



ÁREA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA Y PESCA

Servicio Técnico de Agricultura y
Desarrollo Rural

INFORMACIÓN TÉCNICA



EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS EN PLATANERA FRENTE AL ATAQUE DEL PICUDO NEGRO

(Cosmopolites sordidus)



02/2020

2020 Oct.



www.agrocabildo.org



Esta publicación es gratuita. Se autoriza su reproducción mencionando a sus autores:

Edita Excmo. Cabildo Insular de Tenerife. Área de Agricultura, Ganadería y Pesca-
Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural

Publica Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural
Fotografías Giménez Mariño, Cristina y Perera González, Santiago

Autores **Giménez Mariño, Cristina** 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

Perera González, Santiago Unidad de Experimentación y Asistencia Técnica Agraria.
Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural del Cabildo Insular de Tenerife. Calle
Alcalde Mandillo Tejera, 8. 38007. Santa Cruz de Tenerife. Tenerife. Islas Canarias. España

Diseño y Maquetación Carlos Marante Lorenzo

ISSN
Depósito Legal



1 RESUMEN

El empleo en campo de microorganismos beneficiosos para los cultivos se ha convertido en una herramienta fundamental para combatir plagas y enfermedades y para dotar a la planta de una mayor defensa frente a los diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos a los que se pueda ver sometida. En este estudio se han inoculado plantas de platanera con dos especies de hongos endófitos pertenecientes al género *Aspergillus* (*A. oryzae* y *A. flavus*), para confirmar si los resultados obtenidos previamente con ambos aislados en laboratorio, frente al picudo de la platanera *Cosmopolites sordidus* (Germar 1824), podían ser extrapolados a condiciones de campo. Los resultados obtenidos muestran que las plantas inoculadas con *A. flavus* presentaron un valor medio de daños inferior al resto de los tratamientos, si bien las diferencias no se pueden considerar estadísticamente significativas. Por otra parte, el porcentaje de daños de las plantas se sitúa mayoritariamente dentro del rango de 0 a 10% de afección en el cormo. La gran variabilidad observada en los datos sugiere la necesidad de realizar este tipo de ensayos empleando un número mayor de muestras, con el fin de poder obtener datos más concluyentes.

Palabras clave: picudo negro de la platanera, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, daños en el cormo.

2 INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El picudo de la platanera, *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera, Curculionidae), representa una plaga clave en el cultivo del plátano y banana a nivel mundial, generando grandes pérdidas económicas en las áreas de producción de plátano de todo el mundo. El daño es causado por larvas de *C. sordidus* que están protegidas dentro del tejido de la planta, por lo que las estrategias de manejo van dirigidas a los individuos adultos (Abagale et al., 2018).

La creciente demanda de producción orgánica de los alimentos, está contribuyendo a la adopción de un enfoque ecológico en los métodos de control de plagas. En consecuencia, la reducción del uso de plaguicidas se ha convertido en una fuerte opción para proteger el medio ambiente y la salud humana. De ahí que las investigaciones se estén centrando en la búsqueda de alternativas más racionales tales como trampas cebadas con feromonas, nematodos, hongos entomopatógenos (Fancelli et al., 2013; Delgado et al., 2019) y microorganismos endófitos (Paparú et al., 2009; Cabrera et al., 2017).

La investigación planteada en este trabajo se centra en el empleo de éstos últimos. Todas las plantas viven en estrecha asociación con microorganismos presentes en su entorno, constituyendo el "microbioma vegetal" (Verma et al., 2019). Los endófitos son microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas durante parte o la totalidad de su ciclo de vida sin causar impactos negativos obvios a la planta huésped (Wilson, 1995). El término endófito fue introducido por primera vez en 1886 por De Bary para los microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) que colonizan los tejidos internos de las plantas. (De Bary, 1884); esta definición ha ido sufriendo modificaciones, siendo una de las últimas definiciones de endófitos la propuesta por Posada y Vega (2005), quienes utilizaron este término para describir todos los organismos que habitan en las diferentes partes internas de plantas, incluidas las semillas. Estos microbios existen en un estado equilibrado de simbiosis, aunque una simbiosis beneficiosa (mutualismo) puede convertirse en comensalismo o parasitismo dependiendo de las circunstancias (por ejemplo, bajo estrés nutricional).



