



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

POSADA A PUNT D'UNA PRÀCTICA DE LABORATORI DE FITOPATOLOGIA PER ALUMNES QUE CURSIN GRAUS DE L'ÀMBIT DE LES BIOCIÈNCIES

Organització, paràmetres a avaluar i resultats

1.

- Martos, Soledad
Universitat Autònoma de Barcelona
Unitat de Fisiologia Vegetal. Departament BABVE. Edifici C, Facultat de Biociències.
08193 Bellaterra, Barcelona, Espanya.
soledad.martos@uab.cat
- Portero, Jordi
Universitat Autònoma de Barcelona
Unitat de Fisiologia Vegetal. Departament BABVE. Edifici C, Facultat de Biociències.
08193 Bellaterra, Barcelona, Espanya.
jordi.portero@hotmail.com
- Poschenrieder, Charlotte
Universitat Autònoma de Barcelona
Unitat de Fisiologia Vegetal. Departament BABVE. Edifici C, Facultat de Biociències.
08193 Bellaterra, Barcelona, Espanya.
Charlotte.Poschenrieder@uab.es

1. **RESUM:** Aquest treball va tenir l'objectiu de posar a punt una pràctica de laboratori de l'àmbit de la Fitopatologia (ciència que estudia les malalties i plagues en plantes) per a que els alumnes puguin aplicar els coneixements teòrics i adquirir-ne de nous en un àmbit pràctic. El binomi planta-patogen seleccionat va ser la mongeta i el fong *Fusarium solani*. S'ha dissenyat una pràctica pel reduït calendari amb una inoculació artificial i on també es veu l'efecte de les toxines produïdes pel fong.
2. **ABSTRACT:** The aim of this work was to set up a practical work related to Phytopathology, which study diseases and pests in plants. Thanks to this practical work the students will apply the knowledge given in class and will also acquire new skills in



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

a practical environment. The selected binomial was the bean plant and the fungi *Fusarium solani*. The protocol was designed according to a tight schedule where an artificial inoculation will be done as well as a plant study of the effect of fungal toxins.

3. **PARAULES CLAU:** pràctica de laboratori, graus de Biociències, malalties de plantes, *Fusarium solani* f. sp. phaseoli, mongetera, pesolera / **KEYWORDS:** practical-activity for bioscience degrees, plant diseases, *Fusarium solani* f. sp. phaseoli, green bean plant, pea plant.

4. DESENVOLUPAMENT:

a) Objectius:

L'assignatura de Fisiologia Vegetal Aplicada s'imparteix com a optativa de primer semestre a alumnes de 4º curs dels graus de Biologia, Biologia Ambiental, Bioquímica, Biotecnologia i Microbiologia de la facultat de Biociències de la UAB. L'objectiu general va ser posar a punt una pràctica de laboratori relacionada amb l'àmbit de la Fitopatologia, ja que és un tema ben desenvolupat a teoria però pel qual no hi ha pràctica de laboratori. El pla és introduir la nova pràctica pel curs 2014-2015 i es sumarà a les 5 pràctiques que es cursen actualment.

La Fitopatologia és la ciència que s'encarrega d'estudiar les malalties i plagues que afecten a les plantes, essent els fongs els patògens més abundants. Per tant, es va treballar amb una planta hoste, un fong patogen i es van fixar les condicions òptimes per a que es desenvolupessin símptomes de malaltia.

Es van plantejar dos objectius parcials a assolir a partir del objectiu general:

- 1) Analitzar els símptomes produïts per un fong, a partir de inoculacions artificials, sobre planta.
- 2) Analitzar els símptomes generats per les toxines del fong, obtingudes a partir de cultiu *in vitro*, sobre planta.



