

## Influencia de metabolitos aislados del hongo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsi* Sacc.

### Influence of isolated metabolites from the fungus *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on mycelial growth of *Sclerotium rolfsi* Sacc.

**Autores:** Lázaro Cotilla Pelier, Amaury Díaz Rodríguez, Irliadis Urgellés Cardoza, Arley Abreu Romero, Noryaisi Abreu Romero y Georgina Berroa Navarro.

**Entidad:** Centro de desarrollo de la montaña **Email:** [amaury@cdm.gtmo.inf.cu](mailto:amaury@cdm.gtmo.inf.cu)

**Teléfono:** 322229

#### Resumen.

Se evaluó la influencia de una fracción de metabolitos aislada a partir del hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. sobre el crecimiento micelial del hongo *Sclerotium rolfsi* Sacc. Se utilizó el procedimiento de cultivo estático del patógeno en medio constituido por caldo de papa, a temperatura ambiente, durante 15 días, y la posterior aplicación de un esquema de filtración adecuado para obtener la fracción de metabolitos. Con el producto obtenido se realizó un bioensayo para determinar su efecto sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsi* Sacc. y los resultados mostraron un marcado efecto de estimulación por parte del mismo. La marcha analítica cualitativa realizada a la fracción mostró la presencia de proteínas y glicósidos cuyos metabolitos podrían ser la causa del efecto biológico observado.

**Palabras clave:** metabolitos, hongo, filtración, crecimiento micelial

#### Abstract.

The influence of a fraction of metabolites isolated from the phytopathogen fungus *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. on the micelial growth of *Sclerotium rolfsi* Sacc. was evaluated. The procedure of static culture of the pathogen in potato broth medium, at room temperature, during 15 days, was used, followed by the application of an appropriate filtration outline to obtain the fraction of metabolites. A bioassay was carried out with the obtained product to determine its effect on the micelial growth of *Sclerotium rolfsi* Sacc. and the results shown a significant stimulation effect. The qualitative analytical screening shown the presence, in the fraction, of proteins and glycosides which could be the cause of the observed biological effect.

**Key words:** metabolites, fungus, filtration, micelial growth

## **Introducción.**

Uno de los métodos utilizados para incrementar la producción de muchos cultivos es la aplicación de sustancias naturales biodegradables que sean capaces de estimular el crecimiento y el rendimiento de las plantas, y a la vez, protegerlas contra el ataque de determinados patógenos o actuar como agentes para el control natural de malezas (Falcón *et al.*, 2004).

En medio de esta tendencia cada vez mayor al uso de bioactivos de origen natural se destaca, entre otras líneas de investigación, el estudio de las potencialidades de metabolitos aislados a partir de diferentes microorganismos como hongos y bacterias, sea que se trate de sustancias presentes en la pared celular de los mismos o segregadas al medio de cultivo como producto de su actividad metabólica. Estas sustancias suelen ser de diversas naturalezas y exhiben una amplia gama de propiedades biológicamente activas entre las que pueden citarse antibiosis, actividad insecticida, actividad herbicida e inductor de resistencia sistémica adquirida entre otras.

En este sentido y, a modo de ejemplo, pueden citarse las investigaciones que han puesto de manifiesto las potencialidades de los metabolitos producidos por bacterias del género *Bacillus* los cuales exhiben marcado antagonismo frente a numerosos hongos fitopatógenos (Castellanos *et al.*, 2004); la inducción de resistencia sistémica adquirida frente a hongos de los géneros *Phytophthora* y *Alternaria* en el tomate a través de sustancias segregadas por hongos formadores de micorrizas arbusculares (De la Noval *et al.*, 2004); el antagonismo frente a muchas especies de hongos fitopatógenos de metabolitos producidos por especies del género *Trichoderma*; el empleo de metabolitos bacterianos como promotores de la embriogénesis somática en cultivos de interés (González *et al.*, 2004); etcétera.

