

ACTIVIDAD FUNGICIDA DE ESPECIES DE CLADOBOTRYUM SOBRE CLADOSPORIUM COLOCASIAE Y CLADOSPORIUM OXYSPORUM

Yarelis Ortiz Núñez, Rafael F. Castañeda Ruíz, María E. Alvarez Váldez, Yannin Lorenzo Rodríguez, Beatriz Ramos García, Liuba Plana Pérez, Irma Marrero Granado, Doris García Vázquez, Yuliet Aguado Rodríguez, María E. Ruenes Figueroa y Daylín Gamio Tea Turro

RESUMEN

En los últimos años existe una tendencia a incrementar la producción, comercialización y uso de bioplaguicidas, sobre todo para los cultivos de consumo fresco y el tratamiento de grandes áreas urbanas, donde el empleo de productos químicos provoca alteraciones irreversibles en el medio ambiente. En este sentido, los microorganismos y en especial, los hongos, constituyen un grupo importante de organismos con uso fitosanitario, debido a su alta biodiversidad y capacidad biosintética. Por su parte, el INIFAT posee una Colección de Cultivos Puros de Hongos (WFCC 853) de reconocimiento internacional con más de 6000 cepas aisladas de bosques tropicales, de ellas 1032 de hongos nuevos y pocos comunes, los cuales constituyen una valiosa fuente de riqueza, aún inexplorada. Teniendo en cuenta lo anterior, nos propusimos como objetivo de este trabajo evaluar la actividad fungicida de tres cepas nuevas del género *Cladobotryum*: *C. pinarense* (1789), *C. semicircularis* (1698) y *C. virescens* (C10/110) frente a dos especies fitopatógenas de *Cladosporium* de importancia económica. Para ello, se crecieron las cepas en los medios de papa y zanahoria mejorado, bajo condiciones de zaranda, durante 5 y 10 días. Posteriormente, los caldos de cultivos fueron filtrados y evaluados sobre las especies patógenas, utilizando el método Bioautográfico por Cromatografía en Capa Fina. Las cepas 1789 y C10/110 mostraron una marcada inhibición frente a *Cladosporium colocasiae* y *Cladosporium oxysporum*, siendo más ligera para la cepa 1698. Estos resultados novedosos son alentadores para continuar estudios en estas cepas referidos a la obtención de bioproductos para el control de enfermedades, así como, para el estudio de los metabolitos responsables de tal actividad.

Palabras claves: hongos, bioproductos, *Cladosporium*

Fungicidal activity of cladobotryum species against *Cladosporium colocasiae* and *Cladosporium oxysporum*

ABSTRACT

During the last years the tendency is increasing the production and commercialization of biopesticide's uses, even for fresh crop and the treatment of a big urban areas, where the use of chemical products cause irreversible damages at environment. In this way, the microorganisms, especially fungi, are a very important organism groups

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical «Alejandro de Humboldt» (INIFAT)
✉ dpplantas@inifat.co.cu

with phytosanitary use, due to the high biodiversity and biosynthetic ability. On the other hand, INIFAT, has an International recognized World Federation Culture Collections (WFCC 853) over a 6,000 sample isolates from tropical forests; from those, 1032 new and little common fungi, which are a very rich unknown source. On the present paper the fungicide activity of tree new *Cladobotryum* strains (*C. pinarense* (1789), *C. semicircularare* (1698) y *C. virescens* (C10/110)) were tested against two economic *Cladosporium* phytopathogen species. The fungal strains were grown on potato and carrot culture-enriched by shaking condition for 5 –10 days. The cultures were leaked and evaluated by bioautographic TLC assay against pathogen species. The strains 1789 and C10/110 show a very high inhibition against *Cladosporium colocasiae* and *C. oxysporum*, and 1698 strain, just a weak. Those results are good for going on studying the strains as well as, the responsible secondary metabolites of this activity.

