

RAD: 13-36699- -8	FECHA: 2015-01-15 19:05:12
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 1 REGISTRO/DEPOSITO/CONCESION/DEPOSITO
TRA: 2 PATENTES DE INVENCION	FOLIOS: 10
ACT: 519 PRESENTACION	

Abogado(a)/Señor(a)
CARLOS R. OLARTE GARCIA

Asunto:	Radicación:	13-36699- 8
	Trámite:	2
	Evento:	1
	Actuación:	519
	Oficio:	237
	Folios:	10

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional	X				
Vía PCT (Fase Nacional)		Capítulo I		Capítulo II	
No. Solicitud Internacional					
Fecha de Presentación Internacional					

Descripción:	Radicado N°13-036699-00000-00000	22/Febrero/2013
Reivindicaciones:	Radicado N°13-036699-00000-00000	22/Febrero/2013

Título de la solicitud: “Proceso para potenciar la producción de sustancias de *Ganoderma Lucidum* y su actividad antifúngica”

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de desarrollar un proceso alternativo para aumentar la obtención de extractos o metabolitos de *Ganoderma lucidum* y su actividad fúngica.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un proceso para potenciar la producción de sustancias con actividad antifúngica obtenidas a partir de *Ganoderma lucidum* debidamente definidos (radicado N°13-036699-00000-00000, Pág. 1).

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A 01 N 63/04 // 65/00 // P 17/00 // 3/00

3. No es una invención (Art 15 D 486 literal (b))

El objeto de la reivindicación 1 hace referencia a un proceso biológico natural, un proceso de extracción de activos que produce el hongo, mencionando las etapas generales que tiene todo proceso de extracción de activos, por lo anterior se concluye que el procedimiento no puede ser objeto de patente de conformidad con lo dispuesto en el artículo 15 lit. b) de la referida Decisión 486.

De igual forma dicho proceso es mencionado en D1 (reivindicaciones)

El objeto de las reivindicaciones 20 – 23, 28, 30, 31 no se considera una invención, de acuerdo con el Art citado, por cuanto claramente se identifica un extracto o fracciones del mismo a partir de material vegetal de cualquier planta que comprende diferentes tipos de metabolitos sin especificar algún compuesto marcador que caracteriza el extracto y su huella cromatográfica, por lo tanto, corresponde a material biológico tal y como se encuentra en la naturaleza o a aquel que pueda ser aislado, ya que no existe evidencia del diseño de una composición que incluya las fracciones y extractos caracterizados por algún compuesto marcador, por lo anterior se concluye que el extracto no puede ser objeto de patente de conformidad con lo dispuesto en el artículo 15 lit. b) de la referida Decisión 486.

Por otra parte, se recuerda a la solicitante que cuando se habla de un ingrediente botánico extraído o sustancia se puede tratar de un compuesto puro, o una mezcla de compuestos conocidos y plenamente identificados por diferentes métodos de elucidación estructural, situación que se omite en el caso de la solicitud en estudio. Asimismo, es necesario aclarar que la obtención de compuestos biológicamente activos a partir de fuentes naturales incluye procesos de secado, extracción, purificación, evaluación biológica, elucidación química y estructural, elementos que no se encuentran dentro de la divulgación de la solicitud. Y por otra parte, cuando se habla de un extracto es necesario hacer alusión al tipo de extracto, parte de la planta de donde se obtiene y método de obtención. Seguido de al menos el perfil cromatográfico donde se indique al menos el compuesto marcador y el diseño de composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o alimenticias a partir el mismo, sin embargo, dicha información tampoco se encuentra reportada en la reivindicación independiente.

4. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El uso de las reivindicaciones 34 a 41 no es patentable, de acuerdo con el Art 14, puesto que las reivindicaciones mencionan el uso del extracto o del hongo.

5. De la Solicitud de Patente

Título

El título no corresponde con el objeto de la solicitud porque solo se menciona el resultado a alcanzar por la solicitud, lo cual no define la patente, se deben mencionar

las etapas importantes o alguna expresión que lo diferencie de los procesos conocidos, por lo cual se sugiere al Solicitante hacer la corrección necesaria.

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Todo el capítulo reivindicatorio evidencia un procedimiento básico se debe seguir para obtener un extracto o un metabolito de cualquier hongo^{1,2,3,4,5,6} por lo tanto correspondería a un procedimiento común que se realiza para obtener un extracto o un metabolito de un hongo. Además de acuerdo al metabolito que se desea y el hongo que lo produce varían algunas condiciones del método o los solventes con el fin de obtener una alta cantidad del solvente.

El capítulo reivindicatorio no es claro porque no se encuentra debidamente sustentado en las realizaciones preferidas de la descripción porque no se evidencia las etapas de los procedimientos descritos en la descripción, ni se evidencia el mencionado efecto de aumentar la obtención de extractos o metabolitos, sino que simplemente se evidencia un procedimiento típico de obtención de un extracto o de metabolitos.

Las reivindicaciones 1 – 8, 26 y 33 mencionan el procedimiento, pero se mencionan etapas muy generales y típicas de un proceso de obtención de un extracto o un metabolito sin mencionar cantidades, tiempos, condiciones de las etapas, entre otras. Por lo tanto teniendo en cuenta lo mencionado en la descripción se debe plantear bien el procedimiento con unas etapas bien definidas por sus cantidades, condiciones y componentes.

Las reivindicaciones 8 y 33 son iguales, solo se diferencian por el preámbulo pero las características esenciales del procedimiento son las mismas por lo tanto se debe unificar en un solo procedimiento es innecesario dos procedimientos con las mismas etapas.