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

L'objectiu pedagògic d'aquesta pràctica és que els alumnes puguin aplicar els coneixements de fitopatologia que es donen a classe en un context pràctic que servirà per finançar-los. D'igual manera adquiriran coneixements de protocols aplicats en fitopatologia difícilment transmissibles de forma eficient a classe de teoria. Les competències adquirides amb aquesta pràctica coincideixen a les marcades a la guia docent de l'assignatura i són la obtenció, observació, maneig, recol·lecció i conservació d'espècimens així com la gestió de la informació. Com a resultats d'aprenentatge, es familiaritzaran amb protocols i tècniques de fisiologia vegetal aplicada i milloraran la interpretació dels resultats obtinguts en els seus propis experiments.

Aquest estudi s'ha finançat amb el projecte BFU2010-14873 del MICINN.

b) Descripció del treball:

Com a planta hoste, es va decidir treballar amb lleguminoses ja que tenen un creixement ràpid des de llavor i es fan servir com a model per pràctiques d'altres assignatures en el nostre grup. Això ens assegura obtenir plantes crescudes en les millors condicions i en el seu estat òptim per poder utilitzar-les en els experiments. Concretament, es va triar la mongeta (*Phaseolus vulgaris*) i es van utilitzar llavors de dos varietats comercials "Contender" i "Parma" (Batlle, Barcelona, Espanya) per saber quina varietat dona els millors resultats i finalment triar-la per la pràctica amb els alumnes.

Entre els patògens, es va escollir el fong específic de mongeta, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Aquest fong està descrit com a patògen de mongeta i produeix pudrició d'arrels que generen importants problemes en els conreus (Burke i Hall, 1991). Es va adquirir un aïllat del fong a la CBS-KNAW *Fungal Biodiversity Centre* (Utrecht, Països Baixos). Un cop arribat l'aïllat es va posar a créixer en medi de cultiu sòlid PDA (Difco Laboratories, Michigan, EE.UU.) i es manté un cultiu en estat latent que forma part de la micoteca del laboratori i que s'activarà en el moment que sigui necessari.

El binomi mongeta-*Fusarium* s'ha estudiat àmpliament i s'ha fet servir com a model fitopatològic en les últimes quatre dècades (Filion et al. 2003; Nelson et al. 1981). La idea



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

original d'aquest treball es va prendre del llibre "*Plant Pathology: concepts and laboratory exercises*" de Trigiano et al. (2008) i s'ha adaptat als temps i condicions que tindrem amb els alumnes.

Amb la intenció de fiançar el concepte de patogen específic explicat a teoria, s'han fet servir plantes de pèsol (*Pisum sativum*), hoste no específic de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* i que no mostra afectació. Les llavors utilitzades van ser de la varietat comercial "Rondo" (Batlle, Barcelona, Espanya).

– Objectiu parcial 1: Síntomes causats per inoculacions artificials.

El fong es va fer créixer en plaques de Petri amb PDA fins que desenvolupa estructures reproductives (conidis). El creixement del fong és lent, per tant, s'ha de activar-lo al menys 3 setmanes abans de fer les inoculacions. Les llavors de mongeta i pèsol es van fer germinar entre papers humits durant 10 dies i en condicions controlades de llum i temperatura.

Transcorregut aquest temps, es van fer les inoculacions. Afegint 4 ml de medi de cultiu líquid PDB (Difco Laboratories, Michigan, EE.UU.) sobre del fong, es va rascar la superfície amb un bisturí prèviament esterilitzat per arrossegar els conidis formats. La concentració de conidis es va ajustar a 1×10^6 conidis/ml amb ajuda de una cambra de Neubauer. Les arrels de les plantes es van retallar amb unes tisores per produir ferides que el fong aprofitarà per colonitzar i es van submergir en la suspensió de conidis durant 2 min. Per les plantes control, aquelles no inoculades amb el fong però que es sotmeten a les mateixes condicions que les inoculades, es van submergir les arrels en medi de cultiu líquid durant 2 min. Per tots dos grups es van utilitzar 5 plantes com a rèpliques. Posteriorment, les plantes es plantaven en safates d'alvèols en els quals hi havia una barreja de terra, vermiculita i perlita (2:1:1). El preparat de terra es va autoclavar dos cops per assegurar uns substrat lliure de microorganismes. Just abans de les inoculacions es va mesurar la llargada de les tiges de cada planta. Les plantes es van mantenir en condicions controlades de llum i



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

temperatura durant una setmana. L'experiment complert es va repetir 3 vegades per assegurar-nos que els resultats fossin consistents i reproduïbles.

