PHYTOMA POSTER TÉCNICO

Estudio de la actividad bactericida y fungicida de los metabolitos del hongo Penicillium oxalicum Currie et Thom

F.J. GARCÍA BREUO, A. HINOJOSA LÁZARO, M.C. REAL MARTÍNEZ, Y M.P. SANTAMARINA SIURANA

INTRODUCCIÓN

En los últimos años está habiendo un importante avance en el descubrimiento de nuevos productos químicos que poseen interesantes actividades biológicas v que nos permiten utilizarlos como plaquicidas agrícolas o como antibióticos o antifúngicos. Son muchos los trabajos de investigación que ponen de manifiesto la eficacia de los hongos como agentes de biocontrol frente a microorganismos que causan enfermedades en los cultivos (AL-TOMORE & BOTTALICO, 1992: DE CAL V COL. 1995 v 1997: VAN DRIESCHE & BELLOWS. 1996: ABADIAS, 2000; SANTAMARINA y COL., 2000) Actualmente productos obtenidos a partir de microorganismos están siendo empleados como plaquicidas (fungicidas. bactericidas, insecticidas y herbicidas) en la protección de los cultivos (CROMBIE, 1999: MARRONE 1999: YAMAGUCHI, 1992). Uno de los hongos que se utiliza en la

actualidad para el control biológico de entermedades de origen fúngico sel Penicillium oxalicum Currie et Thom. Este hongo es una de las especies de mayor disribución y más ubicua de todos las Penicillium. Se considera como un representante normal de la microllica del suido (PIT & HCO:wox, 1999) y actualmente, se le considera como ecológicamente competente para ser utilizado en el control biológico de plagas (PASCUM, y CO., 1997).

Differentes trabajos han demostrado que Penicillium condicum Currie el Thom controle la fusariosis vascular inducida por Insantim conyporenti (DE CAL y col., 1995, 1997 y 1999). Se ha demostrado que Penicillium osalicum Currie el Thom reduce la marchitar causada por Espantim conyportenti en plantas de fornate en invernadero, fanto en suelon atruta Como en suelo estéril sin haber disminución de la población de Fusianim en la prisoder (DE CAL y col., 1997

En este trabajo se aportan datos so-

n este trabajo se ha realizado un estudio general de la actividad bactericida y fungicida de los metabolitos producidos por el hongo Penicilium oxalicum Currie el Thom con vistas a poder utilizar este organismo en el control biológico frente a parga gas que afectan a la agricultura. Se han analizado tanto los extractos obtenidos a partir del caido metabólico como los procedentes del micelio. Para ello se han seguido los siguientes pasos: 1. Cultivo del hongo y obtención de los extractos procedentes del caido metabólico y del micello; 2. Detección previa, mediante test de antibiosis, de la actividad antibiótica de los extractos obtenidos; 3. Estudio de la actividad antibiótica de los extractos obtenidos; 3. Estudio de la actividad antibiótica de los extractos obtenidos; 3. Estudio de la actividad minicidad de

bre microorganismos que son susceptibles de ser controlados por Penicillium oxalicum Currie et Thom.

Material y métodos Organismos empleados

organicano empresa

los mismos.

La especie utilizada es Perincillium oxafizum Currie er Thomn que fue aisladas de una muestra de maiz nacional procedente de un almacen de gramo de la ciudad de Valencia en el año 1994. Los microorpanismos que se emplearon en los diferentes bioensayos para la determinación de las actividades bactericida y fungicida procedian de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Se han empleado 16 cepas bacterianas y 21 cepas fingicas para estudiar la potencial actividad bactericida y fungicida de los extractos obtenidos a partir del caldo metabólico y del micelio de Penicillium oxalicum Currie et Thom.

Las cepas bacterianas se mantuvieron en agar nutritivo (AN) y caldo nutritivo (CN) mientras que las fúngicas en agar patata glucosada (PDA).