Se han aislado endófitos en todas las plantas examinadas hasta la fecha. Los endófitos son importantes por su papel en la mejora de la salud de las plantas, siendo responsables de cambios fenotípicos (en términos de crecimiento, desarrollo y producción) en varios cultivos (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Los organismos endófitos están siendo estudiados como fuentes potenciales de nuevas sustancias bioactivas porque tienen muchas aplicaciones potenciales (Wang & Dai, 2011), además de representar un papel sumamente importante en procesos de micorremediación en los ecosistemas (Domka et al., 2019).

Diversos estudios ponen de manifiesto la presencia de una interesante comunidad endofítica asociada a diferentes variedades dentro del género *Musa*, con propiedades frente a plagas y enfermedades, y con capacidad para favorecer el crecimiento del cultivo (Martín, 2007; Dagamac et al., 2008; Machungo et al., 2009; Waweru et al., 2015).

3 OBJETIVO

En este trabajo se plantearon dos objetivos:

- Inocular en campo dos especies de hongos endófitos del género *Aspergillus* para que colonicen los tejidos vegetales del cultivo.
- Realizar una suelta controlada de picudo y establecer el grado de protección que dichos hongos endófitos pueden aportar a la platanera frente al ataque del insecto plaga en condiciones de campo.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo representa la continuación de los ensayos llevados a cabo con anterioridad en la finca experimental “La Quinta Roja”, perteneciente al Cabildo Insular de Tenerife, y ubicada en el municipio de Garachico. En los ensayos previos fueron cuatro los hongos inoculados para valorar su capacidad de colonización y efecto en la producción (Cabrera et al., 2017) para este segundo ensayo fueron seleccionadas las dos especies que mejores resultados habían mostrado en laboratorio frente a *C. sordidus*: los hongos *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn y *Aspergillus flavus* Link (Martín, 2007).

4.1 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS EN EL LABORATORIO

Siguiendo el protocolo llevado a cabo en Cabrera et al., 2017, para cada hongo se prepararon 12 erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con 100 gramos de arroz y 50 ml de agua destilada. Este material, una vez esterilizado, fue sembrado con fragmentos del hongo endófito en condiciones de asepsia, empleando para ello una cámara de flujo laminar. Los matraces inoculados se mantuvieron en condiciones de oscuridad y a 25 grados, observándose de forma periódica para comprobar el crecimiento fúngico y la posible aparición de contaminaciones.

Trascurridas tres semanas desde la siembra, se prepararon bolsas herméticas con 10 gramos de arroz inoculado para poder trasladar fácilmente el material a campo.

Efecto de la inoculación de hongos endófitos en platanera frente al ataque del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*)



Foto 1: Hongos seleccionados para el ensayo



Foto 2: Inóculo embolsado para su aplicación en campo

4.2 LOCALIZACIÓN DEL ENSAYO Y DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El ensayo de campo se llevó a cabo en la Finca experimental situada en el norte de Tenerife en el municipio de Garachico, denominada “La Quinta Roja” y propiedad del Cabildo Insular de Tenerife. La planta empleada corresponde a platanera de cultivo in vitro de la variedad Brier.



Imágenes ©2020 GRAFCAN, Maxar Technologies, Datos del mapa ©2020 50 m

Foto 3: Vista aérea de la parcela objeto del ensayo

La inoculación de las plantas fue previa a su siembra en la parcela, y cada maceta fue regada inmediatamente después de la inoculación para favorecer la penetración del hongo en el cepellón. Una vez etiquetadas, las plataneras fueron sembradas en la parcela, estableciéndose un diseño estadístico del ensayo en bloques al azar con 4 tratamientos: T1 (*A. oryzae*), T2 (*A. flavus*), T3 (*A. oryzae* + *A. flavus*) y T4 (testigo, sin inóculo). Cada bloque constaba de 5 plantas, y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.



Efecto de la inoculación de hongos endófitos en platanera frente al ataque del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*)

INFORMACIÓN TÉCNICA



Foto 4: Parcela seleccionada para el ensayo



Foto 5: Plataneras inoculadas listas para sembrar



Foto 6: Plantas preparadas en campo para su plantación



Foto 7: Parcela con las plantas recién plantadas

A los cuatro meses de la siembra, se procedió a la toma de muestras del pseudotallo para confirmar el asentamiento de los hongos endófitos en los tejidos vegetales. Se tomaron muestras de cuatro plantas por tratamiento, dichas muestras fueron llevadas al laboratorio, desinfectadas superficialmente (Giménez, 2006), cortadas en fragmentos pequeños y sembradas en placas Petri con medio de cultivo. Se prepararon dos placas por muestra, y en cada una de ellas se colocaron 4 fragmentos de pseudotallo. Las placas fueron mantenidas en oscuridad y a 25°C, y revisadas diariamente para observar el crecimiento de los endófitos inoculados.