Transcorregut aquest temps, es tornen a mesurar la llargada de les tiges. El paràmetre a analitzar per estudiar els símptomes produïts pel fong és el increment del tamany de la tija comparant les plantes inoculades amb les control. Per obtenir un segon paràmetre quantitatiu es mesura la biomassa foliar de les plantes inoculades i controls en acabar l'experiment. A nivell qualitatiu, es compara visualment les arrels de les mongetes inoculades amb les no inoculades per analitzar la simptomatologia típica produïda pel fong; enfosquiment i pudrició d'arrels. De igual manera, es van comparar les arrels inoculades de mongeta i pèsol per comprovar l'especificitat del fong i demostrar que el pèsol no es troba afectat.

– Objectiu parcial 2: Símptomes causats per les toxines del fong.

El fong es va fer créixer en Erlenmeyers amb medi de cultiu líquid Czapek-Dox, (Difco Laboratories, Michigan, EE.UU.) durant una setmana. El cultiu es va desenvolupar en condicions axèniques, en foscor i agitació. A la setmana es va filtrar el medi amb una gassa per eliminar el miceli format i es va comprovar que no hi haguessin conidis. Es vol demostra que la simptomatologia es deguda a les toxines que s'han produït en el medi i no a una possible infecció amb conidis.

Es van taller les tiges de mongeteres i pesoleres de 10 dies i es va pesar la part aèria per posteriorment submergir-les en concentracions de toxines de 1, 10 i 25% (diluïdes en medi de cultiu Czapek-Dox). El grup control es va submergir només en medi de cultiu sense toxines i, en aquest cas, es van utilitzar 3 rèpliques per cada grup. Per aquesta part també es van fer 3 repeticions per assegurar els resultats.

Es van fer observacions a les 24, 48 i 72 hores dels símptomes en fulles i transcorreguts els 3 dies es va anotar de nou el pes fresc de tija i fulles conjuntament. El paràmetre a analitzar per estudiar els símptomes produïts per les toxines del fong és la variació en el pes de la



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

part aèria de les plantes inoculades amb les control. Les plantes de pèsol són el control negatiu per aquest paràmetre i novament comprovarem la especificitat del fong.

c) Resultats i conclusions:

Inoculacions artificials de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* en planta

El pes que té la fitopatologia en el temari de teoria de l'assignatura fa necessari introduir una pràctica de laboratori sobre aquest camp. Davant de la necessitat de crear una nova pràctica s'ha dissenyat un protocol per poder portar-lo a terme en la durada d'un grup de pràctiques (4 dies).

Els 4 dies de duració d'un grup de pràctiques limita el tema de les inoculacions ja que per veure algun símptoma en planta es necessiten al menys 7 dies. Com que les pràctiques són correlatives, la solució que plantegem és que els alumnes d'un grup facin les inoculacions del següent grup. Per la part de toxines, per contra, és possible que un mateix grup faci la manipulació i obtingui resultats.

El biosistema planta-patogen escollit presenta unes característiques òptimes per utilitzar-los amb el nostre objectiu. En relació a les inoculacions en planta, en una setmana s'aconsegueixen veure símptomes clars produïts pel fong en les mongeteres inoculades (imatge 1). Aquests resultats demostren que els alumnes podran visualitzar i mesurar els efectes de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* sobre mongetera i comprovar la especificitat en mongeta i no en pèsol en una setmana de duració del experiment.



