

Caracterización de una cepa antagonista de *Sclerotium cepivorum*

Juana Iraís Nieto Rodríguez (1), Alberto Flores Martínez (2)

¹ [Licenciatura de Enfermería y Obstetricia, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: irais_24@hotmail.com

² [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: floralb@ugto.mx

Resumen

S. cepivorum es el hongo causante de la pudrición blanca del ajo, su control ha resultado difícil, se han empleado diversos compuestos químicos con actividad fungicida, algunos de ellos muy tóxicos para los seres vivos incluyendo al humano, por lo que el uso de fungicidas naturales tendrá menor impacto ambiental. Se sabe que diversos organismos secretan compuestos con actividad fungicida, entre ellos algunos hongos. Aislamos un hongo del suelo el cual inhibe el crecimiento de *S. cepivorum*. El hongo fue identificado como *Fusarium sp. sp.*, Este hongo secreta un compuesto que inhibe el crecimiento de *S. cepivorum*, solo cuando se le confronta con este y a tiempos largos (8 a 10 días) de incubación. Cuando se crece *Fusarium sp.* solo no secreta tal compuesto. Por otro lado el compuesto tiene muy poco efecto sobre las especies de *Candida* probadas, siendo el efecto mayor sobre *C. glabrata*.

Abstract

The fungus *S. cepivorum* is responsible of garlic white rot, disease which has been difficult to control, farmers have employed various chemical compounds with fungicidal activity, some of them highly toxic to living organisms including humans, so the use of natural fungicides will have less environmental impact. There are organisms that secrete compounds with fungicidal activity, including some fungi. We isolated a soil fungus that inhibits the growth of *S. cepivorum*. The fungus was identified as *Fusarium sp. sp.* This fungus secretes a compound which inhibits the growth of *S. cepivorum*, only when is confronted with this and require long times (8 to 10 days) of incubation. When *Fusarium sp.* grows alone, no secret that compound. Furthermore *Fusarium sp.* has little inhibitory effect on the *Candida* species tested, the greatest effect was on *C. glabrata*.

Palabras Clave

Actividad fungicida; *Fusarium sp.*; Antibiosis; Pudrición blanca del ajo; Compuestos; *Candida*.

INTRODUCCIÓN

Fusarium sp. como antagonista y compuestos químicos con actividad de antibiosis

El uso más remoto de los antibióticos tuvo lugar en China hace más de 2500 años [1], se sabía entonces que la aplicación de la cuajada mohosa de la soya sobre ciertas infecciones traía beneficios terapéuticos.

Muchas otras culturas antiguas, entre ellos los antiguos egipcios y griegos usaban moho y ciertas plantas para el tratamiento de infecciones debido a que contenían antibióticos, dicho fenómeno recibe del nombre de *antibiosis* [2], el cual fue descrito en 1877 cuando Louis Pasteur y Robert Koch observaron que un bacilo en el aire podía inhibir el crecimiento de la bacteria *Bacillus anthracis* [3].

El primer antibiótico descubierto fue la penicilina, en 1897 por Ernest Duchesne, en Francia, quien trabajaba con hongos del género *Penicillium*, sin embargo, su trabajo no recibió la atención de la comunidad científica por lo que la terapéutica antibiótica como tal comenzó en Alemania con Paul Ehrlich que desarrolló del antibiótico Salvarsan en 1909 [4].

El tratamiento de las infecciones con antibióticos es posible debido a la toxicidad selectiva de los mismos. Dicha toxicidad selectiva se basa en las diferencias celulares existentes entre el patógeno y el huésped, en donde la sustancia antibiótica tiene mayor afinidad por su blanco en el patógeno, con lo que resulta mayormente afectado. Sin embargo, hay una gran cantidad de artículos científicos que reportan la aparición constante de cepas resistentes a uno o incluso varios antibióticos, lo cual trae como consecuencia una carrera en el desarrollo de nuevos antibióticos contra la aparición de nuevas resistencias en los patógenos.

A la fecha, existen más de 100 antibióticos en el mercado, siendo la mayoría de ellos de origen semisintético, esto es, son compuestos naturales que han sido químicamente modificados [5].

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de tal forma que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen la enfermedad. Es así que el descubrimiento de varios antibióticos estuvo ligado a la observación previa de un efecto antagonista de un microorganismo sobre otros [6].

El género *Fusarium* sp., es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en suelo, aire y agua, cuyo desarrollo se realiza principalmente de forma epífita o saprófita, esto es sin ocasionar ningún tipo de enfermedad (Nelson, 1981) [7]. Además, se ha identificado como antagonista desde hace mucho tiempo debido a que produce diversos compuestos con actividad antibiótica [8], como son: javancin [9] y enniatin [10] los antibióticos producidos por *Fusarium* sp.