Foto 8: Detalle de la toma de muestras en campo



Foto 9: Muestras de pseudotallo

Efecto de la inoculación de hongos endófitos en platanera frente al ataque del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*)



Foto10: Desinfección superficial de las muestras



Foto 11: Crecimiento del hongo endófito

Tras confirmar la presencia de los organismos fúngicos en el tejido vegetal sembrado, y en base a los resultados obtenidos en el ensayo previo de Cabrera et al. 2017, se decidió realizar una segunda inoculación a los cinco meses de la primera, para asegurar la persistencia de los hongos endófitos en los tejidos del vegetal antes de proceder a la suelta de los picudos. Se añadieron 80 gr de arroz inoculado a cada planta tratada y se regó cada una de ellas con 10 litros de agua. También en este caso se tomaron muestras a los tres meses, siguiendo el mismo procedimiento que la primera vez, comprobándose que el hongo seguía estando presente en el pseudotallo.



Foto12: Preparación de la mezcla inóculo



Foto 13: Riego de cada planta con el segundo inóculo

Transcurridos nueve meses desde la primera inoculación, se lleva a cabo la suelta de los picudos, nueve individuos por planta. Para ello se humedece una zona próxima a la planta y se colocan los nueve individuos tapándolos posteriormente con un fragmento de hoja.



Foto14: Adultos de picudos para colocar en planta



Foto 15: Colocación de picudos en cada planta



Foto 16: Adultos de picudos colocados en planta



Foto 17: Picudos en campo cubiertos con hoja

Normalmente las evaluaciones de daño del picudo en musáceas se realizan en el momento de la cosecha, destruyendo el cormo de la planta madre (Cubillo et al., 2001). El muestreo comenzó a los cinco meses de la suelta del picudo, los cormos fueron limpiados y revisados, y se determinó el porcentaje de daño. Cubillo et al. 2001 describen que, si en la superficie no se encuentra ningún daño, se le asigna un coeficiente de infestación de cero; si por el contrario, el área está totalmente cubierta con minas, galerías y pudriciones, el coeficiente de infestación asignado será 100, asignándose valores intermedios en función de los daños observados. En la valoración de nuestro ensayo, hemos seguido el protocolo descrito en Cubillo et al., 2001, pero con la siguiente modificación: en lugar de analizar los daños en la periferia del cormo, se determinó el daño presente realizando cortes transversales del cormo de la planta.

TABLA 1: Coeficiente de daño en la periferia del cormo por el picudo *Cosmopolites sordidus* [Cubillo et al., 2001, modificado]

Coeficiente de daño (%)	Descripción
0	Sin galerías
5	Presencia de trazas de galerías
10	Daño intermedio entre los coeficientes 5 y 20
20	Un cuarto del área está afectada por perforaciones y pudriciones
30	Daño intermedio entre los coeficientes 20 y 40
40	La mitad del área está afectada por perforaciones y pudriciones
60	Tres cuartas partes están afectadas por perforaciones y pudriciones
100	Toda el área está cubierta por perforaciones



Foto 18: Cormo con daño del 100%



Foto 19: Cormo con un daño del 60%.



Foto 20: Cormo sano



Foto 21: Detalle de la larva en el interior del cormo

5 RESULTADOS

En cuanto a la recuperación de los aislados fúngicos a partir de las muestras de pseudotallo analizadas en el laboratorio, y tal y como se muestra en los gráficos 1 y 2, se confirman los resultados obtenidos en el trabajo anterior de Cabrera et al. 2017, con unos porcentajes muy altos tanto en el primer como en el segundo muestreo realizado. Si bien es verdad que en el segundo muestreo se observa un descenso de un 25% y un 11,45% para los tratamientos T1+T2 y T1 respectivamente, los valores obtenidos indican que las dos especies de endófitos siguen presentes en porcentajes elevados en los tejidos de la platanera.