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS



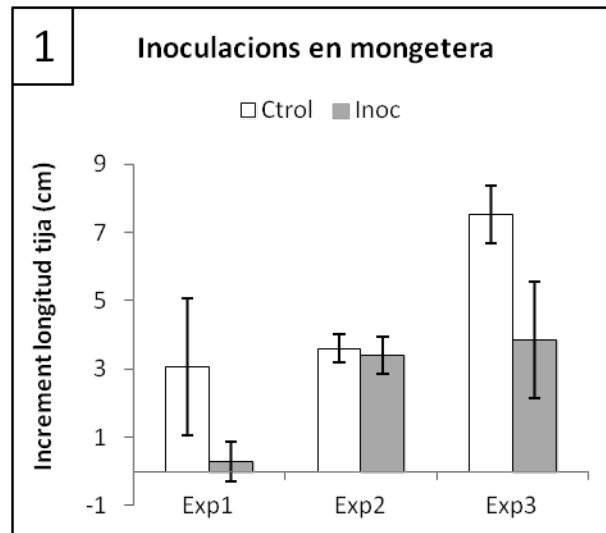
Imatge 1: Plantes de mongeta i pèsol inoculades amb *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (esquerra) i plantes control (dreta). Evidència de la reducció de biomassa en les plantes inoculades.

Comparant els resultats obtinguts entre les dues varietats de mongetera utilitzades, “Contender” i “Parma”, es considera més adequat treballar amb “Contender” ja que les tiges de la varietat “Parma” són més fràgils i molt més llargues el que dificulta la seva manipulació. Es decideix, per tant, que la pràctica amb els alumnes es faran amb mongeteres de la varietat “Contender”.

En un principi va ser la longitud de la tija el paràmetre escollit per analitzar els efectes del fong sobre la planta però es va descartar al veure la gran variabilitat de tamany que mostraven les plantes. Es va considerar més adient treballar amb el increment de la longitud de la tija posterior a la inoculació. Igualment aquest paràmetre es va comportar de manera molt variable en els tres experiments rèpliques que es van fer (gràfic 1). La primera inoculació va reduir el creixement de les tiges en un 90%, la segona només un 6% i la tercera un 49%. El solapament en les desviacions de plantes inoculades i control no ha permès obtenir diferències significatives entre ambdós tractaments. Tot i les grans desviacions, es pot intuir una tendència amb un creixement major de les plantes control comparat amb les plantes inoculades. Malgrat la seva variabilitat, considerem que aquest paràmetre pot ser interessant de mesurar pels alumnes ja que en els tres experiments ha donat el resultat esperat.

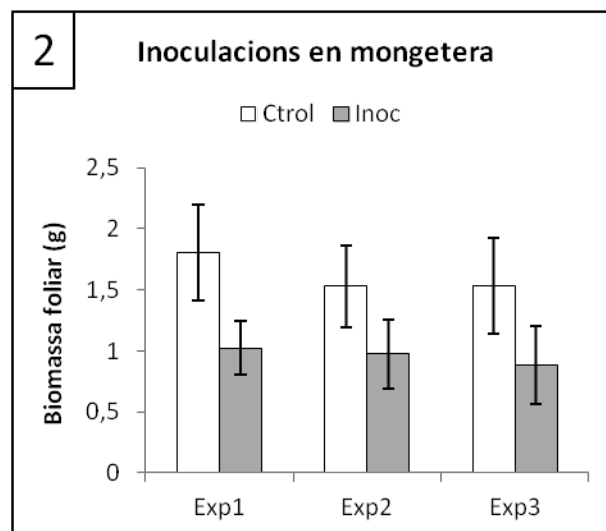


MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS



Gràfic 1: Efecte de la inoculació de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* sobre el increment en longitud de les tiges en mongetera. Plantes control en blanc i plantes inoculades en gris. Les barres de desviació són les desviacions estàndards registrades en 5 plantes.

El segon paràmetre quantitatiu analitzat, la biomassa de les fulles per contra va mostrar resultats molt més homogenis i clars (gràfic 2).