Key words: fungi, bioproducts, *Cladosporium*

INTRODUCCIÓN

Los hongos microscópicos resultan un recurso altamente diverso y abundante en la naturaleza con un alto potencial biotecnológico. En el sector agrícola, el empleo de estos micromicetos como biofertilizantes, bioestimulantes y bioplaguicidas es una de las estrategias para el manejo sustentable de los agroecosistemas, representando una alternativa para sustituir la aplicación de sustancias tóxicas que han contaminado los suelos y el agua en las áreas en donde se práctica la agricultura en forma intensiva (Cox y Glod, 2004; Chirinos *et al.*, 2006). Sin embargo, se estima que menos del 1 % de la diversidad microbiana ha sido aislada y un porcentaje menor evaluada para la obtención de nuevos productos, aún cuando son considerados el grupo de organismos más diverso después de los insectos (Heredia, 2008). Por su parte, las zonas tropicales y subtropicales han sido poco exploradas en cuanto a su diversidad microbiana, siendo prácticamente desconocido su potencial bioactivo. En este sentido, y teniendo en cuenta que el INIFAT posee una Micoteca con más de 6000 aislados de hongos del medio tropical, entre ellos 1032 cepas de hongos nuevos, los cuales constituyen una valiosa fuente de riqueza aún inexplorada, nos propusimos como objetivo de este trabajo evaluar el potencial bioactivo de cepas del género *Cladobotryum* sobre dos especies de *Cladosporium*, las cuales causan considerables daños a cultivos de importancia económica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas empleadas

Para este estudio se emplearon tres cepas nuevas del género *Cladobotryum*: *C. pinarense* (1789), *C. semicircularare* (1698) y *C. virescens* (C10/110) conservadas en la Colección de Cultivos Puros de Hongos del INIFAT (WFCC 853), aisladas e identificadas por el Dr. Rafael F. Castañeda Ruiz.

Medios de cultivos utilizados

Los medios de cultivos sólidos Agar-Papa-Dextrosa (PDA) y Agar-Avena (OA) fueron elaborados según los establecido en la CBS Media, 2001.

La composición de los medios líquidos empleados fue la siguiente:

Medio de Zanahoria enriquecido: Zanahoria (80 g), KH_2PO_4 (1 g), KNO_3 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), KCl (0.5 g), Glucosa (5 g), Agua (1 L). Hervir la Zanahoria (trozos) en agua durante 15 minutos, filtrar, añadir reactivos, completar con agua hasta 1 L de volumen total, ajustar pH a 6.5.

Medio de Papa: Papa (200 g), Glucosa (20 g), Agua (1 L). Hervir la Papa (trozos) en agua durante 15 minutos, filtrar, completar con agua hasta 1 L de volumen total, ajustar pH a 6.5.

Todos los medios fueron posteriormente esterilizados a 121°C.

Fermentación de las cepas en estudio

Las cepas estudiadas fueron transferidas, para su revitalización, a placas *Petri* de 9 cm de diámetro que contenían medio Agar-papa-dextrosa (PDA) las cuales posteriormente se incubaron en cámara húmeda a 25°C, $H_R = 66 \%$, durante siete días. Una vez colonizada totalmente la placa se le realizaron 5 ponches de 0.5 cm por cada cepa sembrada, con los que se inoculó el medio líquido (pre-inóculo).

Se realizaron los cultivos en erlenmeyers de 500 mL con un volumen de 200 mL de los medios líquidos de zanahoria enriquecido y papa, con agitación en zaranda a 150 rpm durante cinco y diez días, ($T=28-30^\circ\text{C}$ y $H_R = 65-67 \%$). Todos los cultivos fueron filtrados primero por gaza y luego con lana de vidrio para separar el sobrenadante del micelio.