En las reivindicaciones 7 – 9, 25, 26 se mencionan los términos o expresiones “buffer adecuado”, “moléculas bioactivas”, “polisacáridos”, “ácidos grasos”, “surfactante no iónico”, “polímero hidrosoluble”, “solvente orgánico”, “vehículo agroquímicamente aceptable”, se está haciendo alusión a términos o expresiones muy amplias que abarcan muchas familias de compuestos, puesto que para una persona de nivel medio versada en la materia este evoca su función y no se está indicando la denominación común de los compuestos. Se sugiere definir a qué tipo o tipos de los anteriores términos se está haciendo referencia, pues no se puede definir sólo por su función. De acuerdo a lo sustentado en la descripción.

Las reivindicaciones 21, 23, 24, 28, 30, 31, no son claras porque mencionan las expresiones “exhibe actividad anti fúngica” y “exhibe inhibición sustancial de *Mycosphaerella fijiensis*” lo que corresponde a un resultado a alcanzar, lo cual no define al extracto ni al procedimiento porque la invención no queda definida por el resultado a alcanzar, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta

1 Rodríguez J., Evaluación de metabolitos de *Ganoderma Lucidum* con Actividad Antifúngica frente a Aislamientos humanos y animales de *Aspergillus* spp. y dermatófitos, Tesis De Grado, Facultad De Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Mayo 2010

2 Débora Figlasa, et Al. Monografía sobre las propiedades medicinales del hongo Reishi (*Ganoderma Lucidum*). Departamento De Agronomía, Universidad Nacional Del Sur, Argentina

3 Rojas Rene. Evaluación de métodos de extracción y purificación de enzimas pectinolíticas obtenidas por fermentación en estado semisólido del *Aspergillus niger*. Departamento de Ingeniería de Procesos, Escuela de Ingenierías, Universidad Eafit, Medellín, 2009

4 Leof F., Química Y Síntesis De Los Principios Activos Aislados De Hongos Superiores. Sus Posibles Aplicaciones Farmacológicas. Tesis Doctoral. Universidad La Laguna. I.S.B.N.: 84-7756-646-1

5 Moreno H. Et Al. , Aislamiento e Identificación de dos Esteroles y un Triterpenoide del Cuerpo Fructífero De *Ganoderma Lucidum* Cultivado En Colombia, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica, Universidad De Antioquia, Medellín, Colombi, Volumen 18 Número 1, Año 2011

por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.

6. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la Fecha de Presentación de la Solicitud, febrero 22 de 2013 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	US20080138875	“Method to generate fungal biomass from a culture of differentiated mycelium”	12/junio/2008
D2	Rodriguez J., Tesis De Grado, Facultad De Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana	“Evaluación de metabolitos de <i>Ganoderma Lucidum</i> con Actividad Antifúngica frente a aislamientos humanos y animales de <i>Aspergillus spp.</i> y dermatofitos”	Mayo/2010
D3	Jorge R. Palacios et al., Fitosanidad vol. 15, no. 2, universidad de la habana	“Actividad antifúngica in vitro de extractos de <i>Navisporus floccosus</i> y <i>Ganoderma sp.</i> contra hongos fitopatógenos”	Abril- junio /2011
D4	Tabares A.et al., Universidad tecnológica de Pereira, Facultad de tecnología, Escuela de tecnología química, Grupo polifenoles, Pereira	“Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto etanólico del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> cultivado en residuos de la industria cafetera y fructificado bajo radiaciones del espectro visible de longitudes de onda específica”	2013
D5	Rojas D., et al., The Open Conference Proceedings Journal, 4; Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia	“Basidiomycetes Mushroom Biotechnology for the Development of Functional Products: The Effect of Drying Processes on Biological Activity”	2013
D6	Moreno H. et al., Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica, ISSN 0121-4004 / ISSNe 2145-2660. Volumen 18 número 1, año 2011. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia	“Aislamiento e identificación de dos esteroides y un triterpenoide del cuerpo fructífero de <i>Ganoderma lucidum</i> cultivado en Colombia”	2011

El documento D1 ^[6] divulga un método para producir biomasa que comprende A. Inocular células *Ganoderma lucidum* en un medio de cultivo que contiene al menos una fuente de carbono; C. Incubar hasta que sea visible la producción de biomasa; D. purificar y recolectar la biomasa (Pág. 1, Párr. [0016] – [0020])

El documento D2 ^[7] divulga un método que comprende realizar siembras de *Ganoderma lucidum* en agar YGC, el micelio secundario es producido en medio líquido mediante condiciones establecidas y optimizadas, la biomasa producida fue filtrada por vacío y liofilizada (Pág. 13 a 16):

El documento D3 ^[8] divulga un método que comprende los aislados se inocularon en agar papa dextrosa, se realiza una fermentación líquida con una agitación por 21 días, se separa la biomasa de los filtrados líquidos (Métodos y materiales, Pág. 124 -125)

El documento D4 ^[9] divulga un método que comprende la *Ganoderma* fue repicada por triplicado en tubos

⁶URL:[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=US&NR=2008138875A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20080612&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en_EP)

[CC=US&NR=2008138875A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20080612&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en_EP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=US&NR=2008138875A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20080612&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en_EP)

⁷Anexo 1

⁸Anexo 2

⁹Anexo 3

de ensayo con Agar Papa Dextrosa, el crecimiento y desarrollo de los hongos culminó con la formación y maduración completa del carpóforo pasados alrededor de 5 meses, desde la inoculación, El crecimiento y desarrollo de los hongos culminó con la formación y maduración completa del carpóforo pasados alrededor de 5 meses, desde la inoculación. Para su cosecha, la seta fue tomada de la base del estipe, y retorciéndolo fue retirado del sustrato. A partir de los hongos fructificados a diferente longitud de onda, se tomaron 10 g de cada uno, previamente secos y triturados (Pág. 40 – 43).