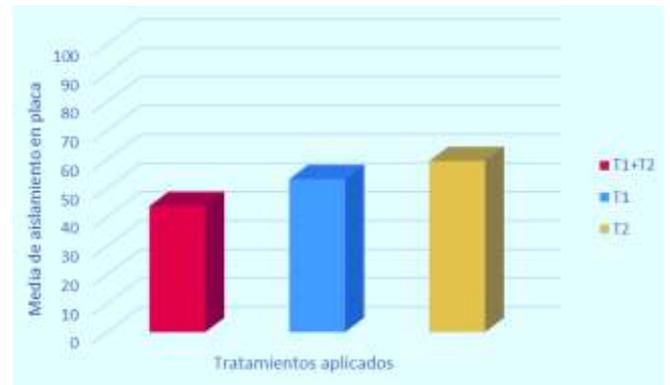
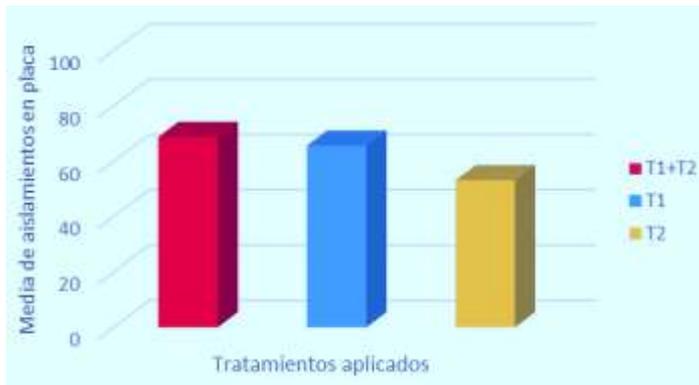


Gráfico 1 y 2: Porcentaje de aislados recuperados en el primer y segundo muestreo respectivamente

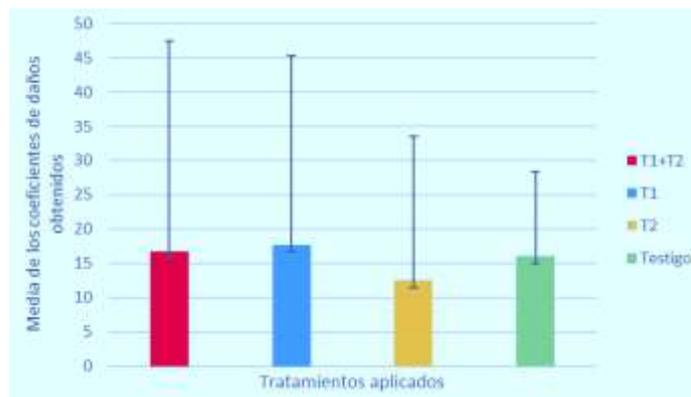


Gráfico 3: Media y desviación estándar del coeficiente de daños para cada tratamiento

Los valores representados en el gráfico 3 muestran las medias y la desviación estándar de los coeficientes de daños obtenidos para cada uno de los tratamientos. Tal y como se puede observar, el tratamiento T2 presentó un descenso en el valor medio de los daños, si lo comparamos con el resto de tratamientos. Con los datos obtenidos se realizó el test no paramétrico permanova, mediante el paquete estadístico PRIMER, obteniéndose un valor del estadístico Pseudo $F_{3,76}=0,146$, que, al ser superior al nivel de significación de 0,05, nos indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La desviación estándar representada en el gráfico superior muestra una dispersión y variabilidad grande en los datos obtenidos, lo cual podría corregirse llevando a cabo el ensayo con un número mayor plantas por tratamiento, lo que implicaría más repeticiones y por tanto la obtención de datos más concluyentes.