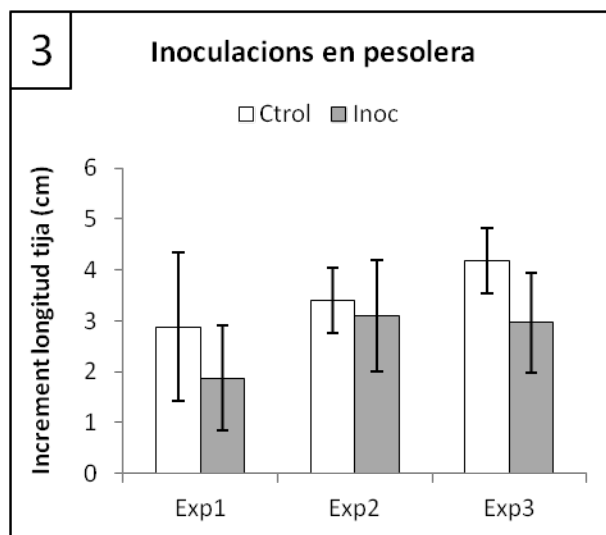


Gràfic 2: Efecte de la inoculació de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* sobre la biomassa foliar en mongetera. Plantes control en blanc i plantes inoculades en gris. Les barres de desviació són les desviacions estàndards registrades en 5 plantes.



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

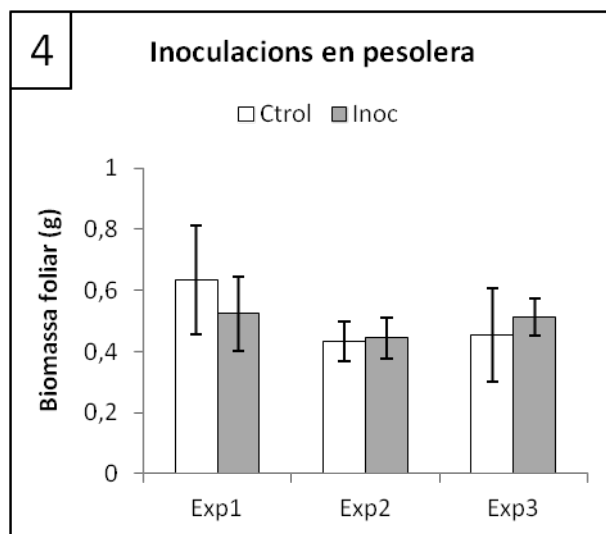
Amb evidència estadística (Test de Fisher, $p > 0,05$) es comprova que les plantes inoculades tenen de mitjana menor biomassa foliar que les plantes control. Els tres experiments van donar resultats molt semblants i es pot veure que les plantes inoculades mostren de mitjana un 40% menys de biomassa que les plantes control. En inoculacions de *Fusarium* sobre pesolera, els dos paràmetres estudiats no van mostrar diferències significatives el que demostra que el fong és un paràsit específic de mongetera (gràfics 3 i 4).



Gràfic 3: Efecte de la inoculació de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* sobre el increment en longitud de les tiges en pesolera. Plantes control en blanc i plantes inoculades en gris. Les barres de desviació són les desviacions estàndards registrades en 5 plantes.



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS



Gràfic 4: Efecte de la inoculació de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* sobre la biomassa foliar en pesolera. Plantes control en blanc i plantes inoculades en gris. Les barres de desviació són les desviacions estàndards registrades en 5 plantes.

Comparant les arrels de plantes inoculades i control, es veu que la longitud de les necrosis en mongeteres inoculades arriba fins els 3,8 cm (imatge 2) mentre que les mongeteres no inoculades no mostren cap enfosquiment de les arrels. Es comprova que com a fong de teixit vascular que és, *Fusarium* malmet el sistema de transport d'aigua i nutrients a les arrels. En referència a la especificitat del fong, es comprova que les arrels de les pesoleres tampoc mostren cap necrosi. Aquesta observació permetrà als alumnes confirmar novament que el pèsol, a diferència de la mongeta, no és un hoste específic d'aquesta espècie de *Fusarium*.

