

## Actividad fungicida del hongo liquenizado *Loxospora pustulata* sobre *Rhizoctonia solani*

### Fungicide activity of lichen-forming fungi *Loxospora pustulata* above *Rhizoctonia solani*

Daymara I. Vaillant Flores<sup>1,\*</sup>, Carlos R. Romeu Carballo<sup>2</sup>, Marlene Gómez Peralta<sup>3</sup>, Rebeca Ramírez Ochoa<sup>1</sup>

1- Laboratorio de Micología, Área de Fitopatología del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. 110 #214 / 5 taB y 5 taF, Miramar, Playa. Código Postal 11600. La Habana, Cuba.

2- Laboratorio de Control de la Calidad de Plaguicidas, UCTB Química, INISAV. 150 #2125 / 21A y 25, Cubanacan, Playa. La Habana, Cuba.

3- Colección de Líquenes del Herbario de la Facultad de Biología (EBUM), Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo. Edificio R, Ciudad Universitaria. Francisco J. Mújica S/N, Col. Felicitas del Río, Morelia, Michoacán, México.

\*E-mail: dvaillant@inisav.cu

#### Resumen

Los líquenes son hongos que establecen una relación de simbiosis con uno o varios organismos fotosintéticos (algas o cianobacterias). En esta relación el hongo (micobionte) produce un determinado número de metabolitos secundarios con actividad antibiótica. De acuerdo a esta afirmación se propone: comprobar el efecto fungicida de los metabolitos secundarios producidos en medio de cultivo por el micobionte del líquen *Loxospora pustulata*, sobre *Rhizoctonia solani* aislado de papa. El micobionte se cultivó en medio agar papa dextrosa (PDA), posteriormente se fermentó en caldo de papa por cultivo agitado y los metabolitos se extrajeron con acetato de etilo. Se prepararon concentraciones de 0,01; 0,03; 0,07% p/v del extracto líquénico en PDA donde se sembraron discos de *R. solani* y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. El extracto líquénico mostró 100% de inhibición del desarrollo de *R. solani* a las tres concentraciones.

Palabras clave: Líquen; Sustancias líquénicas; Actividad fungicida.

#### Abstract

The lichens are fungi that establish a symbiotic relation with one or various photosynthetic organisms (algae or cyanobacterium). In this relation the fungi (mycobiont) produce secondary metabolites with antibiotic activity. For this reason the fungicide effect of metabolites produced in culture media by the lichen's mycobiont *Loxospora pustulata*, above *Rhizoctonia solani* isolated from potato was verified. The mycobiont was cultivated in media potato dextrose agar (PDA) and it was fermented in potato broth by shaken culture. The metabolites were extracted with ethyl acetate. A solution in PDA at 0,01: 0,03: 0,07% w/v concentrations was prepared from the lichens extracts. *R. solani* discs were placed in the solution and the mycelial growth inhibition percentage was measured. The lichen extract showed 100% of inhibition of the *R. solani* mycelial growth to all concentrations.

Keywords: Lichens; Lichens substances; Fungicide activity.

#### Introducción

Los líquenes son los hongos que establecen una relación simbiótica con uno o varios organismos fotosintéticos (algas o cianobacterias) y de cuya interacción se origina un talo estable con estructura, ecología y fisiología específicas y diferentes a las que tienen los hongos o algas por separado (1). El hongo se encarga de proteger al alga de las radiaciones directas del sol y brindarle agua y sales mine-

rales. El alga a su vez realiza fotosíntesis y proporciona al hongo hidratos de carbono y vitaminas; para producir lo que se conoce como sustancias líquénicas (2).

Estas sustancias se definen como productos del metabolismo secundario y tienen disímiles propiedades; entre las que se destacan la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias, (3). Por esta razón representa una alternativa más para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica. Entre estos hongos

fitopatógenos se encuentra *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la rizoconiosis o costra negra en el cultivo de papa, con daños severos en el rendimiento y la producción (4).

Con este criterio se propone comprobar el efecto inhibitorio de los metabolitos producidos en medio de cultivo del líquen *Loxospora pustulata* (Brodo&Culb.) R.C. Harris a diferentes concentraciones sobre un aislado de *R. solani* en papa.

## Materiales y métodos

El líquen fue colectado en el Jardín Botánico de Cienfuegos (provincia de Cienfuegos, Cuba) sobre la corteza de *Spathodeanilolica* (Tulipanero africano) y fue identificado como *Loxospora pustulata*. El espécimen mostraba crecimiento crustáceo con un promedio de desarrollo de 8 cm de ancho.