El documento D5 ^[10] divulga Método que comprende un medio de cultivo es inoculado con 90mL de preinoculo, para *Ganoderma lucidum*, después de la cultivación, la biomasa del hongo es homogenizada Un litro de biomasa fue separado por centrifugación (Pág. 94)

El documento D6 ^[11] divulga la muestra de *Ganoderma lucidum* se cultivó en el sector de San Javier, en la ciudad de Medellín (Departamento de Antioquia, Colombia) y la facilitó la empresa Hongos y Nutracéuticos S. A. Luego los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* se secaron y trituraron en un molino de cuchillas. De la muestra molida se extrae con metanol, con agitación continua, en ausencia de luz, durante 12 horas. Luego se hizo un reflujo abierto con calentamiento suave durante 30 minutos. El extracto se filtró y el residuo se extrajo 2 veces más. (Pág. 12).

7. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Se realiza el examen de novedad para evidenciar que efectivamente es un proceso biológico y que es ampliamente conocido, por tanto no es patentable.

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 1 consiste en un procedimiento para obtener sustancias con actividad antifúngica debidamente definida (Rad. N°13-036699-00000-00000, Pág. 36)

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2	D3	D4	D5
Procedimiento que incluye los siguientes pasos:	Método para producir biomasa que comprende (Pág. 1, Párr. [0016] – [0020])	Método que comprende (Pág. 13 y 14):	Método que comprende (Métodos y materiales, Pág. 124):	Método que comprende (Pág. 40 – 43):	Método que comprende (Pág. 94):
a- inocular <i>Ganoderma lucidum</i> en un medio de cultivo adecuado	A. Inocular células <i>Ganoderma lucidum</i> en un medio de cultivo que contiene al menos una fuente de carbono	Se realizan siembras de <i>Ganoderma lucidum</i> en agar YGC	Los aislados se inocularon en agar papa dextrosa	<i>Ganoderma</i> fue repicada por triplicado en tubos de ensayo con Agar Papa Dextrosa	El medio de cultivo es inoculado con 90mL de preinoculo, para <i>Ganoderma lucidum</i>
b- obtener una biomasa bajo condiciones ambientales específicas	C. Incubar hasta que sea visible la producción de biomasa	El micelio secundario es producido en medio líquido mediante condiciones establecidas y optimizadas	Se realiza una fermentación líquida con una agitación pro 21 días	El crecimiento y desarrollo de los hongos culminó con la formación y maduración completa del carpóforo pasados alrededor de 5 meses, desde la inoculación.	Después de la cultivación , la biomasa del hongo es homogenizada

10⁰Anexo 4

11⁰Anexo 5

c- obtener de la biomasa un extracto proteico.	D. purificar y recolectar la biomasa	La biomasa producida fue filtrada por vacío y liofilizada	Se separa la biomasa de los filtrados líquidos	A partir de los hongos fructificados a diferente longitud de onda, se tomaron 10 g de cada uno, previamente secos y triturados.	Un litro de biomasa fue separado por centrifugación
--	--------------------------------------	---	--	---	---

Es posible concluir que las características esenciales del procedimiento de la reivindicación 1, habían sido divulgadas previamente en D1 o D2 o D3 o D4 o D5 y por lo tanto la reivindicación 1 carece de novedad al igual que las dependientes 2 a7.

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La **reivindicación 8** consiste en un procedimiento según la reivindicación 8 debidamente definido (Rad. N°13-036699-00000-00000, Pág. 37)

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D2	D3	D4	D5	D6
Procedimiento que comprende las etapas de:	Preparación que comprende:	Preparación que comprende:	Preparación que comprende:	Preparación que comprende:	Preparación que comprende:
a. lavar la biomasa con un buffer adecuado mediante centrifugación;	La biomasa se lleva a extracción por separado en éter de petróleo; luego extracción sólido – líquido con diclorometano , se filtran y rotaevaporan	La biomasa se secó a 40 °C durante 36 h, se maceró en metanol por espacio de 72 h, y la extracción del filtrado líquido se realizó con acetato de etilo. Ambos extractos se concentraron a presión reducida y se redisolvieron en metanol a una concentración de 5 mg × mL ⁻¹ .	A partir de los hongos fructificados a diferente longitud de onda, se tomaron 10 g de cada uno, previamente secos y triturados. Se disolvieron en 250 mL de Etanol Absoluto al 95 % y se llevaron a reflujo durante 2.30 horas, posteriormente se concentró cada extracto a presión reducida en un rotavaporador. Finalmente se obtuvieron los cuatro extractos etanólicos	Después de la cultivación, la biomasa de cada hongo fue homogenizada en un dispersor ULTRA-TURRAX a 25000rpm por 10min y sometido para 4 diferentes tratamientos (infrarojo, secado convección, atomización, secado en frio) , luego se procede a centrifugación y secar	Los cuerpos fructíferos de Ganoderma lucidum se secaron y trituraron. De la muestra molida se extrajeron con metanol, con agitación continua, en ausencia de luz, durante 12 horas. Luego se hizo un reflujo abierto durante 30 minutos. El extracto se filtró y el residuo se extrajo 2 veces más, con porciones de de metanol, durante 12 horas. Todos los extractos se juntaron y se rotaevaporaron a 45°C, a presión reducida y
subjectedb. homogenizar con solución de lisis en varios ciclos;					
c. dejar en reposo y filtrar;					
d. centrifugar y separar el lisado;					
e. adicionar un surfactante no iónico y un polímero hidrosoluble al lisado y homogenizar;	La biomasa se tritura en licuadora con etanol al 96 % v/v, y se realiza la extracción con el mismo solvente durante 48 h por el método				
f. dejar en reposo y centrifugar;					

g. adicionar un solvente orgánico hasta obtener un precipitado; y					
h. disolver el precipitado con buffer adecuado.	de maceración. En seguida los extractos se filtraron y concentraron				agitación constante. Posteriormente se hizo una partición líquido-líquido
	por				con

