

PÓSTER TÉCNICO

Estudio ecofisiológico del endófito *Fusarium nygamai* Burgess & Trimboli aislado de trigo de pan (*Triticum aestivum* L.) en Argentina

S. Larran y A.E. Perelló (Centro de Investigaciones de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. Argentina).

J. Roselló y M.P. Santamarina (Departamento de Ecosistemas Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València).

Los microorganismos endófitos han sido encontrados en la mayoría de las especies vegetales estudiadas, colonizando células y tejidos de diferentes órganos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar un endófito aislado de hojas asintomáticas de trigo de pan y evaluar su respuesta a diferentes disponibilidades de agua. El endófito fue identificado como *Fusarium nygamai* utilizando técnicas moleculares. Se realizaron pruebas de patogenicidad inoculando el hongo en semillas de trigo de pan, observando la aparición de sintomatología. El hongo se sembró en PDA ajustado a diferentes actividades de agua midiéndose el radio de crecimiento cada 24 horas durante 6 días. Con estos datos se calculó la velocidad de crecimiento fúngico (mm/día). Los resultados del test de patogenicidad demostraron que el endófito *Fusarium nygamai*, ocasionó podredumbre de semillas, muerte y debilitamiento de plántulas y, en algunos casos necrosis radicular a los 14 días de la inoculación. El cálculo de la velocidad de crecimiento del endófito mostró que a 25°C fue mayor en altas actividades de agua con un máximo a 0.995.

PALABRAS CLAVE: *Fusarium nygamai*, hongos endófitos, trigo, actividad agua.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos endófitos han sido encontrados en la mayoría de las especies vegetales estudiadas, colonizando células y tejidos de diferentes órganos (Higgins y col., 2014). La definición comúnmente utilizada del término “endófito” hace referencia a microorganismos que colonizan el interior de la planta hospedera, la mayor parte o todo su ciclo de vida sin causar daño evidente (Sánchez-Fernández y col., 2013). De los tejidos aéreos, las hojas han sido las más estudiadas y en ellas, se han encontrado comunidades endófitas dinámicas de una gran diversidad (Arnold y col., 2009).

Diferentes autores han estudiado el rol de estos microorganismos en la naturaleza, sugiriendo que las asociaciones simbióticas hongo-hospedante pueden tener un importante impacto en la ecología, adaptación de los hospedantes y en su evolución (Hubbard y col., 2014). Los endófitos mantienen con su huésped interacciones diversas, en algunas proporcionándole beneficios (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011), y en otras, manteniendo un período de latencia sin ocasionar daño hasta que por condiciones ambientales o de estrés o el ciclo fenológico de la planta, manifiestan sintomatología (AGRIOS, 2005).

El estudio del comportamiento de las especies fúngicas en diferentes condiciones ambientales, como la disponibilidad de agua, permite conocer su ecología, tanto individualmente como en sus relaciones interespecíficas (Lacey y Magan, 1991). Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue estudiar una especie fúngica endófito aislada de hojas asintomáticas de trigo de pan y evaluar su respuesta a diferentes disponibilidades de agua con el fin de conocer su comportamiento y desarrollo.

Materiales y métodos

El hongo endófito

La especie endófito utilizada en el trabajo fue aislada en ensayos preliminares a partir de hojas asintomáticas de trigo de pan del cultivar Baguette 18 sembrado en la Estación

Experimental J. Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina. Para el aislamiento se utilizó la técnica de Luginbühl y col. (1979) incubándose en PDA a 25°C durante 7 días. El hongo se identificó como *Fusarium nygamai* Burgess & Trimboli mediante técnicas moleculares y luego, se depositó en la Colección Española CECT 20938.