Ensayos preliminares

Para detectar la posible presencia de metabolitos secundarios fúngicos con actividades antibióticas se realizaron unos ensavos preliminares mediante el Test de Antibiosis o de Wickerham, según el procedimiento clásico. Para ello, se sembró por estría una suspensión de esporas del hongo en un lado de la placa (a modo de cuerda de circunferencia) y se incubó a 28°C durante 4-5 días, a fin de permitir el crecimiento del hongo y la producción de antibiótico. Después se sembraron por estría cruzada los organismos prueba (bacterias), y se incubaron a su temperatura óptima (30-35°C) durante 24 h para permitir su desarrollo. Finalmente, se observó si se había producido inhibición del crecimiento de los organismos prueba. Se consideró que se había producido inhibición cuando la distancia entre hongo y bacteria era de 2 cm o más.

Las bacterias enasyndas en este beenasyo lueron. Envinia amylovaro (ECT 212), Erwinia carolovora (CECT 314),
Pseudomonas syringae (ECT 4194),
Pseudomonas syringae (ECT 4194),
Pseudomonas syringae (ECT 4195),
Pseudomonas falonacearum (ECT 415),
Pseudomonas falonacearum (ECT 415),
Pseudomonas falonacearum (ECT 415),
Pseudomonas falonacearum (ECT 478),
Agrobacterium tunefaciaris (ECT 578), Bacillas subrilis (ECT 59), Bacillas membrilis subrilis (ECT 59), Clavibacte
introducearum (ECT 59), Clavib

23as Jornadas de Productos Fitosanitarios

PHYTOMA

790) y Clavibacter michiganensis spp. sepedonicum (CECT 791) y Streptomyces albus (CECT 193).

Obtención de extractos fúngicos.

El hongo se sembró en tubos de agar inclinado de PDA, y se incubo a 28°C durante 1 o 2 semanas. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se agitaron con 5 ml de agua destitada más Tivene 30 (0.05%) estéril hasta obtener suspensiones de conicilios de aproximadamente 1 x 10° conicilios/ml contados en cámara de Thoma.

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo cada uno de ellos. El medio de cultivo enpleado fuer el caldo Patata Glucosada. Cada matraz se inoculó con 1 ml de la suspensión de conidios y se incubó durante 14 días a 28°C.

Transcurrido el liempo de incubsción, se procedió en cada matez a la separación del micello y del caldo metabólico mediante filtación a través de papel Whatman nº 4. Cada caldo se llevó a un embudo de decantación y se le practicaron 3 lavados con 50 ml de diciorometano, recogiendo la fase inflerior en un matez a 252 ml. Estos estraciós de diciorometano (C-DCM) se concentrano en rotavapor y se secaron bajo fuente de nitrógeno.

Los micelios obtenidos fueron secados en estufa y posteriormente sometidos a extracción en un equipo Soxhlet, primero con diclorometano (DCM) y, en una segunda extracción, con metanol (M). Se obtuvieron asi dos tipos de extractos: M-DCM y M-M.

Posteriormente, todos los extractos obtenidos se redisolvieron en ciclohexano, acetona o en mezcla de ambos según la solubilidad del extracto en cuestión.

Determinación de la actividad bactericida de los extractos fúngicos.

El método consiste en medir la inhibición del crecimiento bacteriano, impregnando alicuotas de los diferentes extractos en discos de papel. El medio empleado para los ensavos fue el Agar Nutritivo. Las bacterias ensavadas Erwinia amylovora (CECT 222), Erwinia carotovora (CECT 314), Pseudomonas syringae (CECT 4391). Pseudomonas syringae (CECT 4394), Pseudomonas solanacearum (CECT 125), Pseudomonas fluorescens (CECT 378), Agrobacterium tumefaciens (CECT 90), Xanthomonas campestris (CECT 97), Bacillus subtilis (CECT 35). Bacillus cereus (CECT 193), Escherichia coli (CECT 45), Serratia marcescens

TABLA 1

Resuttados obtenidos con el test de antibiosis (Wickerham), Como so observa, en general, la actividad bactericida del hongo no es, en general, muy alta. En muchas bacterias apenas se produce inhibición de su crecimiento, mientras que en otras (8. subtille, 8. arueus, E. col y/s. albuya) la inhibición es algo mayor. Sin embargo, en ningún caso se produjo una inhibición completa del crecimiento. (7 clasi water as mêtos ás residats. Mit. Por hibición