Los documentos D2, D3, D4, D5 y D6 son considerados el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 6 porque:

D2 divulga un método obtención de extractos a partir de biomasa por fraccionamiento sólido-líquido, una parte de la biomasa de los cuerpos fructíferos inmaduros- M1, maduros- M2 y el micelio secundario- M3, se llevó a extracción por separado en éter de petróleo y bajo agitación constante durante 48 horas para arrastrar los compuestos de polaridad más baja, posteriormente, se filtraron. Las tres muestras (biomasa filtrada) se llevaron de nuevo a extracción con el mismo solvente por otras 48 horas y posteriormente se filtraron. Los extractos obtenidos de las 48 y 96 horas se unificaron y se llevaron a refrigeración a 4°C.

Luego cada una de las muestras fueron llevadas a extracción por fraccionamiento sólido-líquido con Diclorometano (CH₂Cl₂) para arrastrar los compuestos de polaridad media, por 48 horas en agitación constante, estos fueron filtrados, y las muestras llevadas de nuevo a extracción con el mismo solvente por 48 horas más. Los extractos obtenidos de CH₂Cl₂ en las 48 y 96 horas se unificaron y llevaron a refrigeración a 4°C. Este mismo procedimiento se realizó de igual manera con los solventes, acetato de etilo (AcOEt) y etanol (EtOH). Todos los extractos fueron llevados a refrigeración a 4°C.

Los extractos se concentraron por rotaevaporación hasta el mínimo volumen o sequedad a presión reducida, listos para ser usados en los ensayos de actividad antifúngica.

También se menciona un método de Obtención de extractos etanólicos o crudos de los cuerpos fructíferos y biomasa producida en medio líquido de *G. lucidum*; Obtención de fracciones por separación líquido-líquido; Obtención de extractos a partir de caldo por fraccionamiento líquido-líquido (Pág. 13 – 16)

D3 divulga un método de obtención de extractos en donde los hongos se aislaron según lo recomendado por Stamets y Chilton (1983), y se conservaron por el método de Burdsall y Dorworth (1994). Posteriormente los aislados se inocularon en medio agar papa dextrosa (PDA) para los estudios de actividad biológica. Se menciona que concluida la fermentación se separaron las biomásas de los filtrados líquidos. Se procedió según la metodología propuesta por Rosa et al. (2003), la biomasa se secó a 40 °C durante 36 h, se maceró en metanol por espacio de 72 h, y la extracción del filtrado líquido se realizó con acetato de etilo. Ambos extractos se concentraron a presión reducida y se redisolviéron en metanol a una concentración de 5 mg × mL⁻¹. La evaluación del efecto sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos por los extractos bioactivos se realizó por el método en pocillos de Hur et al. (2003) (Pág. 124 – 125).

D4 divulga un método que comprende la *Ganoderma* que fue repicada por triplicado en tubos de ensayo con Agar Papa Dextrosa, el crecimiento y desarrollo de los hongos culminó con la formación y maduración completa del carpóforo pasados alrededor de 5 meses, desde la inoculación, El crecimiento y desarrollo de los hongos culminó con la formación y maduración completa del carpóforo pasados alrededor de 5 meses, desde la inoculación. Para su cosecha, la seta fue tomada de la base del estipe, y

retorciéndolo fue retirado del sustrato. A partir de los hongos fructificados a diferente longitud de onda, se tomaron 10 g de cada uno, previamente secos y triturados. A partir de los hongos fructificados a diferente longitud de onda, se tomaron 10 g de cada uno, previamente secos y triturados. Se disolvieron en 250 mL de Etanol Absoluto (Merk) al 95 % y se llevaron a reflujo durante 2.30 horas, posteriormente se concentró cada extracto a presión reducida en un rotavaporador HEIDOLPH-4003. Finalmente se obtuvieron los cuatro extractos etanólicos (Pág. 40 – 43)

D5 divulga una preparación donde después de la cultivación, la biomasa de cada hongo fue homogenizada en un dispersor ULTRA-TURRAX a 25000rpm por 10min y sometido para 4 diferentes tratamientos (infrarrojo, secado convección, atomización, secado en frío). En el método de infrarrojo y secado convección, un litro de biomasa es separado de centrifugación a 9000rpm por 10min y las diferentes muestras son secadas a 70°C en infrarrojo o horno convección (Pág. 94)

D6 divulga que la muestra de *Ganoderma lucidum* se cultivó en el sector de San Javier, en la ciudad de Medellín (Departamento de Antioquia, Colombia) y la facilitó la empresa Hongos y Nutracéuticos S. A. Luego los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* se secaron y trituraron en un molino de cuchillas. De la muestra molida se pesaron 100 g y se extrajeron con 1,6 litros de metanol grado reactivo, con agitación continua, en ausencia de luz, durante 12 horas. Luego se hizo un reflujo abierto con calentamiento suave durante 30 minutos. El extracto se filtró y el residuo se extrajo 2 veces más, con porciones de 800 y 200 mL de metanol, durante 12 horas. Todos los extractos se juntaron y llevaron a sequedad en un rotaevaporador a una temperatura menor a 45°C, a presión reducida y agitación constante. Posteriormente se hizo una partición líquido-líquido con cloroformo / agua (3:2), por duplicado. La fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad obteniéndose un residuo de 1,75 g. luego se procede a hacer un fraccionamiento cromatográfico (Pág. 12).

