

HONGOS ENDÓFITOS DE *Artemisia* L.: PROTECCIÓN FRENTE A *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltsh. EN CULTIVOS SUSCEPTIBLES

Andreea Cosoveanu^{1*}, Cristina Nita², Beatrice Iacomi² y Raimundo Cabrera¹.

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

² Departamentul de Stiintele Plantelor, Facultatea de Agricultura, Universitatea de Stiinte Agronomice si Medicina Veterinara, Bd. Marasti 59, 11464, Bucharest, Romania.

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

RESUMEN

Los hongos endófitos demuestran continuamente su candidatura para 'maquinarias biotecnológicas de alto interés agrícola y farmacéutico'. Desde el paclitaxel, peramina y lolinas, más de 20 productos naturales se han lanzado en el mercado internacional entre 2001 y 2005 y aproximadamente otros 140 están en distintos niveles de desarrollo en todas las áreas terapéuticas. Hasta el presente, los datos sobre su potencial uso como protectores de semillas frente a hongos fitopatógenos son escasos. Cinco extractos obtenidos de hongos endófitos, residentes en especies de *Artemisia*, se han testado para averiguar su potencial de protección de semillas de rábano frente a *Alternaria brassicicola*. Biomasa de cinco cepas de hongos endófitos cultivados sobre arroz, fue extraída con disolventes y sus extractos fueron usados como tratamiento protector de semillas de rábano. Todos los extractos mostraron un alto potencial de protección de las plántulas y no se observó ninguna influencia negativa en el desarrollo de estas. Para el extracto 1053, fue observado un valor bajo del índice de necrosis (1,83) después de inmersión de semillas por 30 minutos, comparado con el control (6,67). El extracto 1092 redujo el índice de necrosis 2,91 veces comparado con el control. Los efectos del tratamiento con el extracto 1051 registraron valores más bajos para ambos tratamientos (aplicación de 5 y 30 minutos; 1,92 y 3,15, respectivamente) comparados con el control (6,93). El extracto 1057 mostró un valor del índice de necrosis después de incubación por 30 minutos del 26 % del valor del índice obtenido en el grupo de plántulas control. El extracto 1086 registró un índice de necrosis de sólo 3,6, después de incubación por 30 minutos comparado con el valor del grupo control de 6,93.

Palabras clave: *Artemisia*, Antifúngicos, Hongos endófitos.

ENDOPHYTIC FUNGI OF *Artemisia* L.: SEED PROTECTANTS AGAINST *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltsh. IN SUSCEPTIBLE CROPS

ABSTRACT

Endophytic fungi continuously demonstrate their promising candidature for "biotechnological machines" to be utilised in agriculture and medicine. Since paclitaxel, peramine and lolines, more than 20 natural products have been launched on the international market between 2001 and 2005 and approximately 140 are in different development levels in all therapeutic areas. By far, studies on their potential use as seeds protectants against phytopathogenic fungi are scarce. Five crude extracts obtained from endophytic fungi, residing in different *Artemisia* species were tested for

their bioprotection potential against *Alternaria brassicicola* on radish seeds. Biomass of five endophytic strains cultivated on rice was solvent extracted and their extracts were used as treatment for the radish seeds. All extracts exhibited a high protection potential towards plantlets and no negative influence on their development was observed. The extract 1053 revealed a low value of the necrosis index (1,83) in treated seeds after 30 minutes of immersion compared to the control (6,67). Extract 1092 reduced the necrosis index by 2,91 folds compared to the control. Effects of the treatment with extract 1051 registered lower values for both 5 and 30 minutes incubation (1,92 and 3,15, respectively) compared to the control (6,93). Extract 1057 showed a value of 26 % of the one obtained in the control group of plantlets. Extract 1086 demonstrated a necrosis index of 3,6, after 30 minutes of incubation compared to the value of 6,93 of the control group.

Keywords: *Artemisia*, antifungal, fungal endophytes.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos demuestran continuamente su candidatura para 'maquinarias biotecnológicas de alto interés agrícola'. Para subrayar la ascensión de la investigación que trata estos microorganismos, entre 1987 y 2000 aproximadamente 140 productos naturales nuevos han sido aislados de hongos endófitos (Tan y Zou, 2001) y un número similar se ha caracterizado entre 2000 y 2006 (Zhang *et al.*, 2006).