Cultivo de los hongos patógenos del género *Cladosporium*

Se emplearon cepas de *Cladosporium colocasiae* y *C. oxysporum* conservadas en la colección del INIFAT (WFCC 853), las cuales se transfirieron a placas que contenían medio agar-avena (OA). Las mismas se incubaron en cámara húmeda a 25 °C, $H_R = 67 \%$, durante 18-21 días.

Medio de cultivo para solución de conidios

Las esporas de los hongos patógenos fueron recogidas en un medio que contenía: Manitol (50 g), sacarosa (50 g), ácido succínico (5.4 g), extracto de levadura (3.0 g), KH_2PO_4 (0.1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0044 g), H_2O (1 L), pH 5.4, para su posterior utilización en los bioensayos.

Ensayos de actividad fungicida de los extractos en condiciones *in vitro*

Método Bioautográfico por Cromatografía en Capa Fina

Para ello se prepararon placas de vidrio de 20x20cm, con 30 g de gel de sílice en 90 mL de agua destilada, las cuales fueron activadas en estufa a 110°C durante 30 min. Posteriormente se aplicaron, con una microjeringuilla, 200 μL de cada uno de los caldos de cultivos (cinco y

10 días de fermentación) de las tres cepas mencionadas anteriormente, a una distancia de aplicación entre ellos de 2,5 cm.

Se secaron las placas durante dos horas y se asperjaron con la suspensión de conidios de los patógenos evaluados, a una concentración determinada por Cámara de Thomas (1.37×10^6 esporas/mL para *C. oxysporum* y 0.025×10^6 esporas/mL para *C. colocasiae*), bajo flujo laminar. Posteriormente se incubaron en cámara húmeda a 25°C, durante 72 horas, y se determinó cualitativamente la actividad antagonista teniendo en cuenta el halo inhibitorio del crecimiento micelial de los hongos patógenos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la fermentación de las 3 nuevas cepas en los medios de zanahoria mejorado y papa se realizaron observaciones sobre el crecimiento de las colonias y coloración de los medios:

Fermentación de las cepas

Cepas 1789, 1698 y C10/110

Medio zanahoria

El cultivo en zaranda de la cepa 1789, en medio zanahoria mejorado, mostró cambios en la coloración del medio de amarillo claro a naranja oscuro, turbio, con formación de pellets muy pequeños de color naranja y escaso micelio.

La cepa 1698 mostró un medio de color amarillo claro, transparente, con formación de pellets muy pequeños de color blanco y escaso micelio.

La cepa C10/110 mostró un medio de color rojizo, transparente, con abundante formación de pellets grandes y pequeños de color rojo.

Medio papa

El cultivo en zaranda de la cepa 1789, en medio papa, mantuvo una coloración del medio rojiza, turbio, con formación de pellets muy pequeños de color carmelita y abundante micelio.

La cepa 1698 mostró cambios en la coloración y turbidez del medio durante los 10 días de la fermentación, pasando de un medio turbio de color amarillo pálido a un medio transparente de color naranja, con una moderada formación de pellets y escaso micelio.

El cultivo en zaranda de la cepa C10/110, en medio papa, mostró un medio de color naranja oscuro, turbio, con abundante micelio, sin formación de pellets.

Estos resultados demuestran la influencia del medio en el comportamiento de las cepas, siendo el medio de papa más favorable para el crecimiento de las mismas, a excepción de la cepa C10/110 que, en este sentido, mantuvo un comportamiento similar en ambos medios, sin embargo, la formación de pellets fue variable y escasa, siendo favorable el medio de papa sólo para la cepa 1789. La influencia del sustrato en las características morfológicas de los hongos, resulta un aspecto fundamental en los estudios referidos a la búsqueda de cepas con actividad biológica (Cabrera *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006).