La diferencia entre el procedimiento de D2 o D3 o D4 o D5 o D6 radica en que no se mencionan de manera específica las etapas como si lo hace la presente solicitud, pero los métodos de dichos documentos si evidencia el resultado final y se obtiene una biomasa que dependerá del activo que se desee.

El efecto que logra realizar dicho orden de las etapas o la presencia de alguna etapa en el producto final no puede ser determinado porque no existe alguna evidencia que indique que dicha procedimiento tenga alguna ventaja técnica en cuanto aumentar la obtención de extractos o metabolitos de *Ganoderma lucidum* y su actividad fúngica, respecto a los métodos ya conocidos en la anterioridad D2 o D3 o D4 o D5 o D6, puesto que en D2 o D3 o D4 o D5 o D6 ya se menciona la obtención de los extractos y el efecto fungicida de los mismos.

Por lo tanto el Problema Técnico Objetivo de la presente solicitud consiste en proporcionar una alternativa al procedimiento para obtener sustancias con actividad antifúngica que presente un aumento en la obtención de extractos y metabolitos en comparación con lo mencionado en D2 o D3 o D4 o D5 o D6.

Como consecuencia de los hechos mencionados en los párrafos anteriores la persona medianamente versada en la materia habría derivado de manera obvia y sin mucho esfuerzo de su parte el procedimiento descrito en la reivindicación 8 de la presente solicitud a partir de las enseñanzas del documento D2 o D3 o D4 o D5 o D6, toda vez que para una persona versada en la materia a partir de dichas enseñanzas es posible derivar el procedimiento, al igual que es un procedimiento ampliamente conocido para obtener extractos o bioactivos y depende del tipo de sustancia que se desee las variaciones del proceso, además que no se evidencia un efecto sorprendente que lo diferencie de los demás métodos. Por lo tanto a la luz del documento D2 o D3 o D4 o D5 o D6 la reivindicación resulta obvia.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 9 – 19, 26, 27, 33 y no mencionan características inventivas adicionales, tampoco puede ser considerada inventiva.

Conclusión:

Las reivindicaciones 8 – 19, 26, 27, 33, cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

8. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US20080138875	1 a 7	Novedad
D2	Rodriguez J., Tesis De Grado, Facultad De Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana	1 a 7 / 8 – 19, 26, 27, 33	Novedad / Nivel inventivo
D3	Jorge R. Palacios et al., Fitosanidad vol. 15, no. 2, universidad de la habana	1 a 7 / 8 – 19, 26, 27, 33	Novedad / Nivel inventivo
D4	Tabares A.et al., Universidad tecnológica de Pereira, Facultad de tecnología, Escuela de tecnología química, Grupo polifenoles, Pereira	1 a 7 / 8 – 19, 26, 27, 33	Novedad / Nivel inventivo
D5	Rojas D., et al., The Open Conference Proceedings Journal, 4; Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia	1 a 7 / 8 – 19, 26, 27, 33	Novedad / Nivel inventivo
D6	Moreno H. et al., Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica, ISSN 0121-4004 / ISSNe 2145-2660. Volumen 18 número 1, año 2011. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia	8 – 19, 26, 27, 33	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir del día siguiente de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2015-01-20

Elaboró: Mayra Alejandra Quintero
Revisó: Gloria Jacqueline Alfonso Roza

**EVALUACIÓN DE METABOLITOS DE *Ganoderma lucidum* CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA FRENTE A AISLAMIENTOS HUMANOS Y ANIMALES DE *Aspergillus*
spp. Y DERMATÓFITOS**



KAROL JACKELINE RODRIGUEZ VILLAMIL

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

DIRECTORA

María Ximena Rodríguez Bocanegra Ph.D.

CODIRECTORA

Melva Linares

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Bogotá D. C.

Mayo de 2010

**EVALUACIÓN DE METABOLITOS DE *Ganoderma lucidum* CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA FRENTE A AISLAMIENTOS HUMANOS Y ANIMALES DE *Aspergillus*
spp Y DERMATÓFITOS**

ESTUDIANTE

KAROL JACKELINE RODRIGUEZ VILLAMIL

APROBADO

Dra. Ingrid Schuler

Bióloga Ph.D.

Decana Académica Facultad de Ciencias

Dra. Janeth Arias Palacios

Bacterióloga MSc.

Directora Carrera de Microbiología

**EVALUACIÓN DE METABOLITOS DE *Ganoderma lucidum* CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA FRENTE A AISLAMIENTOS HUMANOS Y ANIMALES DE *Aspergillus*
spp Y DERMATÓFITOS**

ESTUDIANTE

KAROL JACKELINE RODRIGUEZ VILLAMIL

APROBADO


María Ximena Rodríguez Bocanegra
Microbióloga Ph.D.
Directora


Melva Linares Linares
Bacterióloga
Codirectora


Andrea García Caicedo
Microbióloga
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	8
3. Justificación y planteamiento del problema.....	9
4. Marco teórico	
4.1 Hongos Basidiomycetes como fuente de metabolitos activos.....	10
4.2 <i>Ganoderma lucidum</i>	10
4.3 Desarrollo de nuevos medicamentos.....	10
4.4 Antifúngicos.....	11
5. Objetivos	
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos específicos.....	12
6. Metodología	
6.1 <i>Ganoderma lucidum</i>	13
6.1.1 Obtención cuerpo fructífero.....	13
6.1.2 Obtención micelio secundario y medio líquido.....	13
6.2 Preparación extractos y fracciones.....	13
6.2.1 Obtención de extractos a partir de biomasa por fraccionamiento sólido-líquido.....	13
6.2.2 Obtención de extractos etanólicos o crudos de los cuerpos fructíferos y biomasa producida en medio líquido.....	14
6.2.3 Obtención de fracciones por separación líquido-líquido.....	14
6.2.4 Obtención de extractos a partir me medio líquido por fraccionamiento líquido-líquido.....	14
6.3 Evaluación de la actividad anntifúngica de los extractos crudos,	