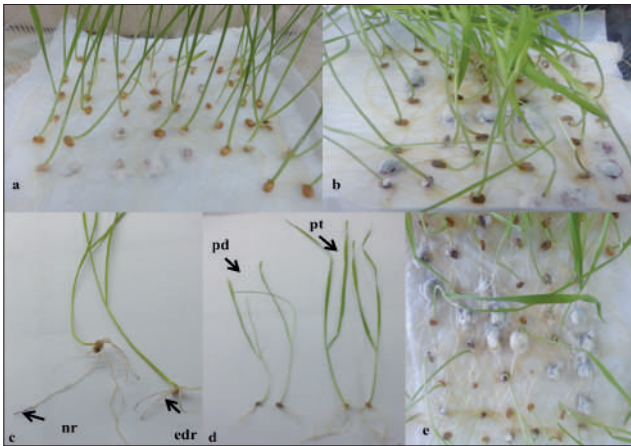


Figura 1. Efecto del endófito *Fusarium nygamai* en semillas y plántulas de trigo luego de la inoculación. a: Podredumbre de semillas a los 7 días; b: a los 14 días; c: plántulas con necrosis radicular (nr) y escasa cabellera radicular (edr); d: plántulas débiles (pd) comparadas con las plántulas testigo (pt); e: semillas y plántulas con presencia de micelio y podredumbre de semillas a los 14 días.

Pruebas de patogenicidad

El endófito se sembró en placas de Petri conteniendo PDA y se incubó a 24± 2 °C. Luego de 6 días se preparó una suspensión a partir de las placas colonizadas por el hongo, filtradas y ajustadas con hematocitómetro de Neubauer a una concentración de 6 x 10⁶ esporas/ml. A continuación, semillas de trigo de pan del cultivar Baguette 18 se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, se practicaron dos lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar, en cámara de flujo laminar sobre papel de filtro. Se inocularon 100 semillas sumergiéndolas en la suspensión del hongo durante 20 minutos utilizando agitador magnético. Luego, se sembraron en bandejas plásticas estériles siguiendo las normas establecidas por la Asociación Internacional para Test de Semillas (I.S.T.A.), evaluándose el porcentaje de semillas germinadas o con podredumbre y la presencia de plántulas debilitadas y muertas a los 14 días. Los testigos consistieron en 100 semillas desinfectadas y sumergidas en agua destilada estéril por 20 minutos y luego sembradas en las bandejas. El ensayo fue realizado dos veces.

Respuesta del crecimiento del endófito *Fusarium nygamai* frente a distintas actividades de agua

El hongo se sembró en placas de Petri conteniendo PDA, incubándose a 25°C durante 6 días. A partir de la sección periférica de las colonias fúngicas, se cortaron discos de 8 mm de diámetro que fueron inoculados en placas de Petri conteniendo PDA ajustado con las siguientes actividades de agua (α_w): 0.90, 0.95, 0.98, 0.995. Las placas se incubaron dentro de cajas herméticas de polietileno a 25°C durante 6 días. Se realizaron 5 repeticiones de cada actividad de agua.

Cálculo de la velocidad del crecimiento fúngico

Se midió el radio de las colonias fúngicas en dos sentidos perpendiculares en cada una de las placas durante 6 días cada 24 hs desde la inoculación. Se determinó la velocidad de crecimiento en mm/día a través de una regresión lineal de los radios medidos (mm) frente al tiempo (días), utilizando el programa Microsoft Excel 2010.

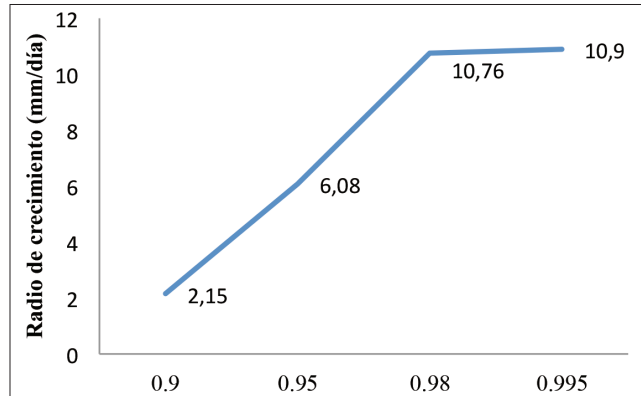


Figura 2. Velocidad de crecimiento de *Fusarium nygamai* en distintas actividades de agua (α_w) a 25°C.