Especie bacteriana	Inhibición (valor medio en mm) ^(*)	
Agrobacterium tumefaciens (CECT 90)	NI	
Bacillus cereus (CECT 193)	12.8 ± 1.3	
Bacillus subtilis (CECT 35)	22.8 ± 1.3	
Clavibacter michiganensis spp. michiganensis (CECT 790)	NI	
Clavibacter michiganensis spp. sepedonicum (CECT 791)	NI	
Erwinia arnylovora (CECT 222)	12,3 ± 1,1	
Erwinia carotovora (CECT 314)	2.0 ± 0.2	
Escherichia coli (CECT 45)	15.3 ± 1.1	
Pseudomonas fluorescens (CECT 378)	5.0 ± 0.1	
Pseudomonas solanacearum (CECT 125)	5.3 ± 0.3	
Pseudomonas syringae (CECT 4391)	5.2 ± 0.1	
Pseudomonas syringae (CECT 4394)	5.0 ± 0.8	
Serratia marcescens (CECT 159)	4.1 ± 0.3	
Staphylococcus aureus (CECT 59)	23.0 ± 1.4	
Streptomyces albus (CECT 193)	13.0 ± 0.3	
Xanthomonas campestris (CECT 97)	5.6 ± 0.9	

TABLA 2

Ensayo de la actividad bactericida de los extractos (C-DCM: Caldo con Dictorometano; M-MC Miscielo con Dictorometano; M-MC Miscielo con Dictorometano; M-MC Miscielo con Metanol) obtenidos a partir de los cultivos de Penicillium oxalicum Currie et Thom. Los discos contenian 100 ya de extracto. Los resultados muse-tran una actividad bactericida escasa frente a las bacterias ensayadas. Solo en al-gunos casos (8. subrille, 8. em/yorox, 8. coli, 8. parecen halos de inhibición superiores a 10 mm, lo que nos indica una actividad bactericida internedia. En cualquer caso, las mayores actividades aparecen en los extractos obtenidos a partir del caldo metabolico, lo que nos indicaria que es debida a sustancias extracellulares liberadas por el hongo en su precipimiento, (7) en ade ocherne se nician las violes correspondentes a los halos de inhibición (dalimen en mm) producidos por los descos con calsur de terretario. Calvi vere en ente de 1 en decidad. En un final hacia per nos halos de hibición.

Especie bacteriana	Extractos fúngicos (*)		
	C-DCM	M-DCM	M-M
Agrobacterium tumefaciens (CECT 90)	6.0 ± 0.1	NI	NI
Bacillus cereus (CECT 193)	10.3 ± 0.3	NI	NI
Bacillus subtilis (CECT 35)	11.0 ± 0.2	NI	NI
Clavibactor michiganensis spp. michiganensis (CECT 790)	NI	NI	NI
Clavibacter michiganensis spp. sepedonicum (CECT 791)	NI	NI	NI
Erwinia amylovora (CECT 222)	10.3 ± 0.2	NI	NI
Erwinia carotovora (CECT 314)	5.3 ± 0.3	NI	NI
Escherichia coli (CECT 45)	8.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1	12.5 ± 0.3
Pseudomonas fluorescens (CECT 378)	10.0 ± 0.2	9.3 ± 0.1	17.6 ± 0.
Pseudomonas solanacearum (CECT 125)	8.3 ± 0.4	6.4 ± 0.1	12.3 ± 0.4
Pseudomonas syringae (CECT 4391)	7.4 ± 0.1	6.5 ± 0.1	10.3 ± 0.3
Pseudomonas syringae (CECT 4394)	8.0 ± 0.2	6.2 ± 0.2	11.4 ± 0.3
Serratia mercescens (CECT 159)	5.5 ± 0.1	NI	NI
Staphylococcus aureus (CECT 59)	25.3 ± 0.4	5.3 ± 0.2	7.6 ± 0.2
Streptomyces albus (CECT 193)	25.1 ± 0.4	16.5 ± 0.2	12.5 ± 0.2
Xanthomonas campestris (CECT 97)	5.4 ± 0.1	8.1 ± 0.2	15.5 ± 0.3