Pudrición blanca del ajo

La enfermedad de la pudrición blanca, causada por *Sclerotium cepivorum* Berk (ScB), ocurre a nivel mundial en todos los lugares donde se siembran plantas del género *Allium* (cebolla, ajo, puerro, entre otros) y representa uno de los factores limitantes para su producción y comercialización ya que puede causar pérdidas de hasta el 100% de los cultivos (Sammour y col. 2011). *S. cepivorum* puede permanecer viable hasta por 20 años en ausencia de un hospedero, además de que, hasta el día de hoy, no existe una forma de control que sea 100% eficaz, situación por la cual la búsqueda de compuestos o agentes que inhiban su crecimiento o coadyuven a su control es de suma importancia

Actualmente en el grupo de trabajo se aisló, de muestras de suelo contaminadas con *S. cepivorum* un hongo antagonista, el cual fue identificado como *Fusarium* sp. sp. (Información obtenida por Salazar García Luis Mauricio) estudios preliminares demostraron que esta cepa de *Fusarium* sp. inhibe el crecimiento de *S. cepivorum*, por lo que es necesario realizar ensayos de confrontación e inhibición para arrojar luz sobre la naturaleza de este efecto de antibiosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo durante la propagación de las mismas

- Se utilizó la cepa de *Fusarium sp.* MQAII-2 aislada de suelo y se resembró por trasplante de micelio en medio de cultivo Extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) y se incubó a 28°C.
- Así mismo se sembró la cepa de *Sclerotium cepivorum* Berk en medio de cultivo YPD y se incubó a 18°C.
- Además se utilizaron las siguientes especies de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*.

Las cuales se sembraron por asada en medio de cultivo YPD y se incubaron a 28°C.

Ensayo de Confrontación

Se confrontó por separado la cepa antagonista de *Fusarium sp.* contra *Sclerotium cepivorum* y las especies de *Candida* antes mencionadas en placas de Petri con medio YPD, dejando una distancia de 2 cm aproximadamente entre los inóculos. La placa con *Sclerotium cepivorum* Berk fue incubada a 18°C y a 28°C las placas con las diversas especies de *Candida*, durante 4 días.

Ensayo de inhibición

a) Con medio de cultivo de *Fusarium sp.*
Se inocularon 10×10^6 esporas de *Fusarium sp.* en 100ml de medio YPD líquido, se incubó a 28°C a 170rpm durante 24hrs. Posteriormente se filtró y a continuación una parte medio de cultivo obtenido se dejó en refrigeración a 4°C y otra se liofilizó. El medio concentrado obtenido se re suspendió en 5ml de agua. En una placa de Petri se adaptó un fragmento de tubo de vidrio al centro de esta, donde se colocaron 50 μ L del medio de cultivo y a una distancia de 2cm se colocó el inóculo de *S. cepivorum* y las especies de *Candida*, se incubó a 28 °C.

b) Con mezcla previa del medio de cultivo de *Fusarium sp.* y las diferentes especies de *Candida*

Se realizaron mezclas 1:6 y 2:7 de medio de cultivo concentrado: medio de cultivo con *Candida spp* (OD 0.1). Como control se usó una mezcla 2:7 de agua: medio de cultivo con *Candida spp.* (OD 0.1). Además, de las mezclas anteriores se realizaron diluciones en agua 1:10, 1:100 y 1:1000 para ser usadas en este mismo ensayo. Se procedió a colocar por separado dos gotas. A continuación procedió a colocar en cajas de petri con medio de cultivo YPD y por separado dos gotas, una de 5 μ L y una de 10 μ L, de cada una de las mezclas antes mencionadas, así como de sus diluciones, para cada una de las especies de *Candida*. Se incubó a 28 °C durante 24 hr. Y se observó en busca de las diluciones a las cuales hubo inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de confrontación

Se montaron ensayos en placa para probar el efecto inhibitorio del medio en donde creció *Fusarium sp.*, a la par se montaron ensayos de confrontación de *Fusarium sp.* contra *S. cepivorum* y cuatro especies diferentes de *Candida*. Como puede verse en la Figura 1 en los ensayos de confrontación no se observó efecto inhibitorio entre la cepa de *Fusarium sp.* y *S. cepivorum* ni las especies de *Candida* tras haber pasado 6 días.