Actividad biológica

La actividad fungicida de las cepas 1789, 1698 y C10/110, se evaluó frente a dos especies de *Cladosporium*, utilizando el Método Bioautográfico por Cromatografía en Capa Fina (Lago, *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos frente a cada uno de los patógenos se muestran a continuación:

Cladosporium oxysporum

En este ensayo solamente la cepa 1789, crecida en medio papa, mostró una notable inhibición del crecimiento micelial de este patógeno, no siendo así para las cepas 1698 y C10/110 (Figura 1A). Por otra parte, en el medio de zanahoria, también la cepa 1789 (10 días) fue la que manifestó una inhibición del patógeno (Figura 1B).

En este ensayo las cepas 1789 y C10/110, crecidas en medio de papa, mostraron muy buena efectividad en el control de *C. colocasiae*, tanto a los 5 como 10 días de fermentación, con un notable halo de inhibición de su crecimiento, mientras que la cepa 1698 no manifestó actividad (Figura 2A).

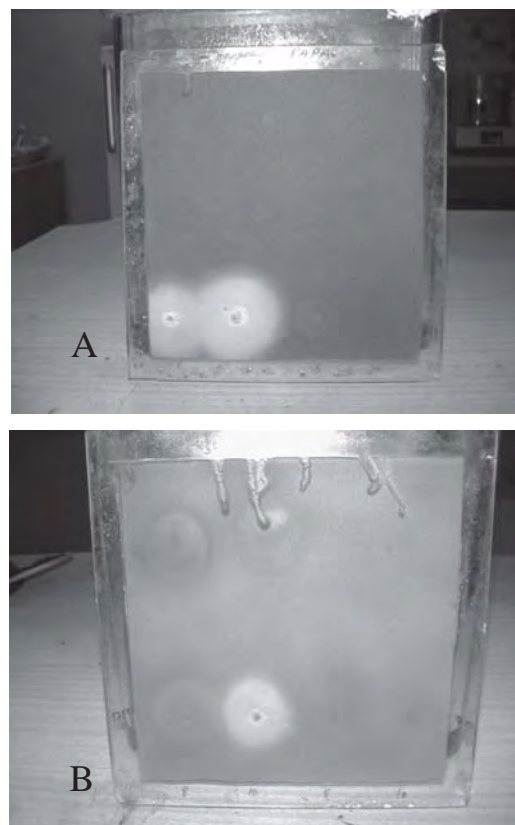


Figura 1. Ensayo de actividad contra *Cladosporium oxysporum*

Cladosporium colocasiae

En el medio zanahoria solamente la cepa 1789 mostró una fuerte inhibición del patógeno en ambos días de fermentación (Figura 2 B, extremo inferior). Los resultados demuestran la influencia del medio sobre la producción de metabolitos activos como ocurre con la cepa C10/110, que mostró inhibición del crecimiento de *C. colocasiae* cuando fue fermentada en un medio de papa pero no presentó actividad en el medio de zanahoria, lo cual coincide con lo planteado por Thomma *et al.*, 2005 y Deacon, 2005. Estos resultados novedosos son alentadores para continuar estudios en estas cepas referidos al control de especies de *Cladosporium* y otros hongos fitopatógenos, siendo muy pocos los trabajos realizados con cepas procedentes de este género, entre

ellos el realizado por Bills *et al.*, 2009 donde determinaron la presencia de las parnafunginas A y B y otros análogos en una cepa de *Cladobotryum pinarense* a los que le atribuyen la actividad fungicida mostrada sobre *Candida albicans*.