fracciones y caldo.....	15
6.3.1 Hongos miceliales patógenos oportunistas.....	15
6.3.2 Extractos y fracciones.....	15
6.3.3 Difusión en placa de agar.....	15
6.4 Análisis estadístico.....	16
7. Resultados y discusión	
7.1 Obtención de cuerpo fructífero de <i>G. lucidum</i>	17
7.2 Obtención micelio y medio líquido.....	17
7.3 Obtención de extractos y fracciones de <i>G. lucidum</i>	17
7.4 Evaluación actividad antifúngica de los extractos crudos, fracciones y caldo.....	18
8. Conclusiones y recomendaciones.....	27
9. Bibliografía	28
10. Anexos	
Anexo 1.....	31
Anexo 2.....	32
Anexo 3.....	32
Anexo 4.....	32
Anexo 5.....	33
Anexo 6.....	34
Anexo 7.....	38

1. RESUMEN

Durante este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de extractos y fracciones obtenidos a partir del micelio liofilizado y del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum*, obtenidos de un cultivo de Cumaral (Meta), así como del medio líquido en el cual se obtuvo la biomasa, los cuales fueron evaluados frente a tres cepas de *Aspergillus* spp, *Aspergillus* No. 1 de origen humano, *Aspergillus* No. 2 de origen humano y *Aspergillus* No. 10 de origen animal; y dos cepas de dermatófitos, una cepa de *Microsporum canis* No. 5 de origen animal y otra cepa de *Microsporum gypseum* No. 7 de origen humano. Se obtuvieron 18 extractos a partir del cuerpo fructífero, 9 a partir del cuerpo fructífero maduro y 9 a partir cuerpo fructífero inmaduro; 9 extractos a partir del micelio secundario y 3 extractos a partir del medio líquido donde se produjo la biomasa. Los extractos se obtuvieron a partir de fraccionamientos sólido-líquido y líquido-líquido, con solventes de diferente polaridad como éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol. Tres de las cinco cepas evaluadas presentaron inhibición frente a los extractos de *G. lucidum*, de esas, dos cepas son de origen humano *Aspergillus* No. 1 y *M. gypseum* y una de origen animal *Aspergillus* No. 10. Finalmente se encontró que cuatro extractos presentaron actividad antifúngica frente a *Aspergillus* No. 1; CH₂Cl₂ seriado biomasa del micelio, AcOEt seriado líquido-líquido del micelio, fase CH₂Cl₂ y fase AcOEt del medio líquido, con porcentajes de inhibición no superiores al 10%. Por el contrario, 15 de los 30 extractos probados presentaron actividad antifúngica frente a la cepa de *Aspergillus* No. 10, no superando el 23% de inhibición de crecimiento de la cepa. Para *M. gypseum*, sólo tres cepas presentaron actividad antifúngica, aunque presentaron los porcentajes más altos de inhibición de todos los extractos frente a las cinco cepas evaluadas. El extracto CH₂Cl₂ seriado biomasa del cuerpo fructífero inmaduro no esporulado presentó un 21.91% de inhibición, el extracto CH₂Cl₂ seriado líquido-líquido del cuerpo fructífero inmaduro no esporulado presentó un 32.81% de inhibición y el extracto fase AcOEt del medio líquido presentó la mayor actividad antifúngica, con un 35% de inhibición frente a *M. gypseum*.

2. INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas se han identificado un gran número de compuestos, a partir de los hongos del género *Ganoderma*, caracterizados por presentar diferentes tipos de actividad biológica, destacándose sustancias con actividad citotóxica, inmunomodulatoria, antioxidante, insecticida y bactericida, entre otras, siendo ampliamente utilizadas en el ámbito medicinal y farmacéutico.

Dentro de los compuestos activos de interés farmacéutico de *G. lucidum* se encuentran los triterpenoides, proteínas, esteroides, alcaloides, ácidos grasos y polisacáridos, especialmente los β -D-glucanos, los cuales podrían presentar propiedades antifúngicas, lo cual sería una posible solución ante la gran cantidad de casos de infecciones causadas por hongos (41).

Este aumento en los últimos años de la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, relacionado fundamentalmente con el aumento de pacientes inmunodeprimidos, uso generalizado de antimicrobianos y utilización de inmunosupresores, entre otros factores, que ocasionan el aumento de todo tipo de infecciones por hongos (5). Igualmente, se ha observado a nivel mundial, un incremento de la resistencia farmacológica de varias especies de hongos a los diferentes antimicóticos que se utilizan en la práctica médica, además de las pocas las sustancias en el mercado con actividad antifúngica, lo que conlleva a la búsqueda de nuevos antifúngicos funcionales ante este tipo de problemática.

El trabajo de grado desarrollado se encuentra enmarcado dentro del proyecto “Evaluación de metabolitos de *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a aislamientos de dermatofitos, *Aspergillus* y *Fusarium* de infecciones humanas y animales”, dirigido por el grupo de investigación UNIDIA (Unidad de Investigaciones Agropecuarias). Este trabajo pretende evaluar si alguno de los extractos de las diferentes muestras de *Ganoderma lucidum* presenta algún tipo de actividad antifúngica frente a los aislamientos de las cepas de *Aspergillus* spp. y dermatofitos.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De los hongos más implicados en las infecciones micóticas oportunistas encontramos a los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* y el grupo de los dermatofitos (20,25).