Los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos pueden ser explotados en agricultura y en el control de enfermedades y plagas (Kaul *et al.*, 2012). La bioactividad de varios endófitos se ha atribuido a la producción de toxinas (Li *et al.*, 2000). No obstante, en la mayoría de los casos son involucrados distintos tipos de metabolitos para una cierta actividad (Gonzalez Coloma *et al.*, 2016).

Brevemente, la literatura científica de los proteccionistas de plantas abunda con informes de *screening* de actividad antifúngica y antibacteriana obtenida a través de los metabolitos secundarios de los hongos endófitos. Varios autores enfocan las búsquedas en plantas medicinales como hospederos de hongos endófitos activos como: *Ginkgo biloba* L. (Xiao *et al.*, 2013), *Artemisia* spp. L. (Cosoveanu *et al.*, 2016a, 2016b), *Stevia bauidiana* Bertoni (Verma *et al.*, 2014), *Ocimum basilicum* L. (Chowdhary y Kaushik, 2015).

Hasta el presente, los datos sobre su potencial uso como protectores de semillas frente a hongos fitopatógenos son escasos. Sin embargo, estudios demuestran su eficacia frente a nematodos de plantas (Yan *et al.*, 2011).

Cinco extractos obtenidos de hongos endófitos, residentes en especies de *Artemisia*, se han testado para averiguar su potencial de protección de semillas de rábano frente a *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltsh.), constituyendo este el objetivo de la presente investigación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de hongos endófitos

Las plantas seleccionadas pertenecen a *Artemisia thuscula* Cav., *Artemisia gorgonum* Webb y *Artemisia austriaca* Jacq. y fueron recolectadas de Rumania, Cabo verde e Islas Canarias. Los hongos endófitos se aislaron de tallos. Se ha empleado un método

de esterilización superficial para suprimir los microorganismos epifitos de las plantas seleccionadas (Cosoveanu *et al.*, 2016a).

Identificación de los hongos endófitos

Para la identificación de los hongos endófitos se ha empleado la técnica de microscopia y la técnica molecular donde se extrajo el DNA genómico siguiendo el protocolo de Cosoveanu *et al.*, (2016a) y amplificando la región 5,8s rDNA y los dos espaciadores ITS1 e ITS2 utilizando el protocolo de (Shu *et al.*, 2014). Los productos de amplificación fueron secuenciados por los Servicios de Secuenciación SEGAI (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.

Cultivo de hongos endófitos y extracción química de los extractos

Los hongos endófitos para el posterior inóculo se mantuvieron en PDA por un periodo de 1-2 semanas, dependiendo de su velocidad de crecimiento. La preparación del medio de cultivo de arroz y las condiciones de crecimiento de los hongos endófitos y la obtención de los extractos se realizaron de acuerdo con Cosoveanu *et al.* (2014).

*Ensayo in vivo 'extractos de hongos endófitos-semillas de rábano-fitopatógeno *Alternaria brassicicola*'*

La evaluación de las semillas contaminadas con *Alternaria brassicicola* fueron estimadas en semillas comerciales de rábano *Raphanus sativus* cultivar 'French breakfast 3' en presencia de extractos de hongos endófitos. Los ensayos fueron realizados de acuerdo con Iacomí-Vasilescu *et al.*, (2004). Los estados de desarrollo se evaluaron utilizando una escala 0-3 (0 = sin germinación; 1 = aparición de raíz; 2 = aparición de cotiledón; 3 = plántula bien desarrollada). La severidad de la enfermedad se monitorizó en plántulas utilizando una escala 0-9 (0 = sin síntomas de enfermedad; 1 = 1-2 mm de necrosis en el tallo; 3 = extensión de la necrosis sobre el tallo; 5 = un tercio del sistema radicular o del hipocotileo afectado; 7 = el sistema radicular plenamente afectado y la parte aérea afectada y cubierta por esporas; 9 = plántula necrosada y cubierta por esporas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinco extractos 1051, 1053, 1057, 1086 y 1092 se han probado para su potencial protector de semillas de *Raphanus sativus* L. frente al ataque provocado por *Alternaria brassicicola*. Después de una incubación de 30 minutos, el valor del índice de necrosis para el grupo de plántulas ha variado entre 51,94 % y 27,77 % de los valores obtenidos con los grupos de plántulas control no tratadas y contaminadas.

