

ACTIVIDAD FUNGICIDA DE HONGOS ANAMÓRFICOS SOBRE ESPECIES DE *CLADOSPORIUM* SPP.

Yarelis Ortiz Núñez, Rafael Castañeda Ruíz, Beatriz Ramos, Nirva González, María E. Alvarez Váldez, Yannin Lorenzo Rodríguez, Yuliet Aguado Rodríguez, Daylín Gamiotea Turro y María Eugenia Ruenes Figueroa.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Cuba

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 (Chirinos et al., 2006). Sin embargo, a pesar de ser este un campo prometedor, de apenas unos pocos centenares de micromicetos se han obtenido productos útiles para el hombre y de estos, las producciones a mayor escala se han centrado en unos cuantos géneros; se calcula que en la naturaleza existen 1,5 millones de especies de hongos (Drew, 2000), pero hasta la fecha menos del 1% de la diversidad microbiana ha sido explorada (Heredia, G., 2008). En Cuba, hemos obtenido avances importantes en el desarrollo y empleo de bioplaguicidas de origen microbiano, los cuales se han validado ampliamente en el país. A pesar de los resultados alcanzados existe aún una gran demanda de estos bioproductos pues se conoce que existen problemáticas fitosanitarias que no tienen solución hasta el presente. 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 comenzar investigaciones a partir de un grupo de cepas conservadas en esta colección, para evaluar su actividad fungicida sobre tres especies de *Cladosporium* spp. las cuales causan considerables daños a cultivos de importancia económica.

Materiales y Métodos

Cepas empleadas

En este período se trabajó con las cepas de los géneros *Trichurus* (3123), *Beltrania* (2432), *Cladobotryum* (1789 y 1698), *Hypomyces* (1532), *Dictyosporium* (3396), *Serenodriella* (3392)

Medios de cultivos utilizados

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 7 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.

Fermentación de las cepas en estudio

Se realizaron los cultivos en erlenmeyers de 500 mL con un volumen de 200 mL de medio de zanahoria, enriquecido con 5g de glucosa, con agitación en zaranda a 150 rpm durante 5 y 10 días. ($T=25-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $H_R= 55-65\%$). 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 cucumerinum*, *C. colocasiae* y *C. oxysporum* conservadas en la colección del INIFAT (WFCC 853), las cuales se transfirieron a placas que contenían medio agar-avena, con pH 6.3. Las mismas se incubaron en cámara húmeda, durante 18-21 días, a 25 °C.

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*”.

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

Se secaron las placas durante 2 horas y se asperjaron con la suspensión de conidios de los patógenos evaluados, a una concentración determinada por Cámara de Thomas (3.0×10^6 esporas /mL para *C. cucumerinum*; 1.37×10^6 esporas /mL para *C. oxysporum*, 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 7 nuevas cepas en el medio de zanahoria mejorado se realizaron observaciones sobre el crecimiento de las colonias y coloración del medio:

Cepas 1789 y 1698

El cultivo en zaranda de la cepa 1789 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

Cepas 3396 y 3392

Ambas cepas mostraron cambios en la coloración del medio de amarillo a amarillo-pardo, transparente. La cepa 3396 mostró la formación de pellets pequeños y grandes, de color amarillo oscuro, los cuales eran de color carmelita a los 10 días de fermentación. La cepa 3392 mostró abundantes pellets, muy pequeños, de color blanco.

Cepa 1532

El cultivo en zaranda de la cepa 1532, en medio zanahoria mejorado, mostró a los 5 días de fermentación un medio de color amarillo, transparente, con abundante micelio, formación de pellets grandes y pequeños de color amarillo, lo cual se mantuvo a los 10 días.

Cepa 2432

Esta cepa mostró una marcada turbidez del medio a partir de las 48 horas, manifestando una coloración amarilla en el medio de cultivo la cual se mantuvo durante los 5 y 10 días de fermentación. No hubo formación de pellets.

Cepa 3123

La cepa 1698 mostró un medio de color negro, transparente, sin formación de pellets.

La actividad fungicida de las cepas 2432, 3123, 1789, 1698, 1532, 3392 y 3396, se evaluó frente a las tres especies de *Cladosporium* spp. 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 bioensayo frente a *Cladosporium oxysporum* solamente la cepa 2432 (10 d de fermentación) mostró una ligera inhibición en el crecimiento de este hongo. Las cepas 3123 y 1532 al parecer, muestran cierta actividad frente al hongo lo cual no resulta conclusivo por problemas de contaminación. El resto de las cepas no mostraron actividad.

Cladosporium colocasiae

Las cepa 2432 mostró inhibición frente a *C. colocasiae*, a los 5 d de fermentación. El resto de las cepas no mostraron inhibición frente a este hongo

Cladosporium cucumerinum

La cepas 2432 (10 d) y 1789 (10 d) mostraron una marcada inhibición frente a *C. cucumerinum* y más ligera a los 5 días de fermentación. También la cepa 3392 mostró una ligera inhibición a los 5 y 10 días de fermentación. El resto de las cepas no mostraron inhibición frente a este hongo.

De los resultados anteriores podemos concluir que la cepa 2432 fue la que mejor comportamiento mostró, logrando inhibir el crecimiento de las 3 especies de *Cladosporium* spp. Es de destacar la actividad mostrada por esta cepa sobre *C. colocasiae* a los 5 días y sobre *C. cucumerinum* a los 10 días de fermentación, con los mayores halos de inhibición. En la literatura actualizada existen muy pocos estudios relacionados con la actividad biológica del género *Beltrania*, así como, con el aislamiento de los metabolitos activos presentes en la misma. Solamente Vatcharin et al, 2005 reportan la presencia de sesquiterpenos en una cepa de *Beltrania rhombica* y su actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Por otra parte, la cepa 1789 mostró muy buena efectividad en el control de *C. cucumerinum* con un notable halo de inhibición, sobre esta cepa no existen reportes en la literatura especializada. 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.

Referencias

Chirinos, J.; A. Leal y J. Montilla. 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

Drews, J. Drugs discovery today and tomorrow. *Drug Discov. Today* 5:2-4. 2000

Heredia, 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 derivates from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.*, 67, 1783-1788. 2004.

Vatcharin Rukachaisirikul, Chutanat K.; Souwalak P. and Zubaidah H. Eudesmane Sesquiterpenes from the Aquatic Fungus *Beltrania rhombica*. *Chem. Pharm. Bull.* 53(2) 238—240. 2005