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar un estudio preliminar de bioactividad de una fracción compuesta por metabolitos liberados al medio de cultivo por el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. a través de la evaluación de su efecto sobre el crecimiento micelial de otra especie fitopatógena como evento indicativo de la posible presencia de sustancias con potencialidades bioactivas.

## **Materiales y métodos.**

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Desarrollo de la Montaña en el período comprendido de Septiembre del 2005 a Mayo del 2006.

### **Obtención de la fracción a partir del hongo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler.**

Se utilizó el procedimiento de fermentación estática para lo cual se partió de una cepa de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. procedente del Instituto Nacional de Sanidad Vegetal (INISAV). El hongo, se inoculó en medio de cultivo constituido por caldo de papa y se incubó a temperatura ambiente durante 15 días. Se decantó el micelio del hongo y el líquido se sometió a filtración a través de papel de filtro para la eliminación de los restos del micelio. Posteriormente se filtró a través de crisol con placa de vidrio filtrante y, finalmente, a través de un filtro MILLIPORE de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ . La fracción obtenida se conservó en refrigeración hasta el momento de la realización de los ensayos biológicos.

## Evaluación del efecto de la fracción aislada sobre el crecimiento micelial del hongo *Sclerotium rolfsi* Sacc.

Los ensayos se realizaron en placas de Petri de 100x15 mm. En el centro de cada placa se sembró un disco de 5 mm de diámetro del micelio del hongo *Sclerotium rolfsi* Sacc. sobre medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), pH 5,6, con la fracción obtenida a partir del hongo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. sin efectuar dilución. El testigo consistió en la aplicación de agua destilada.

Las placas se incubaron a una temperatura de 24°C durante 120 horas, evaluándose cada 24 horas el diámetro alcanzado por las colonias.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con diez réplicas y los resultados se sometieron a Análisis de Varianza de clasificación simple, siendo la causa de variación la aplicación o no del producto. Para la comparación de las medias se aplicó la prueba de Tukey para el 5% de probabilidad de error.

### Caracterización química cualitativa.

La determinación de los grupos de metabolitos presentes en la fracción se realizó según la metodología descrita por López y Ortiz (2003) la cual, en algunos casos, se modificó para su adecuación a las características del producto en estudio. Para la aplicación de la misma, se utilizó la fracción aislada a partir del patógeno de forma pura, a la cual se le realizaron los correspondientes ensayos específicos para cada grupo de metabolitos. Los ensayos se seleccionaron de tal forma que hicieran posible tener un criterio discriminatorio suficiente para compensar la no especificidad de algunos de estos. Los mismos fueron:

No.	ENSAYO	METABOLITO QUE DETECTA
1	Reacción de Biuret	Proteínas (grupos CONH <sub>2</sub> )
2	Ninhidrina	Aminoácidos libres
3	Molisch (reacción con $\alpha$ -naftol)	Carbohidratos y/o glicósidos
4	Fehling.	Azúcares reductores
5	Guinard	glicósidos
6	Fenilhidracina	Monosacáridos
7	Reacción de la bencidamina	Enzimas
8	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos
9	Sudán	Lípidos
10	Shinoda	Flavonoides
11	Legal	Cumarinas
12	Lieberman - Burchard	Triterpenos y Esteroides

Para la expresión de los resultados se utilizó la escala semicuantitativa basada en la intensidad de la reacción de desarrollo de color observada en cada caso según:

Simbología	Resultado
+	Ligeramente positivo
++	Positivo

+++	Marcadamente positivo
-	Negativo

### Resultados y discusión.

La tabla 1 muestra el efecto provocado por la aplicación de la fracción aislada a partir del hongo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler sobre el crecimiento micelial del hongo *Sclerotium rolfsi* Sacc.

Tabla 1. Influencia de la fracción aislada a partir del hongo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler sobre el crecimiento micelial del hongo *Sclerotium rolfsi* Sacc.