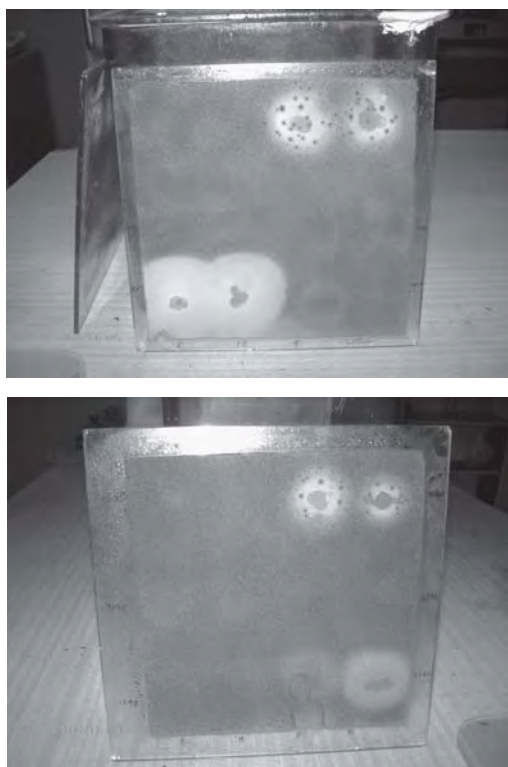


Figura 2. Ensayo de actividad contra *Cladosporium colocasiae*

CONCLUSIONES

- La cepa 1789 mostró una fuerte inhibición del crecimiento de *C. oxysporum* y *C. colocasiae* en los dos medios de cultivo estudiados.
- La cepa C10/110 mostró una notable inhibición del crecimiento de *C. colocasiae* en el medio de papa.
- La cepa 1698 no mostró actividad sobre los patógenos estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bills, Gerald F.; Platas, G.; Overy, D.P.; Collado, J.; Fillola, A.; Jiménez, M.R.; Martín, J.; Del Val, G.A.; Vicente, F.; Tormo, J.R.; Pelaez, F.; Calati, K.; Harris, G.; Parish, C.; Xu, D.; Roemer, T. Discovery of the parnafungins, antifungal metabolites that inhibit mRNA polyadenylation, from the *Fusarium larvarum* complex and other Hypocrealean fungi. *Mycologia*, 101(4): 449–472. (2009).
- Cabrera, A. B.; Martínez, B. C.; Díaz M. C.; Herrera, L. I. y Alonso, Y.D. Efecto de los medios de cultivo y la temperatura en el crecimiento de *Cladosporium fulvum* Cooke (sin. *Passalora fulva*). *FITOSANIDAD*, 10(1): 25-28. (2006).
- Centraalbureau Voor Schimmelcultures(CBS). List of cultures. Fungal Biodiversity Center. 35th Edition, ISBN 90-70351-45-5: 687 p. (2001).
- Chirinos, J.; Leal, A. y Montilla, J. Uso de insumos biológicos como alternativa para la agricultura sostenible en la zona sur del estado Anzoátegui. *Revista Digital CENIAP HOY*, No. 11. Maracay, Aragua, Venezuela. (2006).
- Cox, R.J. y Glod, F. Fungal polyketide synthases in the information age. *Advances in fungal biotechnology for industry, agricultura and medicine*. J.S.Tkacz y L. Lange (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York: 69-93. (2004).
- Deacon, J. *Fungal Biology*. Edit. Blackwell. 366pp. (2005).
- Heredía, G. Tópicos sobre diversidad, ecología y uso de los hongos microscópicos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) e Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver. México, 386 pp. (2008).
- Lago, J.H.G.; Ramos, C.S.; Casanova, D.C.C.; Morandim A de A.; Bergamano, D.C.B.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V. da S., Furlan, M.; Guimaraes, E.F.; Young M.C.M. and Kato, M.J. Benzoic acid derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.*, 67: 1783-1788. (2004).
- Singh, S.M.; Puja, G. y Bhat, D.J. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. *Current Science* 90 (10): 1388-1391. (2006).
- Thomma, B. P. H. J.; Van Esse, H. P.; Crous, P. W.; De Wit, P. J. G. M. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a Highly Specialized Plant Pathogen As Model for Functional Studies on Plant Pathogenic *Mycosphaerellaceae*, *Molecular Plant Pathology* 6(4): 379-393. (2005).

Recibido: 15 de septiembre
Aceptado: 23 de abril de 2012