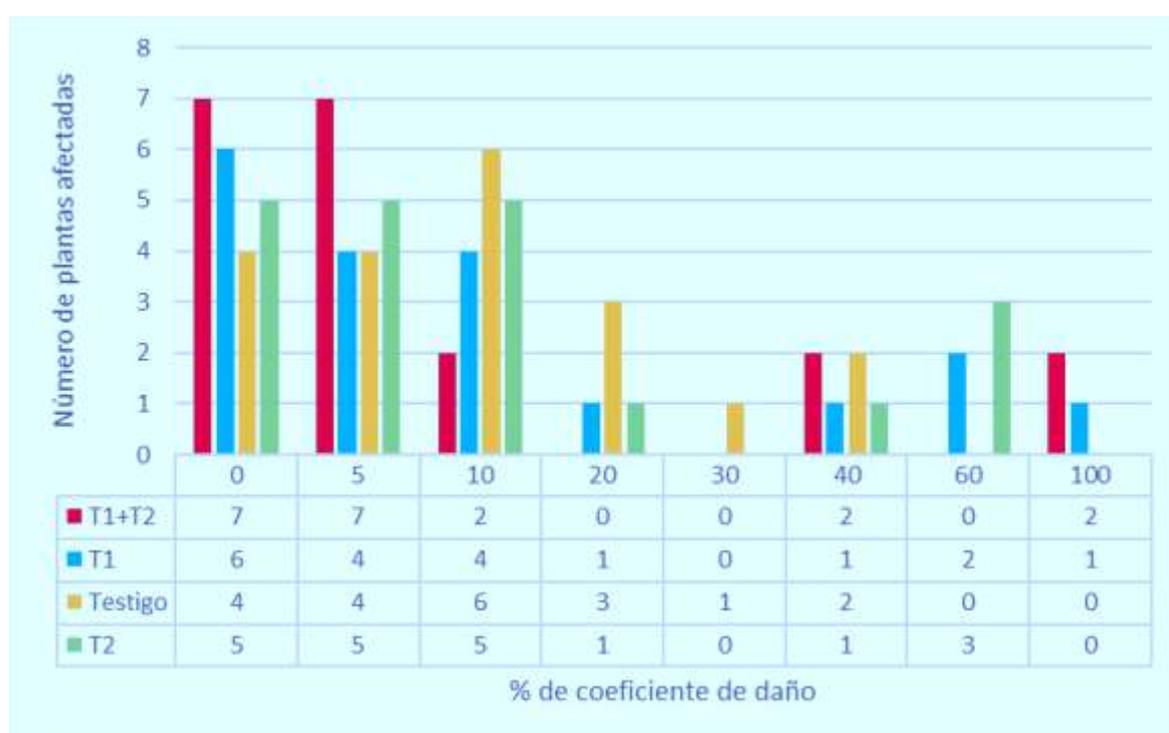


Gráfico 4: Análisis detallado del porcentaje de daño presentado por las plataneras en función del tratamiento aplicado

Si nos dedicamos a analizar el número de plantas afectadas, en función del gradiente de daños establecido por Cubillo et al. 2001 (gráfico 4), podemos observar que la mayor parte de las plantas presentaron porcentajes de daño comprendidos entre el 0 y el 10 %, es decir, poca superficie del corno se vio afectada por el picudo. Sin embargo, no podemos concluir que dicho resultado sea efecto de los organismos endófitos, ya que aparece tanto en las plantas inoculadas como en las testigo.

A pesar de ello, y aunque no haya diferencias significativas, queda patente que en base a los datos registrados los daños fueron menores en aquellas plataneras inoculadas con el hongo *A. flavus*. Por otro lado, la aplicación conjunta de los dos hongos endófitos (tratamiento T3), que a priori se planteó como un posible efecto de sinergia para potenciar la actividad de ambos, no mostró el resultado esperado.

Llevar a cabo una segunda inoculación de los endófitos a lo largo del cultivo permite asegurar la presencia del mismo y por tanto potenciar su efecto sobre la platanera. Se plantea por tanto para ensayos posteriores, seguir esta dinámica y trabajar con un mayor número de plantas para asegurar una menor desviación de los datos obtenidos.



6 AGRADECIMIENTO

Los autores queremos agradecer al personal de la finca experimental “La Quinta Roja” y a los Agentes de Extensión Agraria, Tomás Suárez Encinosa y Eduardo Pérez Álvarez, por su buena disposición a la realización de este trabajo. Asimismo también queremos agradecer a los compañeros Aquilina María Linares Quintero, Alejandro Rodríguez Rodríguez y Yeray Díaz González por el apoyo en la ejecución de este ensayo.