(CECT 159), Staphylococcus aureus (CECT 59), Clavibacter michiganensis spp. michiganensis (CECT 790) y Clavibacter michiganensis (CECT 790) y Clavibacter michiganensis spp. sepedonicum (CECT 791) y Streptomyces albus (CECT 193) se hicieron crecer en caldo nutritivo durante 24 h a la temperatura adecuada para cada una de ellas. Tras la incubación se

procedió a la inoculación por vertido de 0.5 ml de suspension bacteriana junto con 20 ml de Agar Nutritivo en placas Petri. Tras la solidificación del medio se colocaron sobre su superficie discos previamente impregnados con los diferentes extractos fungicos (C-DCM, M-DCM y M-M), previamente rediseutlos a una concentra-

23as Jornadas de Productos Fitosanitarios

PHYTOMA

TABLA 3

Ensuyo de la actividad fungicida de los extractos (C-DCM: Caldo con Dictormentano; Mh-CM Miccillo con Dictormentano; Mh-CM Miccillo con Dictormentano; Mh-CM Miccillo con Metanol) obtenidos a partir de los cuttivos de Penicillitum oxalicum Currie et Thom. Los discos contenian 100 µg de extracto. Los resultados nos muestran una gran actividad fungicida frente a ciertos hongos y escasa o nula frente a torto. Discorranos como frente a Fusianim oxagorium sop piccorrais y propersid y Fusianim oxagorium sap pideolio, esta actividad es may alta, mientras que frente a Fusianim oxagorium so porto de la compacta de Penicillium. Aternaria, Cladisportium. Collevorium y Trichoderma ensayadas. En cualquier caso, se observa como los valorem de si actividad esta de Penicillium. Aternaria, Cladisportium. Collevorium y Trichoderma ensayadas. En cualquier caso, se observa como los valorem de si alta de la collega de la cultura de la compacta de la collega de la cultura de l

Especie fúngica	Extractos fúngicos(*)			
	C-DCM	M-DCM	M-M	
Alternaria alternata (CECT 2662)	NI	NI	NI	
Alternaria solani (CECT 2997)	NI	NI	NI	
Aspergillus niger (CECT 2915)	NI	NI	NI	
Botrytis aclada (CECT 2851)	10.6 ± 0.3	7.3 ± 0.2	11.0 ± 0.2	
Cladosporium cladosporoides (CECT 2110)	NI	NI	NI	
Cladosporium cucumerinum (CECT 2107)	NI	Ni	NI	
Collefotrichum fragariae (CECT 20121)	NI	NI	NI	
Fuserium graminearum (CECT 2150)	10.3 ± 0.2	13.5 ± 0.3	15.2 ± 0.4	
Fusarium oxysporium spp gladioli (CECT 2867)	14.0 ± 0.2	9.1 ± 0.1	22.2 ± 0.3	
Fusarium oxysporium spp gladioli (CECT 2868)	15.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	18.9 ± 0.4	
Fusarium oxysporium spp gladioli (CECT 2869)	14.9 ± 0.3	9.9 ± 0.2	18.7 ± 0.2	
Fusarium oxysporium spp gladioli (CECT 2870)	15.0 ± 0.1	10.1 ± 0.1	21.8 ± 0.3	
Fuserium oxysporium spp lycopersici (CECT 2715)	19.3 ± 0.1	16.1 ± 0.3	22.1 ± 0.2	
Fusarium oxysporium spp lycopersici (CECT 2866)	22.1 ± 0.3	16.0 ± 0.2	23.0 ± 0.2	
Fusarium oxysporium spp niveum (CECT 2368)	8.3 ± 0.3	11.3 ± 0.3	20.0 ± 0.2	
Fusarium oxysporium spp niveum (CECT 2871)	9.3 ± 0.3	12.0 ± 0.2	21.2 ± 0.4	
Fusarium solani (CECT 20232)	16.0 ± 0.2	10.3 ± 0.3	14.3 ± 0.3	
Paecilomyces variotii (CECT 2983)	NI	NI	NI	
Penicillum digitatum (CECT 2954),	NI	NI	NI	
Penicillium italicum (CECT 2294)	NI	N	NI	
Trichotecium roseum (CECT 2410)	NI	NI	NI	

ción de 10 μg/μl. Para cada extracto se empleó una concentración de 100 mg, respectivamente, por disco. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y con sus blancos correspondientes.