Esta situación ha llevado a explorar y valorar el uso de productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos, con un mayor espectro de acción y menor toxicidad. Dentro del reino hongo se dispone de una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad biológica, los cuales podrían ser utilizados como una alternativa para el diseño y formulación de fármacos para tratamiento clínico (20). La familia Ganodermataceae constituye un grupo de hongos productores de metabolitos secundarios con atribuciones farmacológicas (4). Dentro de las especies pertenecientes a esta familia, *Ganoderma lucidum* ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y antitumorales (37). Adicionalmente, se encuentran reportes de actividad antibacteriana y antiviral (18), pero son pocos los reportes sobre actividad antifúngica (23,39).

En la misma medida, las infecciones micóticas han mostrado un incremento importante afectando a gran parte de la población, lo cual disminuye la calidad y expectativas de vida por la morbilidad; unido esto a la resistencia que han empezado a tener estos microorganismos a los antimicóticos, lo cual ha ejercido cierta influencia sobre la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos.

El reporte de hongos emergentes como patógenos humanos, el perfil innato de resistencia frente a los antifúngicos convencionales y la alta morbi-mortalidad de los pacientes que sufren estas infecciones, hacen que sigamos en la búsqueda de nuevos antifúngicos que ofrezcan alternativas de manejo de estas micosis, mejorando el pronóstico de los individuos que las padecen.

El papel cada vez más importante de los hongos dentro de las enfermedades infecciosas humanas ha ejercido una fuerte influencia sobre la investigación y el desarrollo de nuevos y variados fármacos, con un mayor espectro de acción y menor toxicidad que los actuales (20).

Por estas razones, se deben orientar esfuerzos a la búsqueda de nuevos antimicóticos que superen dichas limitaciones, siendo esta problemática la que nos permite formular esta propuesta con el objetivo de buscar metabolitos de *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a aislamientos del género *Aspergillus* y dermatofitos como *Microsporum*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Hongos Basidiomycetes como fuente de metabolitos bioactivos

En los últimos años se han descubierto sustancias antimicóticas a partir de hongos, muchos de estos con fuentes abundantes de productos y componentes con actividad biológica (30). Los hongos que pertenecen al género *Ganoderma* se encuentran en la cima de la medicina oriental desde hace muchos años, y es uno de los grupos más importantes de productos naturales en Asia y Norte América (4).

4.2 *Ganoderma lucidum*

Ganoderma es un basidiomycete polyporal, perteneciente a la familia Ganodermataceae, de características lignocelulolíticas, conocido como “Ling zhi” en China y “Reishi” en Japón (33). *Ganoderma* ha sido utilizado ancestralmente por las culturas orientales por sus bondades medicinales, en el tratamiento de migraña, hipertensión, artritis, bronquitis, asma, diabetes, hipercolesterolemia y problemas cardiovasculares. También se afirma que tiene propiedades anticancerígenas y antimicrobianas. Dentro de los metabolitos bioactivos se destacan polisacáridos y terpenoides, especialmente triterpenos (24,30,40). Son varias las especies de *Ganoderma* que se usan con propósitos medicinales aunque la mayoría de las investigaciones se han centrado en *Ganoderma lucidum*. (4).

4.3 Desarrollo de nuevos medicamentos

Los medicamentos de origen natural (microbiano, vegetal o animal) ocupan la mayoría del mercado para tratamientos en salud humana. Ejemplos como ciclosporina y lovastatina claramente demuestran el potencial innovador de los productos naturales y su impacto en el progreso del descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (16).

Aunque los nuevos enfoques en el descubrimiento de nuevos fármacos, como la química combinatoria y los diseños de modelación computacional, han ganado un mayor protagonismo en los últimos años, los productos naturales continúan siendo la mayor fuente de moléculas bioactivas (10,17). Tradicionalmente una de las fuentes naturales más estudiadas en el campo del desarrollo de nuevos fármacos son las plantas (etnofarmacología); sin embargo el uso de microorganismos como fuente de moléculas bioactivas también ha sido ampliamente explorado y desarrollado (antibióticos).

Ambas fuentes ofrecen sus propias ventajas en cuanto a la naturaleza química de las moléculas; en plantas las rutas metabólicas de los terpenoides y fenilpropanoides son

predominantes, mientras que en microorganismos lo son las rutas de las policetonas (35). En contraste con las plantas, en el trabajo con microorganismos es más sencillo obtener mayor cantidad de biomasa para el aislamiento de los metabolitos, además de ser más viable la inducción de su biosíntesis. En el campo de los antimicrobianos los actinomycetes han sido y permanecen siendo una de las mayores fuentes de nuevos compuestos (10).

Aunque la extracción de compuestos bioactivos a partir de diferentes hongos tiene una larga historia, hasta hace poco tiempo se han desarrollado estudios donde se evidencia la diversidad y el uso de los metabolitos secundarios generados por hongos diferentes a los producidos por hongos mitospóricos (16). En cuanto a hongos macromicetos, desde la antigüedad, civilizaciones como la mesopotámica y aztecas los usaban para fines terapéuticos (29). Actualmente los hongos basidiomicetos están siendo objeto de interés en el campo de la farmacología gracias a las propiedades inmunomoduladoras de sus metabolitos (19).