Per tant del primer objectiu plantejat, es conclou que *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* redueix el creixement i la biomassa de forma específica en les mongeteres inoculades en experiments d'una setmana de durada.



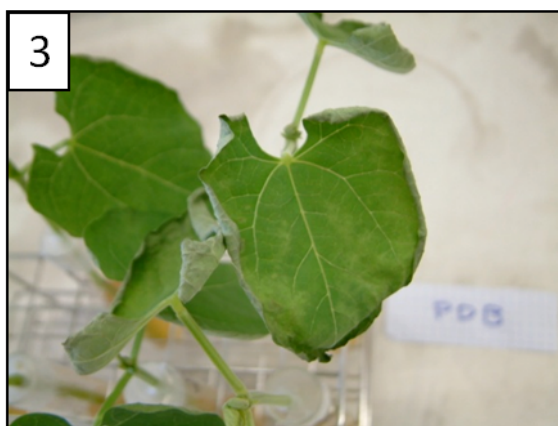
MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS



Imatge 2: Detall de les necrosis d'arrels en mongeteres inoculades amb *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*.

Efecte de les toxines *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* en planta

Podem confirmar que aquesta espècie de *Fusarium* produeix una quantitat molt important de toxines en medi líquid apreciable per la deshidratació i les clorosis que s'observen a les fulles de les plantes exposades (imatge 3).

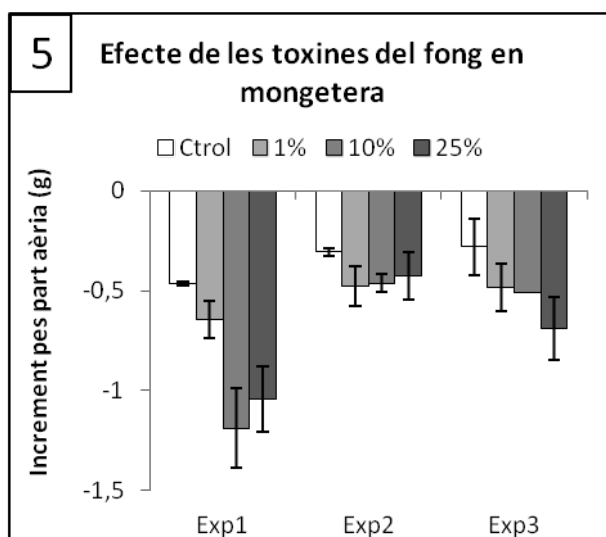


Imatge 3: Evidència de la deshidratació i clorosis que es formen en fulles de mongeta en contacte amb les toxines produïdes en medi de cultiu líquid.



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

En un principi es va decidir fer l'estudi del efecte de les toxines en planta mesurant el pes final de les fulles però es va descartar aquest paràmetre, tal i com ocórrer amb l'objectiu 1, al veure la gran variabilitat de tamany que mostraven les plantes. Es va considerar més adequat treballar amb la variació de pes de la part aèria provocat per la inoculació. La variació de pes també es va comportar de manera variable en els tres experiments rèplica que es van fer (gràfic 5). El resultat més evident és que totes les plantes van perdre pes, això pot ser degut a una possible deshidratació provocada per la manipulació de les plantes. Recordem que per posar en contacte les plantes amb les toxines es van separar les arrels de la tija i aquesta es va submergir en el medi de cultiu amb les toxines diluïdes.



Gràfic 5: Efecte de les toxines produïdes per *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* sobre el increment del pes de la part aèria en mongetera. Plantes control en blanc i plantes exposades a 1, 10 i 25% de toxines en escala de grisos. Les barres de desviació són les desviacions estàndard registrades en 3 plantes.