Sin embargo, se retomó el experimento ya que se observó que en el ensayo de confrontación con *S. cepivorum* incubado por 10 días se formó un halo de inhibición (Figura 2). El halo de inhibición presenta características claras, como la coloración amarilla que se produce en la zona donde se enfrentan los hongos. Por lo cual se corrobora que el hongo está secretando algún compuesto que es el responsable de inhibir el desarrollo de *S. cepivorum* Berk. Es por ello que a partir de este cultivo, se preparó una nueva confrontación utilizando a *S. cepivorum* Berk, *Fusarium sp.* y *Candida albicans* con el fin de probar si existe ese mismo efecto, los resultados se muestran en la Figura 3, en la cual se muestra el efecto inhibitorio

que ejerce *Fusarium sp.*, por la deformación del crecimiento colonial tanto en *S. cepivorum* Berk como en *Candida glabrata*.

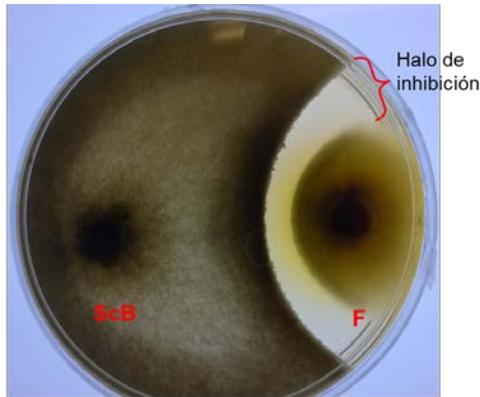


Figura 2. Confrontación de *Fusarium sp.* (F) y *S. cepivorum* Berk (ScB) en medio YPD. En el centro se muestra el halo de inhibición.

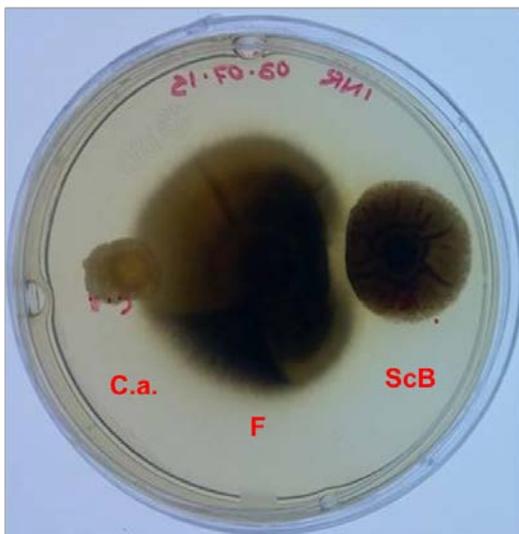


Figura 3. Confrontación en medio YPD de *S. cepivorum* Berk, *Fusarium sp.* y *Candida albicans*.

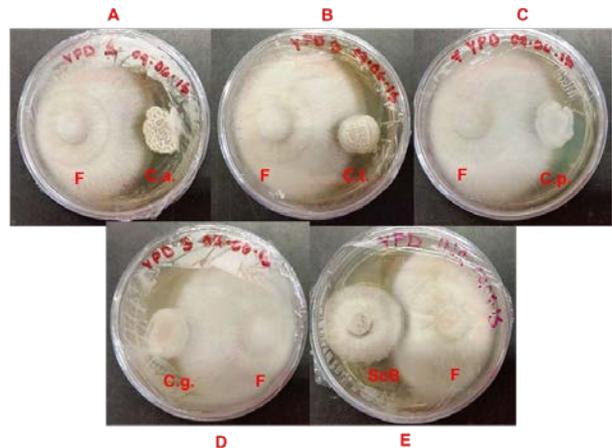


Figura 1. Confrontación de *Fusarium sp.* (F) con *C. albicans*(C.a.) (Imagen A), *Fusarium sp.* con *C. tropicalis*(C.t), (Imagen B), *Fusarium sp.* con *C. papansilosis*(C.p) (Imagen C), *Fusarium sp.* con *C. glabrata*(C.g) (imagen D) y *Fusarium sp.* con *S. cepivorum* Berk (ScB)(Imagen E)

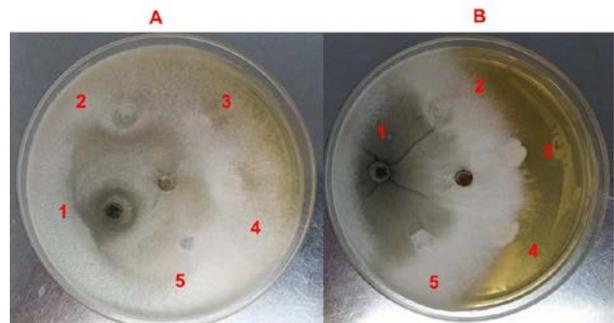


Figura 4. Medio de cultivo de *Fusarium sp.* (Imagen A), Medio de cultivo de *Fusarium sp.* concentrado por liofilización.(Imagen B).