Thielavia arenaria Mouch. proveniente de *Artemisia gorgonum* se ha extraído y se ha obtenido el extracto 1051. Los efectos del tratamiento con el extracto 1051 sobre el desarrollo de las plántulas se han registrado y evaluado (Figura 1). El valor promedio del índice de desarrollo observado para las semillas contaminadas y tratadas (2,85 y 2,53 para 5 y 30 minutos, respectivamente) no ha sido muy distinto al valor obtenido con los controles de no inoculación y tratamiento (3 y 2,8, respectivamente).

El grupo de semillas desinfectadas y contaminadas han registrado un valor promedio de desarrollo de solo 1,57 %, lo que muestra una eficacia del tratamiento en el desarrollo normal de las plántulas.

El índice de necrosis ha registrado un valor bajo para los grupos en los cuales el extracto 1051 se ha aplicado como tratamiento para 5 y 30 minutos (1,92 y 3,15, respectivamente) comparado con las semillas no tratadas y contaminadas (6,93).

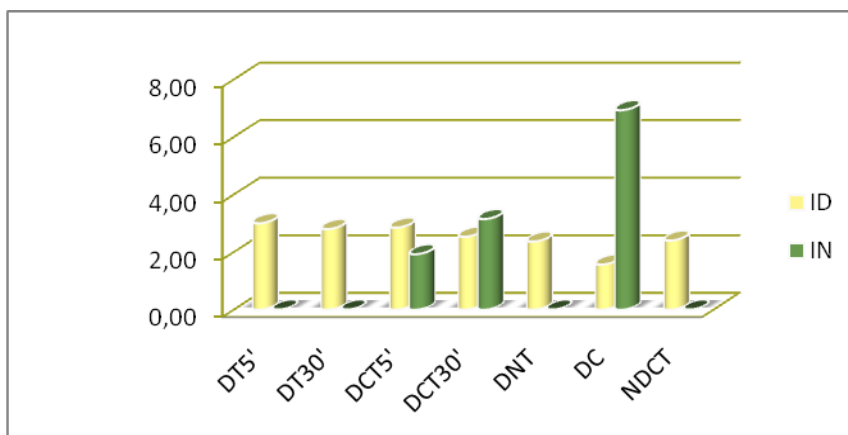


Figura 1. Ensayo *in vivo* del extracto 1051 como tratamiento protector de las semillas de rábano frente a *Alternaria brassicicola*. DNT – desinfectadas y no contaminadas; DC – desinfectadas y contaminadas; NDCT – no desinfectadas, no tratadas y no contaminadas; DT5' – desinfectadas y tratadas 5 minutos; DT30' – desinfectadas y tratadas 30 minutos; DCT5' – desinfectadas, contaminadas y tratadas 5 minutos; DCT30' – desinfectadas, contaminadas y tratadas 30 minutos; ID – índice de desarrollo; IN – índice de necrosis.

Chaetomium sp. Kunze se ha aislado de *Artemisia thuscula* y su extracto 1053 se ha usado como tratamiento de semillas frente al fitopatógeno *Alternaria brassicicola* y se han observado la instalación y el desarrollo del mismo (Fig. 2). Se ha obtenido un índice de necrosis bajo después de 30 minutos de inmersión (IN =1,83) comparado con el control (IN = 6,67). Además, el índice ha bajado 2,69 veces comparado con el valor obtenido con una inmersión de 5 minutos. El índice de desarrollo también muestra que el extracto no ha influido el crecimiento regular de las plántulas después de la inmersión de 30 minutos.