Se cortaron pedazos de 1 cm de ancho de corteza de árbol donde había crecimiento del líquen y se lavaron con abundante agua corriente por una hora. Luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y se enjuagaron con abundante agua destilada estéril y se secaron con papel de filtro estéril. Luego se sembraron pequeños fragmentos en medio de cultivo PDA preparado naturalmente, en placas Petri de 9 cm de diámetro empleando 10 réplicas. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante una semana. Pasado este período de tiempo, las colonias obtenidas fueron transferidas a PDA fresco e incubadas a las mismas condiciones. Una vez que crecieron en toda la placa se cortaron ponchetes de 1 cm de diámetro; los que fueron colocados en erlenmeyers de 500 ml con 300 ml de caldo de papa estéril con tres réplicas y se situaron en zaranda durante siete días. Una vez que hubo crecimiento, se filtró el caldo de papa y la biomasa fue desechada. Al caldo de papa se le agregó 5 ml de acetato de etilo (p.a. Merck) para realizar la extracción de las sustancias líquénicas con tres repeticiones, luego se rotoevaporó y el extracto obtenido fue colocado en balones previamente pesados y se preparó con dimetilsulfoxido (DMSO) al 10%. Partiendo de una concentración de 5% de extracto, se prepararon concentraciones en medio PDA fundido como muestra la tabla 1. El PDA fundido se aplicó sobre placas de 5 cm de diámetro y se colocaron en el centro ponchetes del hongo *R. solani* con tres réplicas por concentración y dos testigos; uno con el hongo creciendo en medio PDA sin el blanco y otro con PDA con DMSO a la mayor concentración probada. Se incubaron a 25 °C durante una semana. Transcurrido este periodo se evaluaron los ensayos calculando el porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{DCC - DCT}{DCC} \times 100.$$

DCC: diámetro de la colonia control

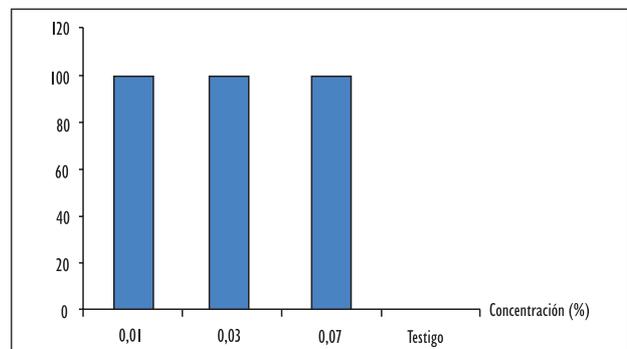
DCT: diámetro de la colonia tratada

**Tabla 1:** Concentraciones de extracto líquénico al 5% en PDA.

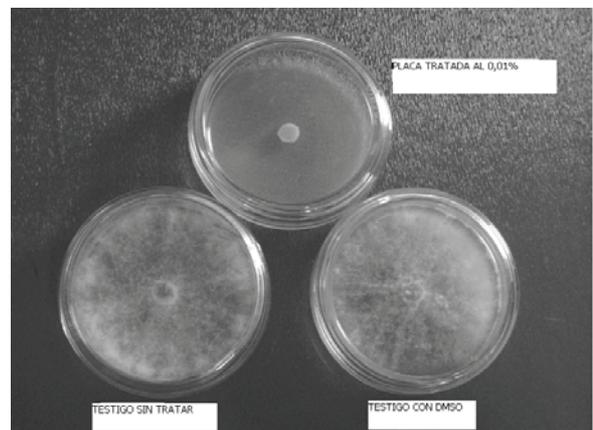
Concentración	Cantidad de producto	Cantidad de PDA para 50 ml
0,07%	0,7 ml	49,3 ml
0,03%	0,3 ml	49,7 ml
0,01%	0,1 ml	49,9 ml

## Resultados y discusión

El extracto obtenido del hongo líquenizado *L. pustulata* mostró 100% de inhibición del crecimiento de *R. solani* a todas las concentraciones estudiadas como muestra la Fig. 1. Es significativo el resultado mostrado a la menor concentración donde con cantidades mínimas del extracto el crecimiento del hongo fue nulo (Fig. 2).



