	aealao@tenerife.es
Icod de los Vinos	C/ Key Muñoz, 5	922 815 700	aeaicod@tenerife.es
Buenavista del Norte	C/ El Horno, 1.	922 129 000	aeabu@tenerife.es
Guía de Isora	Avda. de la Constitución s/n.	922 850 877	aeagi@tenerife.es
Valle San Lorenzo	Ctra. General, 122.	922 767 001	aeavsl@tenerife.es
Granadilla de Abona	San Antonio, 13.	922 774 400	aeagr@tenerife.es
Arico	C/ Benítez de Lugo, 1.	922 161 390	aeaar@tenerife.es
Fasnia	Ctra. Los Roques, 21.	922 530 058	aeaf@tenerife.es
Güímar	Plaza del Ayuntamiento, 8.	922 514 500	aeaguimar@tenerife.es
C.C.B.A.T.	C/Retama 2, Puerto de la Cruz Jardín Botánico	922 573 110	ccbiodiversidad@tenerife.es

Síguenos en:

www.agrocabildo.com