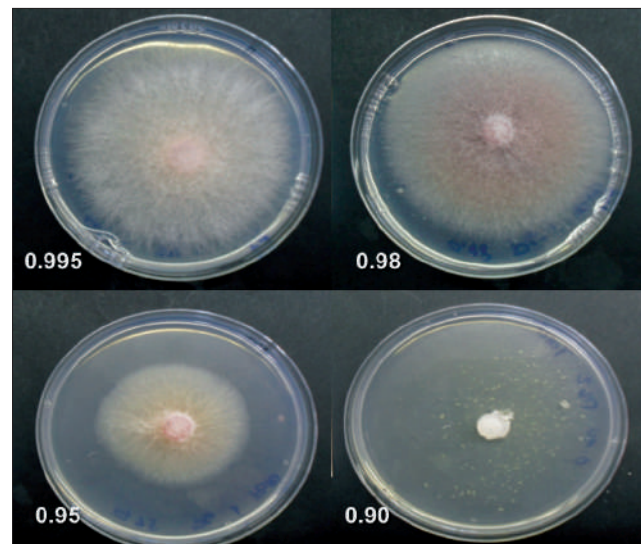


Figura 3. Crecimiento de *Fusarium nygamai* en PDA a 25°C a distintas actividades de agua.

	Germinación (%)	Plántulas debilitadas	Plántulas muertas	Necrosis radicular	Semillas y plántulas con presencia de micelio y semillas con podredumbre
Semillas Testigo	85*	0	0	0	0
Semillas atacadas	81	8	5	5	12

*Los datos (%) expresan el promedio de las dos repeticiones (total 200 semillas analizadas)

Tabla 1. Efectos del endófito *Fusarium nygamai* en semillas y plántulas de trigo.

Resultados y discusión

Test de patogenicidad

Los resultados del test de patogenicidad mostraron que el endófito *F. nygamai* ocasionó la podredumbre de semillas de trigo, debilitamiento y muerte de plántulas y, en algunos casos necrosis radicular a los 14 días de la inoculación (Tabla 1 y Figura 1). Las plántulas debilitadas mostraron menor tamaño y altura

en comparación con los testigos, coleoptilos debilitados, menor densidad radicular y, en algunas plántulas se observó la base del tallo con comienzo de necrosis desde los 7 días. Como puede observarse en la Figura 1 sobre las semillas y base de plántulas desarrolló abundante micelio blanco rosado desde los 7 días de la inoculación.

F. nygamai ha sido registrado ocasionando sintomatologías en sorgo, mijo y haba, colonizando tejidos vivos o rastrojos, y en suelo junto con diferentes especies del género *Fusarium*. En plántulas de arroz, en inoculaciones artificiales ha ocasionado la reducción de la emergencia, síntomas de podredumbre basal y reducción de altura (Balmas y col., 2000).

Debido a que el endófito ha ocasionado sintomatología luego de la inoculación de semillas y, considerando que ha sido aislado de plantas asintomáticas de trigo de pan, podría sugerirse que *F. nygamai* mantiene una infección latente que puede quebrarse según las condiciones del medio, o etapa del cultivo. Diferentes especies de *Fusarium* son conocidas causantes de infecciones latentes, las cuales son consideradas una de las relaciones más especializadas de parasitismo y como un tipo de tolerancia del hospedante hacia el patógeno (De Souza y Formento, 2003). El género *Fusarium* incluye una población compleja de especies cosmopolitas encontrándose en el suelo y ocasionando enfermedades como podredumbres basales y marchitamientos. A su vez, diferentes especies de este género son oportunistas colonizando tejidos vegetales (raíces, cuello y tallos) de plantas debilitadas o que han sufrido estrés (Lori y Malbrán, 2015).