**Figura 1:** Porcentajes de inhibición de cada una de las concentraciones



**Figura 2:** Inhibición al 100% del crecimiento de *R. solani* al 0,01% de concentración.

En la literatura no se encontraron trabajos donde se haya empleado *L. pustulata* para el control de hongos fitopatógenos; sin embargo algunos autores demostraron el efecto antifúngico de otras especies de hongos líquenizados. Tal es el caso de Suberu (2004), que logró inhibir el crecimiento y la esporulación de *Aspergillus flavus* con los extractos de los líquenes *Hypogymnia physodes* y *Ramalina farinacea* a concentraciones mayores a las probadas (5). También Seoun *et al.* (2003) obtuvieron

sustancias líquénicas de *Heterodermia sp* a partir del cultivo del micobionte, mostrando valores significativos en un número determinado de hongos fitopatógenos entre los que se destaca *Bipolaris coicis*, *Collectotricum orbiculare* y *Fusarium graminearum* (6). Otros géneros con marcado efecto antifúngico son: *Cladonia*, *Myelochroa*, *Parmelia*, *Usnea*. y *Ramalina* este último con una marcada actividad fungicida. Algo similar ocurre con la especie *Parmelia laevior* la cual inhibió completamente el crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium sp* y *Sclerotium cepivorum* (7).

El método empleado en este trabajo para el cultivo de *L. pustulata* no ha sido descrito por otros autores. Generalmente se realiza la metodología referida por Yamamoto *et al.*, 1987; en la cual se cultiva el micobionte a partir de la maceración de una porción del talo líquénico y posteriores filtraciones, donde se siembra la fracción obtenida en la última filtración (8). Esta técnica fue utilizada por Wei *et al.* 2008 para probar la actividad fungicida de 100 aislados de hongos liquenizados contra *Colletotrichum acutatum*, causante de la antracnosis en pimiento. Estos autores lograron más de un 50% de inhibición con los extractos de las especies *Lecanora argentata*, *Cetralia braunsiana*, *Ramalina litoralis*, *Parmelia simplicior* entre otras (9). En cambio la metodología empleada en este ensayo permitió el cultivo del micobionte en un corto período de tiempo además que disminuyó el número de contaminantes.

## Conclusiones

Mediante este estudio preliminar se concluye que: la metodología utilizada para el cultivo del micobionte de *L. pustulata* permitió un crecimiento efectivo de este líquen en medio de cultivo. Así como; el extracto líquénico obtenido presentó un marcado efecto fungicida sobre *R. solani* a las tres concentraciones probadas, manifestando la actividad antimicrobiana que presentan los metabolitos secundarios producidos por esta especie.

## Referencias Bibliográficas

1. Ranković, B. y Marijana, M. *The antimicrobial activity of substances derived from lichens Physcia aipolia, Umbilicaria polyphylla, Parmelia caperata and Hypogymnia physodes*. World J Microbiol Biotechnol 24: p. 1239-1242. 2008.
2. Coutiño, B. y Montañez, A. L. *Los líquenes*. Ciencias 59: p. 64-65. 2000.
3. Toledo, F. J.; García, A.; León, F. y Bermejo, J. *Ecología química en hongos y líquenes*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. XX-VIII (109): p. 510-528. 2004.
4. Acuña, I. y Vargas, M. *Rhizoctoniasis de la papa*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Habana, Cuba. Boletín informativo 46: p. 1-4. 2004.
5. Suberu, H. *Preliminary studies of inhibitions in Aspergillus flavus with extracts of two lichens and Bentex-T fungicide*. African Journal of Biotechnology 3 (9): p. 468-472. 2004.
6. Seoun, J. H.; Hye, J. K.; Kwang, M. L. and Young, J. K. *Isolation, cultivation and antifungal activity of lichen-forming fungus Heterodermia sp*. The Plant Pathology Journal 19(2): 75-78. 2003.
7. Soon, O.; Haesook, J.; Kwang, Lim; Young, J. and Jae, H. *Anti-fungal activity of lichen-forming fungi isolated from korean and chinese lichen species against plant pathogenic fungi*. Plant Pathol. J. 22(4): 381-385. 2006.
8. Yamamoto, Y.; Mizuguchi, R.; Takayama, S. and Yamada, Y. *Effects of culture conditions on the growth of Usneaceae lichen tissue cultures*. Plant Cell Physiol 28(8): p. 1421-1426. 1987.
9. Wei, X.; Hae-Sook, J.; Keon, H.; Young, K. y Jae-Seoun, H. *Anti-fungal activity of lichen-forming fungi against Colletotrichum acutatum on hot pepper*. Plant Pathol. J. 24 (2): 202-206. 2008.

Recibido: 13/06/2013

Aprobado: 30/10/2013