7 BIBLIOGRAFÍA

Abagale, S.A., Woodcock, C.M., Hooper, A.M., Caulfield, J.C., Withall, D., Chamberlain, K., Acquaah, S.O., Van Emden, H., Braimah, H., Pickett, J.A., Birkett, M.A. (2018). (2R,5S)-Theaspiraneldidentified as the Kairomonefor the Banana Weevil, *Cosmopolites sordidus*, from Attractive Senesced Leaves of the Host Banana, *Musa* spp. *Chemistry European Journal*, 24: 9217-9219.

Cabrera, C., Giménez, C., Perera, S., Martín, T. (2017). Inoculación de hongos endófitos en platanera: capacidad de colonización y efecto en la producción. *Información Técnica del Cabildo de Tenerife*. Noviembre 2017. 12 p. En línea:

http://www.agrocabildo.org/publicaciones_detalle.asp?id=630

Cubillo, D., Laprade, S., Vargas, R. (2001). Manual técnico para el manejo integrado de insectos plaga del cultivo de banano. Corporación Bananera Nacional San José – Costa Rica. 11 p.

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.

De Bary HA.(1884). *Vergleichende morphologie und biologie der pilze mycetozen und bacterien*. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann.

Delgado, P., Perera, S., Ríos, D. (2019). Estudio comparativo de feromonas de agregación del picudo de la platanera (*Cosmopolites sordidus*). *Información Técnica del Cabildo de Tenerife*. Agosto 2019. 30 p. En línea: http://www.agrocabildo.org/publicaciones_detalle.asp?id=679

Domka, A.M., Rozpadek, P., Turnau, K. (2019). Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Adaptation of Plants to Metal Toxicity. *Frontiers in Microbiology*. 10:371.

Fancelli, M., Batista Dias, A., Delalibera Júnior, I., Cerqueira de Jesus, S., Souza do Nascimento, A., de Oliveira e Silva, S., Correa Caldas, R., da Silva Ledo, A. (2013). *Beauveria bassiana* Strains for Biological Control of *Cosmopolites sordidus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae) in Plantain. *BioMed Research International*, article ID184756,7pages.

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.

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.

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.

Posada F, Vega FE (2005) Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia* 97:1195–1200.

Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 827–837.

Verma, S.K., Kharwar, R.N., White, J.F. (2019). The role of seed-vectored endophytes in seedling development and establishment. *Symbiosis* 78:107–113.

Yu Wang & Chuan-Chao Dai (2011). Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology* 61:207–215.

Waweru, B., Turoop, L., Kahangi, E., Coyne, D., Dubois, T. (2014). Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes provide field control of nematodes, improving yield of banana (*Musa* sp.). *Biological control* 74:82-88.

Wilson, D. 1995. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*. 73:274–276.



ÁREA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA Y PESCA

Servicio Técnico de Agricultura y
Desarrollo Rural



Donde estamos



Unidad Central	C/ Alcalde Mandillo Tejera, 8 S/C de Tenerife	922 239 275	servicioagr@tenerife.es
AEA La Laguna	Plaza del Adelantado, 11 Ed. Apartamentos Nivaria	922 257 153	aeall@tenerife.es
AEA Tejina	C/ Palermo, 2.	922 546 311	aeate@tenerife.es
AEA Tacoronte	Ctra. Tacoronte-Tejina, 15	922 573 310	aeata@tenerife.es
AEA La Orotava	Plaza de la Constitución, 4	922 328 009	aealao@tenerife.es
AEA Icod	C/ Key Muñoz, 5	922 815 700	aeaicod@tenerife.es
AEA El Tanque	Carretera TF-373, km 14 ECOMUSEO	686 288 544	aeaeltanque@tenerife.es
AEA Buenavista	C/ El Horno, 1	922 129 000	aeabu@tenerife.es
AEA Guía de Isora	Avda. de la Constitución s/n.	922 850 877	aeagi@tenerife.es
AEA Valle San Lorenzo	Ctra. General, 122	922 767 001	aeavsl@tenerife.es
AEA Granadilla	San Antonio, 13	922 447 100	aeagr@tenerife.es
AEA Arico	C/ Benítez de Lugo, 1	922 161 390	aeaar@tenerife.es
AEA Fasnia	Ctra. Los Roques, 21	922 530 900	aeaf@tenerife.es
AEA 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	922 445 841	ccbiodiversidad@tenerife.es
Oficina de Asesoramiento al Regante	Finca La Quinta Roja Carretera General TF-42 (San Pedro-Las Cruces) Garachico	680 846 946	oficinadelregante@tenerife.es