Las placas se incubaron a la temperatura óptima para el crecimiento de cada bacteria y la lectura se realizó después de 24 h, midiendo el halo de inhibición producido.

Determinación de la actividad fungicida de los extractos fúngicos.

El metodo, similar al anterior, consiste en medir la inhibición del crecimiento fúngico. Los ensayos se realizaren con los siguientes hongos hisanium cayasporium spp
lycopersio (CECT 2715 y CECT 2868), resultan oxysporium spp gladioli (CECT 2861, resultan oxysporium spp gladioli (CECT 2861, resultan cayasporium spp privaum (CECT 2869 y CECT 2871), Fusarium praminesrum (CECT 2150), Fusarium solari (CECT 20232), Ciladoporium cucumerium

(CECT 2107), Cladosporium cladosporoides (CECT 2110), Penicillium digitatum (CECT 2954). Penicillium italicum (CECT 2294). Asperaillus niger (CECT 2915), Colletotrichum fragariae (CECT 20121), Alternaria alternata (CECT 2662). Alternaria solani (CECT 2997), Botrytis aclada (CECT 2851). Trichotecium roseum (CECT 2410), y Paecilomyces variotii (CECT 2983), y el medio empleado fue el PDA. Los hongos ensayados se hicieron crecer en PDA durante 4 días a 25°C, y a partir de estos cultivos, se prepararon suspensiones de esporas; inoculándose, por vertido, 0.2 ml de estas suspensiones en placas Petri con 20 ml de PDA. Solidificado el agar se colocaron en la superficie del mismo los discos, previamente impregnados con los extractos fringicos. Para cada extracto se empleó la concentración de 100 µg. Todas las pruebas se realizaron por triplica-

do y con sus blancos correspondientes. Las placas se incubaron a 28°C y la lectura se realizó a los 5 días, midiendo el halo de inhibición producido.

Resultados y discusión

Detección de la actividad antibiótica de las distintas cepas fúngicas aisladas (Test de Wickerham).

Como se observa en la Tabla 1, la actividad bactericida del hongo no es, en general, muy alta. En muchas bacterias apenas se produce inhibición de su crecimiento, mientras que en otras (B. subtilis, E. coli, S. aurous y S. albus) la inhibición es algo mayor. Sin embargo, en ningún caso se produjo una inhibición completa del recimiento.

Estudio de la actividad bactericida de los extractos fúngicos.

Los extractos fúngicos seleccionados se ensavaron frente a las 16 bacterias anteriormente señaladas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Estos resultados muestran una actividad bactericida escasa frente a las bacterias ensavadas. Sólo en algunos casos (B. subtilis, E. amylovora, , E. coli, S. aureus v S. albus) aparecen halos de inhibición superiores a 10 mm, lo que nos indica una actividad bactericida intermedia. En cualquier caso, las mayores actividades aparecen en los extractos obtenidos a partir del caldo metabólico. lo que nos indicaría que es debida a sustancias extracelulares liberadas por el hongo en su creci-

Estudio de la actividad fungicida de los extractos fúngicos.

Para estudiar la capacidad funglicida de los distintos extractos fúngicos se ensayaron éstos frente a diversos hongos, algunos de ellos productores de micotoxinas y otros importantes patógenos vegetales. Las 21 cepas fúngicas empleadas lueron las descriñas en el apartado de Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3. Estos nos muestran una gran actividad fungicida frente a ciertos hongos y escasa o nula frente a otros. Observamos como frente a Fusarium oxysporium spp lycopersici v Fusarium oxysporium spp gladioli, esta actividad es muy alta, mientras que frente a Fusarium oxusporium spo niveum y a Botrytis aclada es algo menor. No muestra actividad funcuicida frente a las cepas de Penicillium. Alternaria, Cladisporium, Colletrotrichum y Trichoderma ensayadas. En cualquier caso, se observa como los valores más altos se obtienen con los extractos metanólicos procedentes del micelio.