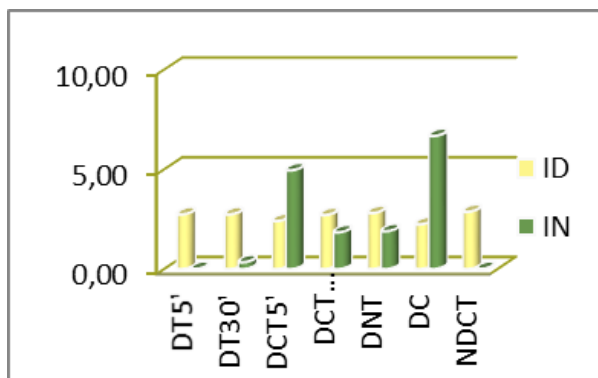


Figura 2. Ensayo *in vivo* del extracto 1053. (Abreviaciones similares a la Figura 1).

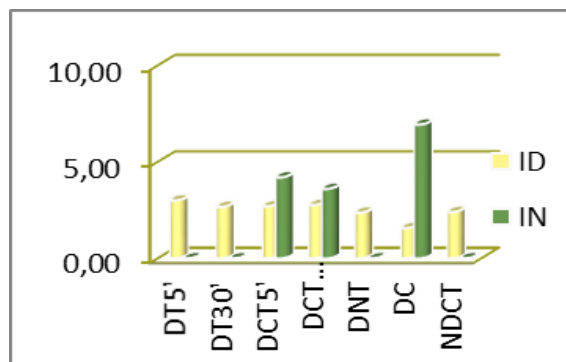


Figura 3. Ensayo *in vivo* del extracto 1086. (Abreviaciones similares a la Figura1).

El extracto 1086 obtenido de *Stephylium* sp. Wallr. aislado de *Artemisia thuscula*, ha mostrado una protección relativa frente a *A. brassicicola* (DCT30' = 3,6 después de 30 minutos de incubación versus DC = 6,93). El extracto ha mejorado el desarrollo de las plántulas (Figura 3).

Neoplatysporioidesaloicola se ha aislado de *Artemisia thuscula* y el extracto 1092 obtenido de su biomasa ha mostrado una protección relevante frente al desarrollo de *A. brassicicola* (Figura 4). El valor del índice de necrosis para el grupo de semillas incubadas 30 minutos ha bajado 2,91 veces comparado con el grupo de semillas contaminadas y no tratadas. Además, el índice de desarrollo ha mostrado un valor similar considerando ambos tiempos de incubación.

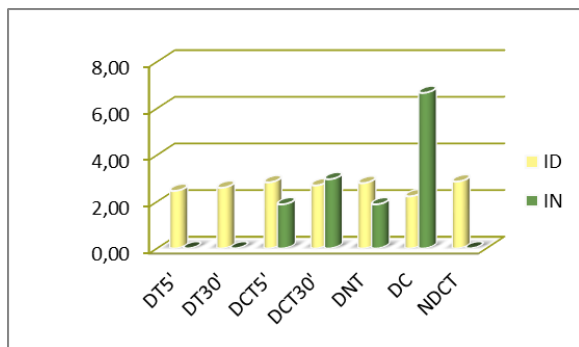


Figura 4. Ensayo *in vivo* del extracto 1092. (Abreviaciones similares a la Figura 1).

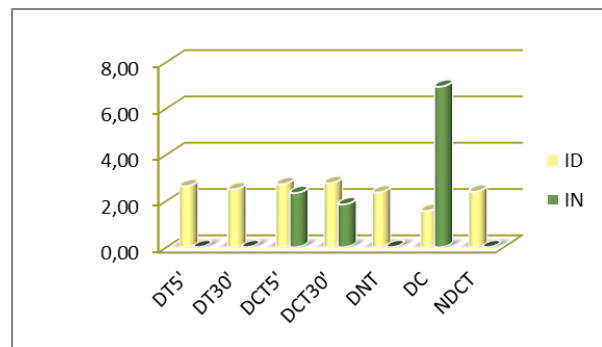


Figura 5. Ensayo *in vivo* del extracto 1057. (Abreviaciones similares a la Figura 1).