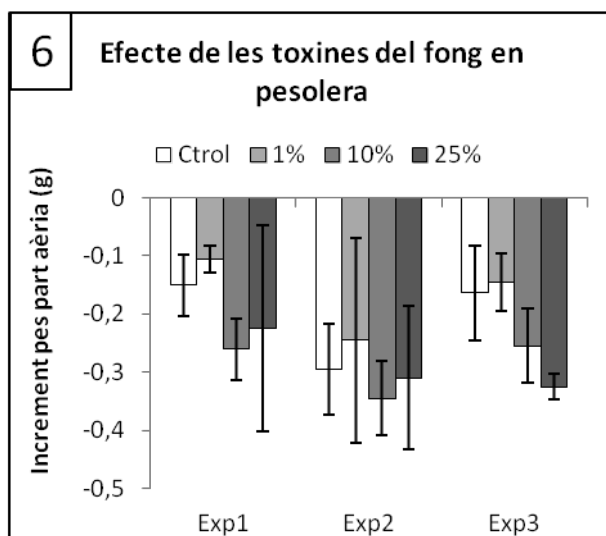
Probablement és una manipulació massa agressiva i l'efecte es fa evident per la reducció de pes fins i tot a les plantes control. El primer experiment va ser el més evident de tots tres, i es va veure que la concentració més baixa de toxines (1%) era capaç de reduir el pes de la part aèria de manera significativa comparant amb el control. La concentració del 10% (9 parts de medi de cultiu i 1 de toxines) va reduir la biomassa en un 56% si es compara amb



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

les plantes no exposades a toxines. A l'experiment 3, aquesta va ser la concentració efectiva per veure reduït aquest paràmetre. Per contra, l'experiment 2 no va mostrar resultats positius. A part de la pèrdua de biomassa, les fulles exposades a les toxines van mostrar alteracions en el contingut de clorofil·la apreciable per l'aparició de clorosis a les fulles.

Quan es va posar en contacte les pesoleres amb les toxines produïdes per *Fusarium*, es pot apreciar cert efecte sobre aquesta espècie tot i que no tan destacable com a les plantes de mongeta (gràfic 6). A part de la reducció del pes, el més apreciable va ser l'aparició de petites clorosis a les fulles símptoma inequívoc de que la toxina ha produït dany a la fulla de pèsol.



Gràfic 6: Efecte de les toxines produïdes per *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* sobre el increment del pes de la part aèria en pesolera. Plantes control en blanc i plantes exposades a 1, 10 i 25% de toxines en escala de grisos. Les barres de desviació són les desviacions estàndard registrades en 3 plantes.

Per tant del segon objectiu plantejat, es conclou que *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* produeix una gran quantitat de toxines en medi de cultiu líquid i que l'exposició a concentracions baixes redueix la biomassa de les mongeteres i aquestes mostren clorosis molt evidents en només 3 dies. L'aparició de petites clorosis sobre plantes de pèsol permetrà recordar un concepte vist a teoria i és la presència de receptors específics en



MODELS FLEXIBLES DE FORMACIÓ: UNA RESPOSTA A LES NECESSITATS ACTUALS

pesoleres de les toxines del fong. Per tant, la toxina que produeix aquesta espècie de *Fusarium* no es pot dir que sigui específica de mongeta però caldrà recordar que, en la prova anterior, el fong no va ser capaç d'infectar la pesolera. Només quan forcem i exposem de manera artificial el contacte entre les toxines i el pèsol, aquest mostra símptomes lleus en fulla.

5. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Burke, D. W., and Hall, R. 1991. *Fusarium* root rot. Pages 9-10 in: Compendium of Bean Diseases. R. Hall, ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Filion, M., St-Arnaud, M. and Jabaji-Hare, S. H. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in Mycorrhizal Bean Plants and Surrounding Mycorrhizosphere Soil Using Real-Time Polymerase Chain Reaction and Direct Isolations on Selective Media. *Phytopathology* Vol. 93, No. 2, 229-235.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Cook, R. J. 1981. *Fusarium*: Diseases, biology, and taxonomy. The Pennsylvania State University Press, University Park.

Trigiano, R. N., Windham, M. T., and Windham, A. S. (eds.) 2008. *Plant Pathology: concepts and laboratory exercises*. 2nd edition. CRC Press.