Ensayo de inhibición

Se observó que al extraer el medio de cultivo de *Fusarium sp.* y colocarlo en contacto con *S. cepivorum* Berk y las especies de *Candida* (Figura 4), este no produce algún efecto de inhibición, es decir, es necesaria la presencia directa de *Fusarium sp* y tiempos prolongados de confrontación para que este pueda generar el efecto de inhibición, como se muestra en la Figura 3.

Además, se realizó un experimento alterno para observar si cambiando un poco las condiciones de exposición de los patógenos al medio de cultivo de *Fusarium sp* el efecto era diferente. Sin embargo tampoco se mostró efecto de inhibición en ninguna de las diluciones del medio de cultivo de *Fusarium sp* con el cultivo de las especies de *Candida* (Figura 5). Con esto se corrobora que es necesario la presencia directa de *Fusarium sp* para que se dé el efecto de inhibición

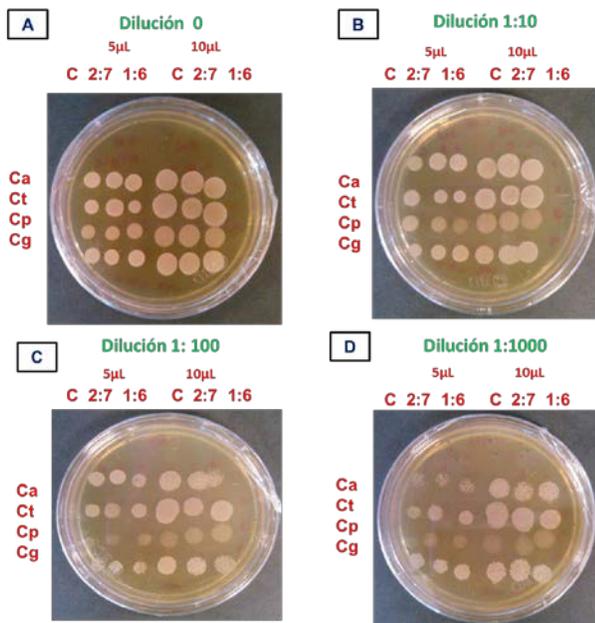


Figura 5. Imagen A,B,C,D: C. Mezcla control., 2:7, 1:6, mezcla de medio de cultivo de *Fusarium sp.*: medio de cultivo con *Candida*, Ca, Ct, Cp, Cg., *C. albicans.*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* respectivamente.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que de la muestra de suelo contaminadas con *S. cepivorum*, el hongo antagonista que fue identificado como *Fusarium sp.* es capaz de causar un efecto de inhibición sobre *S. cepivorum*. Los resultados sugieren que dicho efecto inhibitorio se presenta únicamente tras periodos de confrontación largos y en presencia directa de *Fusarium sp.*, ya que aparentemente es necesaria una producción sostenida del metabolito responsable de tal inhibición.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alberto Flores Martínez por su apoyo, tiempo y dedicación. A la Dra. Patricia Ponce Noyola y José Elías Trujillo Esquivel por su asesoría y apoyo durante el desarrollo de este trabajo. A la Universidad de Guanajuato y CONOCYT por los recursos aportados.

REFERENCIAS

- [1]Perry Romanowski. «How Products Are Made: Antibiotics». Consultado el 1 de septiembre de 2008
- [2]Encyclopedia Britannica Online. «Antibiosis» (en inglés). Consultado el 1 de septiembre de 2008.
- [3]H. Landsberg (1949). «Prelude to the discovery of penicillin *Isis* 40 (3):225–227. doi:10.1086/349043
- [4]«Antibiótico». Enciclopedia Microsoft®Encarta® Online. 2008. Archivado desde el original el 4 de febrero de 2009. Consultado el 2 de septiembre de 2008
- [5]. Arbeláez Torres Germán (Booth, 1971)
- [6]AMINOV, Rustam I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 2010, vol. 1.
- [7]NELSON, P.E. Life cycle and epidemiology of *Fusarium sp. oxysporum*. p. 51-80. En M.E. Mace, A.A. Bell and e.H. Beckman (eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press. New York. 1981
- [8]ARNSTEIN, H. R. V.; COOK, A. H.; LACEY, M. S. Production of antibiotics by fungi. Part II: Production by *Fusarium sp. javanicum* and other *Fusaria*. *British journal of experimental pathology*, 1946, vol. 27, no 6, p. 349
- [9]AMINOV, Rustam I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 2010, vol. [10]ZAHER, Ahmed M., et al. A new enniatin antibiotic from the endophyte *Fusarium sp. tricinctum* Corda. *The Journal of antibiotics*, 2015, vol. 68, no 3, p. 197-200