Tratamiento	Crecimiento radial de la colonia (cm)		
	72 horas	96 horas	120 horas
Filtrado	1.53a	1.86a	3.10a
Testigo	0.00b	0.00b	0.30b
Es x	± 0.21	± 0.24	± 0.32

La aplicación de la fracción constituida por metabolitos fúngicos, provocó el crecimiento de la colonia de *Sclerotium rolfsi* Sacc. a partir de las 72 horas de incubación del patógeno, el cual alcanzó su mayor crecimiento al cabo de 120 horas con diferencia significativa respecto al testigo no tratado con el producto.

Para el tratamiento testigo, por su parte, no se observó crecimiento de la colonia hasta las 120 horas de incubación del hongo al cabo de las cuales, por demás, su tamaño no fue significativo.

Lo anterior sugiere la presencia de al menos un metabolito con efecto de estimulación sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsi* Sacc. en la fracción aislada a partir del hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, efecto que puede ser indicativo de otros tipos de propiedades biológicas por parte del producto. Algunos trabajos orientados a la búsqueda de bioactivos con propiedades como elicitores (inductores de mecanismos de resistencia adquirida) han demostrado que, los compuestos que manifiestan este comportamiento, suelen presentar otras propiedades entre las cuales figuran su efecto como reguladores del crecimiento vegetal y antagonistas o estimuladores del crecimiento y esporulación en otros gérmenes (Roller y Covill, 2000; Paz-Lago *et al.*, 1999 y Costales y Núñez, 2004).

Sobre esta base, el marcado efecto de estimulación del crecimiento micelial de otras especie por parte de la fracción de metabolitos fúngicos estudiada en este caso, constituye un indicio preliminar que justifica la investigación orientada a la búsqueda de otras propiedades en la misma.

La marcha analítica cualitativa practicada al producto evidenció la presencia de algunos grupos de metabolitos que otros autores hallaron asociados a diferentes tipos de actividad biológica en especies fitopatógenas (tabla 2):

Tabla 2. Metabolitos identificados en la fracción aislada a partir de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler.

No.	METABOLITO ENSAYADO	RESULTADO
1	Proteínas (grupos CONH <sub>2</sub> )	+++

2	Aminoácidos libres	+
3	Carbohidratos y/o glicósidos	++
4	Azúcares reductores	-
5	Glicósidos	++
6	Monosacáridos	-
7	Enzimas	+
8	Compuestos fenólicos	+
9	Lípidos	-
10	Flavonoides	-
11	Cumarinas	-
12	Triterpenos y/o Esteroides	-

El ensayo general para la identificación de proteínas provocó una intensa reacción de desarrollo de color indicativa de la presencia de grupos  $-CONH_2$  (enlace peptídico) y, por lo tanto, de proteínas (o péptidos). Así mismo, resultaron positivas las reacciones correspondientes a los ensayos para la detección de carbohidratos y/o glicósidos y la específica para glicósidos, cuyo hecho, unido a la ausencia de monosacáridos y azúcares reductores evidenciada por los ensayos correspondientes, sugiere la presencia de al menos un compuesto de naturaleza glicosídica (probablemente una glicoproteína) en la fracción aislada. Solo se observó una débil reacción de desarrollo de color en los ensayos para la identificación de aminoácidos libres, enzimas y compuestos fenólicos, lo cual puede estar dado por la presencia de trazas de estos metabolitos o a interferencias provocadas por grupos o sustituyentes presentes en algunas de las otras especies químicas identificadas.

La presencia de glicósidos y proteínas (o glicoproteína) en la fracción aislada del patógeno resulta significativa desde el punto de vista del efecto biológico observado sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsi* Sacc. si se tiene en cuenta que otros autores hallaron metabolitos fúngicos de esta naturaleza asociados a diferentes tipos de actividades biológicas. Cabe destacar, a este respecto, los trabajos de Acosta et al. (1998) donde se estudiaron ciertas moléculas de proteínas llamadas elicinas aisladas a partir del medio de cultivo de diferentes especies del género *Phytophthora* y que mostraron un potente efecto de elicitación de necrosis hipersensible e inducción de resistencia sistémica en plantas de tabaco. Por otra parte, Gutiérrez et al. (1998) reportaron la presencia de glicoproteínas en aislados obtenidos del medio de cultivo y la pared celular de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* así como de otras especies fúngicas.