23^{as} Jornadas de Productos Fitosanitarios

BIBLIOGRAFÍA

ABADIAS, M.I. 2000. Bases per a la formulació de l'agent de biocontrol Candida sake CPA-1. Tesis doctoral. Escola Técnica Superior d'Enginyeria Agraria,

Universitat de Lleida. ALTOMORE, C. & BOTTALICO, A. 1992, A toxicological approach to a biocontrol of plant pathogens by Trichoderma. Bulletin OILB/SROP 15: 88-90

CROMBIE, L. 1999, Natural product chemistry and its part in the defence against insects and fungi in agriculture. Pesticide Science, 55 (8): 761-774.

DE CAL, A., PASCUAL, S., LARENA, I. y MEL-GAREJO, P. 1995. Biological control of Fusarium oxysporium f. sp. lycopersici. Plant pathology. 44(5): 909-917.

DE CAL, A., PASCUAL, S. y MELGAREJO, P. 1997. Involvement of resistance induction by Penicillium oxalicum in the biocontrol of tomato will. Plant Pathology, 46(1): 72-79.

DE CAL, A., GARCIA-LEPE, R., PASCUAL, S. v. MELGAREJO, P. 1999. Effects of timing and meted of application of Penicillium oxalicum on efficacy and duration of control of Fusarium wilt of tomato. Plant Pathology. 48(2): 260-266.

MARRONE, P.G. 1999. Microbial pesticides and natural products as alternatives. Outlook on Agriculture, 23(3): 149-154. PASCUAL, S., RICO, J.R., DE CAL, A. v MEL-GAREJO, P. 1997. Ecophysiological factors affecting growth, sporulation and survival of the biocontrol agent Penicillium oxalicum. Mycopathologia. 139(1): 43-50.

PITT, J.L., & HOCKING, A.D. 1999. En "Fungi and Food Spoilage". 2nd ed. Aspen Publishers, Inc. ISBN, 0-8342-1306-0

SANTAMARINA, M.P., SANZ, I., ROSELLÓ, J. & VAÑO, J. 2000. Detección y aislamiento de metabolitos del hongo Trichoderma harzianum Rifai con actividad bactericida y fungicida. Phytoma España. 122: 55-58.

VAN DRIESCHE, R.G. & BELLOWS, T.S. 1996. Biological Control, Chapman & Hall, New York.

YAMAGUCHI, I. 1992. Natural products as agrochemical and leads. Extended Summary SCI Pesticide Group Symposium. Novel approaches in agrochemical research III. Pestic Sci. 35: 391-392.

> Departamento de Biología Vegetal. Escuela Universitaria de Ingenieria Técnica Agrícola de la Universidad Politécnica de Valencia.

155 páginas 209 fotografías a color P.V.P: 6.250 pts. (IVA Incluido)

Enfermedades de las cucurbitáceas en España

a importancia económica de las enfermedades en el cultivo de melón, sandía, pepino, pepinillo, calabaza o calabacín, entre otras cucurbitáceas, motivó a la Sociedad Española de Fitopatología a dedicar a este tema la primera de una serie de monografías.

Con la participación de 27 fitopatólogos españoles, e ilustrada con más de 200 fotografías a color de todas las enfermedades descritas para su identificación (detallada descripción del agente casual, síntomas, epidemiología y control), esta obra pretende presentar de una forma clara las enfermedades de estas cucurbitáceas detectadas hasta ahora en España.

Una monografía a la que se le ha dado un carácter divulgativo de manera que pueda servir de consulta a un público amplio, desde técnicos y agricultores, hasta fitopatólogos, pasando por estudiantes y profesores.

PEDIDOS: PHYTOMA-España • San Jacinto, 1 - 3 • 46008 Valencia Tel.: 96 382 65 11 • Fax.: 96 382 65 15 • E-mail.: phytoma@phytoma.com • Internet.: http://www.phytoma.com