El extracto 1057 obtenido de una cepa de *Fusarium* sp. Link. ha mostrado una protección interesante frente a la instalación del patógeno. Después de una incubación de 30 minutos, el índice de necrosis de las plántulas ha evidenciado un valor de solo 26 % del valor del grupo control de semillas no tratadas (Figura 5). El índice de desarrollo ha incrementado ligeramente para ambos tratamientos (2,72 y 2,77 para 5 y 30 minutos, respectivamente), comparado con el valor del grupo de semillas no tratadas (1,57).

CONCLUSIONES

En general todos los extractos evaluados mostraron potencial para la protección de las plántulas y no se observó influencia negativa en el desarrollo de las mismas. Cuatro extractos son de real interés para futuros estudios, como revelaron los datos preliminares. De nuestros conocimientos hasta ahora, no hay estudios que investiguen el potencial de los metabolitos de los hongos endófitos en el control de los microorganismos patógenos 'seed-borne'.

BIBLIOGRAFÍA

- CHOWDHARY, K. and N. KAUSHIK. 2015. Fungal endophyte diversity and bioactivity in the Indian medicinal plant *Ocimum sanctum* Linn. PLoS One. 10:1-25, doi:10.1371/journal.pone.0141444.
- COSOVEANU, A.; Y. CABRERA; G. HERNANDEZ and R. CABRERA. 2014. Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against

- phytopatogenic fungi. *Int J Agric Crop Sci.*, 7:1497-1503.
- COSOVEANU, A.; M. HERNANDEZ; B. IACOMI-VASILESCU; X. ZHANG; S. SHU; M. WANG and R. CABRERA. 2016a. Fungi as endophytes in Chinese *Artemisia* spp.: juxtaposed elements of phylogeny, diversity and bioactivity. *Mycosphere*, 7:102-117, doi:10.5943/mycosphere/7/2/2.
- COSOVEANU, A.; E. NITA; B. IACOMI; S. RODRIGUEZ SABINA and R. CABRERA. 2016b. Active fungal endophytes against phytopatogenic fungi - dwellers of Romanian and Canarian *Artemisia* spp. *Sci Pap Ser B, Hortic.*, LX:291-298.
- GONZALEZ COLOMA, A.; A. COSOVEANU; R. CABRERA; C. GIMENEZ MARINO and N. KAUSHIK. 2016. Fungi: Applications and Management Strategies. In: S.K. Deshmukh, J.K. Misra, J.P. Tewari, and T. Papp, eds. CRC Press. pp. 14-32.
- IACOMI-VASILESCU, B.; H. AVENOT; N. BATAILLÉ-SIMONEAU; E. LAURENT; M. GUÉNARD and P. SIMONEAU. 2004. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Prot.*, 23:481-488, doi:10.1016/j.cropro.2003.10.003.
- KAUL, S.; S. GUPTA; M. AHMED and M.K. DHAR. 2012. Endophytic fungi from medicinal plants: A treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev.*, 11:487-505, doi:10.1007/s11101-012-9260-6.
- LI, J.Y.; G. STROBEL; J. HARPER; E. LOBKOVSKY and J. CLARDY. 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Org Lett.*, 2:767-770, doi:10.1021/ol000008d.
- 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 J Microbiol Biotechnol.*, doi:10.1007/s11274-014-1737-6.
- TAN, R.X. and W.W. ZOU. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep.*, 18:448-459, doi:10.1039/b100918o.
- VERMA, A.; V.N. JOHRI and A. PRAKASH. 2014. Antagonistic evaluation of bioactive metabolite from endophytic fungus, *Aspergillus flavipes* KF671231. *J Mycol.*, doi:http://dx.doi.org/10.1155/2014/371218.
- XIAO, Y.; LI H-X, LI C, WANG J-X, LI J, WANG M-H, YE Y-H. 2013. Antifungal screening of endophytic fungi from *Ginkgo biloba* for discovery of potent anti-phytopathogenic fungicides. *FEMS Microbiol Lett.*, 339:130-136, doi:10.1111/1574-6968.12065.
- YAN, X.; R.A. SIKORA and J. ZHENG. 2011. Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 12:219-225, doi:10.1631/jzus.B1000165.
- ZHANG, H.W.; Y.C. SONG and R.X. TAN. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep.*, 23:753-771, doi:10.1039/b609472b.