Efecto de la actividad de agua sobre la velocidad de crecimiento de *F. nygamai*

Con los resultados obtenidos de las mediciones realizadas se determinó la

velocidad de crecimiento del endófito a las distintas actividades de agua. En la Figura 2 se representa la velocidad de crecimiento en mm/día para cada actividad de agua, obtenidas a partir de la tendencia observada en la recta de regresión. Tal como puede observarse, *F. nygamai* crece mejor a mayores actividades de agua, con su máximo a 0.995. Estos resultados acuerdan con los obtenidos para *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en ensayos similares (Roselló y col., 2004) y con los obtenidos por Lacey y Magan (1991) para la mayoría de las especies del género *Fusarium* estudiadas.

El conocimiento de las temperaturas óptimas y de los requerimientos hídricos para el crecimiento de las especies fúngicas impacta directamente en su distribución geográfica de acuerdo a las condiciones ambientales, y a las variaciones debidas al cambio climático e influyen a su vez, en la producción de micotoxinas en el caso particular de algunas especies del género *Fusarium* (Marín García, 2010). Como ejemplo, la infección latente de *Fusarium verticillioides* en maíz manifiesta sintomatología dependiendo de las condiciones ambientales, de la disponibilidad de agua, de la genética del hospedante y del hongo (OREN y col., 2003).

El estudio del efecto de estos factores (temperatura y actividad de agua) en el crecimiento del hongo endófito es de importancia para el conocimiento de su comportamiento en distintas condiciones. Se sugiere la continuación del estudio de esta asociación endófito-hospedante a fines de esclarecer su rol así como su comportamiento en interacciones con otros microorganismos endófitos y frente a biocontroladores.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. Academic Press. Pp. 952.
- Arnold, A. E.; Miadlikowska, J.; Higgins, K. L.; Sarvate, S. D.; Gugger, P.; Way, A.; Hofstetter, V.; Kauff, F.; Lutzoni, F. (2009). Phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? *Systematic Biology* 182, 314-330.
- Balmas, V.; Corda, P.; Marcello, A.; Bottalico, A. (2000). *Fusarium nygamai* associated with *Fusarium* Foot Rot of Rice in Sardinia. *Plant Disease Notes* 84, 807.
- De Souza, J.; Formento, N. (2003). Microorganismos causantes de infecciones latentes en girasol, asociadas a la senescencia foliar anticipada. *Asagir*. http://www.asagir.org.ar/asagir2008/2_congreso/Murales/Souza.pdf
- Higgins, K. L.; Arnold, A. E.; Coley, P. D.; Kursar, T. A. (2014). Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host- and habitat generalists characterized by strong spatial structure. *Fungal ecology* 8, 1-11.
- Hubbard, M.; Germida, J. J.; Vujanovic, V. (2014). Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology* 116, 09-22.
- Lacey, J.; Magan, N. (1991). Fungi relationships in cereal grains: their occurrence and water and temperature. En: Chelkowski, J. (Ed.) *Cereal grains. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Amsterdam, Elsevier, 1991. Pp. 77-118.
- Lori, G.; Malbrán, I. (2015). *Fusarium* spp.: Problemática en especies hortícolas y ornamentales. IV Jornadas de Enfermedades y Plagas en Cultivos Bajo Cubierta. FCAYF, UNLP.
- Luginbül, M.; Petrini, O.; Müller, E. (1979). Funghi endofitici nel Frumento (*Triticum vulgare* Vill.). *Phytopathologia Mediterranea* 18, 192-194.
- Marín García, P. (2010). Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "*Fusarium*". Tesis doctoral. E-prints, Universidad Complutense. Madrid. <http://eprints.ucm.es/11150/>
- Oren L.; Ezrati, S.; Cohen, D.; Sharon, A. (2003). Early events in the *Fusarium verticillioides*-Maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied Environmental Microbiology* 69, 1695-1701.
- Porras-Alfaro, A.; Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology* 40, 291-315.
- Roselló, J.; Sempere, F.; Santamarina, M.P. (2004). Respuestas al agua y a la temperatura del agente causal de la fusariosis del tomate: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytoma* 162, 98-100.
- Sánchez-Fernández, R. E.; Sánchez-Ortiz, B. L.; Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K.; Ulloa-Benitez, A.; Armendáriz-Guillén, B.; García-Méndez, M. C.; Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas* vol. 16 no. 2 México