### Conclusiones.

- La fracción de metabolitos obtenida a partir del hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler mostró un marcado efecto de estimulación sobre el crecimiento micelial del hongo *Sclerotium rolfsi* Sacc.
- La caracterización química cualitativa del producto demostró la presencia de proteínas y glicósidos, probablemente alguna glicoproteína, que podrían ser la causa del efecto biológico observado.

### Bibliografía.

Acosta, A; Paz-Lago, D y Gutiérrez, A. (1998) Obtención y purificación parcial de  $\alpha$  y  $\beta$  elicina a partir de cultivo estacionario de dos especies del género *Phytophthora*. En: XI Congreso Científico del INCA. (Nov. 17-20, La Habana).

Memorias. CD-ROM. ISBN 959-7023-27-X. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Castellanos, J. J.; Ortiz, Leanne; Oliva, P.; Dueñas, J. M.; Fresneda, J.; Fraga, Sahily y Meléndez, Odalys (2004) Estudios relacionados con el uso de *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos. En: XIV Congreso Científico del INCA. (nov. 9-12, La Habana). Memorias. CD-ROM. ISBN 959-7023-27-X. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Costales, Daimy y Miriam Núñez (2004) El uso de productos bioactivos en el crecimiento de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). En: XIV Congreso Científico del INCA. (nov. 9-12, La Habana). Memorias. CD-ROM. ISBN 959-7023-27-X. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

De la Noval, B.; Castillo, I.; Martínez, B.; León, O. y J. P. Delano. 2004. Efecto de las micorrizas arbusculares y la sistemina sobre el control de *Phytophthora* y *Alternaria* en tomate. En: XIV Congreso Científico del INCA. (nov. 9-12, La Habana). Memorias. CD-ROM. ISBN 959-7023-27-X. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Falcón, A.; Costales, Daimy; Cabrera, J. C. y M. A. Ramírez. (2004= Productos naturales en la protección de los cultivos: quitosana como activador de respuestas defensivas e inductor de resistencia en plantas de tabaco contra patógenos fúngicos. En: XIV Congreso Científico del INCA. (nov. 9-12, La Habana). Memorias. CD-ROM. ISBN 959-7023-27-X. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

González, María E.; Hernández, María M.; Hernández, Annia; Rodríguez, Yohana y Cabrera, Mirella. (2004) Empleo de metabolitos de origen bacteriano en la embriogénesis somática del cafeto (*Coffea canephora* P.). En: XIV Congreso Científico del INCA. (nov. 9-12, La Habana). Memorias. CD-ROM. ISBN 959-7023-27-X. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Gutiérrez, A.; Paz-Lago, Dalila; Morales, Daysi; Acosta, A.; Ortiz, Ursula; Fernández, A y Hernández, A. (1998) Actividad inmunizante de elicitors fúngicos extraídos de la pared celular de *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* mediante enzimas industriales con actividad  $\beta$  1,3 glucanasa. En: XI Seminario Científico del INCA. (Nov. 17-20, La Habana). Resúmenes. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

López, Tania y Ortiz, Y. (2003) Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales. Departamento de Farmacia. Santiago de Cuba. 55pp.

Paz-Lago, D; Cabrera, G; Ramírez, M. A; Pombo, R y A. Gutiérrez. (1999) Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum fsp licopersicii* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales*, 20 (3): 59-61.

Roller, S. and N. Covill. (2000) The antimicrobial properties of Chitosan in Mayonnaise and Mayonnaise-Based Shrimp Salads. *Journal of Food Protection*, 63 (2): 202-209.

**Fecha de recibido: 14 de mar. 2008**  
**Fecha de aprobado: 8 de may. 2008**