Debido a que no se encuentran muchos compuestos naturales puros para ser sometidos a pruebas para determinar actividad biológica, se usan extractos de fuentes naturales; pero estos pueden presentar problemas a nivel experimental, como el solapamiento del efecto biológico por mayores concentraciones de otros metabolitos sin función biológica o falsos positivos por sinergismo entre varios compuestos. Por esta razón, es necesario realizar un fraccionamiento de los extractos de origen natural. Este enfoque es también empleado en los programas de pruebas de tecnología de punta ("high throughput screening") para los desarrollos más avanzados en farmacología (32).

A los protocolos para compuestos con actividad biológica también se han sumado estrategias sencillas de caracterización química de extractos, que han sido de gran utilidad para orientar la búsqueda de estos compuestos. Este concepto de pruebas químicas ("chemical screening") se basa en el análisis por cromatografía de capa delgada (CCD) de extractos microbianos, en el que se determina un patrón de metabolitos secundarios de un microorganismo por su reacción con tinciones para determinación de grupos funcionales (2,15).

4.4 Antifúngicos

En la actualidad son muy pocos los antimicóticos con los que podemos contar para una terapia antifúngica, en comparación con los antibacterianos, los cuales deben tener en cuenta variables como espectro de acción y seguridad (1).

Por más de 50 años la anfotericina B fue considerada el gold estándar en terapias antifúngicas a pesar de su alta toxicidad. Hacia los años 90 se introdujeron nuevas formulaciones como los triazoles (fluconazol e itraconazol) con lo que se aceleró el

desarrollo de nuevas drogas. Años más tarde se introdujeron otros triazoles y equinocandinas, los cuales contribuyeron con nuevas opciones de tratamiento (25).

Sin embargo en los últimos años se han visto cambios muy marcados frente al tratamiento de las micosis, donde han cobrado gran importancia las micosis invasivas, constituyendo así una problemática en el uso de antimicóticos por el aumento de infecciones sistémicas, caracterizadas por una alta morbilidad y mortalidad, aumento en la falla terapéutica asociada a resistencia sobre todo en candidiasis y aspergilosis invasivas; y un aumento de infecciones causadas por hongos emergentes (6,9,12,13,21,27).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar metabolitos de *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a hongos de importancia clínica *Aspergillus* spp. y dermatofitos.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos etanólicos y fracciones de *Ganoderma lucidum* frente a aislamientos de los hongos patógenos miceliales oportunistas.
- Comparar y evidenciar cual de los hongos de importancia clínica presenta mayor inhibición frente a los metabolitos de *Ganoderma lucidum*.

6. METODOLOGÍA

6.1 *Ganoderma lucidum*.

6.1.1 Obtención cuerpo fructífero

Los cuerpos fructíferos se obtuvieron de un cultivo localizado en Cumaral, Meta, tanto los inmaduros no esporulados (Muestra 1 - **M1**) como los maduros esporulados (Muestra 2 - **M2**). Ambas muestras se liofilizaron para reducir la mayor cantidad de agua, seguido a esto, se trituraron en un molino, para facilitar la extracción por maceración en frío.

6.1.2 Obtención de micelio secundario y medio líquido.

A partir de los basidiocarpos obtenidos del cultivo, se aisló el micelio de *G. lucidum* en agar YGC con lo que se procedió a realizar siembras sucesivas en este mismo medio hasta la obtención de un banco de conservación realizado con agua destilada estéril y los discos de agar del hongo. Partiendo del banco de conservación, se sembró el hongo en medio YGC para poder usar discos de agar crecidos en la obtención de la biomasa. El micelio secundario (Muestra 3 - **M3**) fue producido en medio de cultivo líquido, bajo las condiciones establecidas y optimizadas por Romero & Zárate en 2009 (ANEXO 4), en erlenmeyer de 250 mL, al cual se le agregaron 7 discos de agar crecido con *Ganoderma lucidum*. La biomasa producida fue filtrada por vacío y liofilizada para eliminar así la mayor cantidad de agua, la cual habría podido obstaculizar una buena extracción de los metabolitos presentes en la muestra. El medio líquido o caldo (Muestra 4 - **M4**) separado tras la filtración se usó, para posterior extracción.

6.2 Preparación de extractos y fracciones

6.2.1 Obtención de extractos a partir de biomasa por fraccionamiento sólido-líquido

Una parte de la biomasa de los cuerpos fructíferos inmaduros- M1, maduros- M2 y el micelio secundario- M3, se llevó a extracción por separado en éter de petróleo y bajo agitación constante durante 48 horas para arrastrar los compuestos de polaridad más baja, posteriormente, se filtraron. Las tres muestras (biomasa filtrada) se llevaron de nuevo a extracción con el mismo solvente por otras 48 horas y posteriormente se filtraron. Los extractos obtenidos de las 48 y 96 horas se unificaron y se llevaron a refrigeración a 4°C.

Luego cada una de las muestras fueron llevadas a extracción por fraccionamiento sólido-líquido con Diclorometano (CH_2Cl_2) para arrastrar los compuestos de polaridad media, por 48 horas en agitación constante, estos fueron filtrados, y las muestras llevadas de nuevo

a extracción con el mismo solvente por 48 horas más. Los extractos obtenidos de CH_2Cl_2 en las 48 y 96 horas se unificaron y llevaron a refrigeración a 4°C.

Este mismo procedimiento se realizó de igual manera con los solventes, acetato de etilo (AcOEt) y etanol (EtOH). Todos los extractos fueron llevados a refrigeración a 4°C.

Los extractos se concentraron por rotaevaporación hasta el mínimo volumen o sequedad a presión reducida, listos para ser usados en los ensayos de actividad antifúngica.

6.2.2 Obtención de extractos etanólicos o crudos de los cuerpos fructíferos y biomasa producida en medio líquido de *G. lucidum*.

Otra porción de la biomasa de los cuerpos fructíferos M1, M2 y del micelio secundario M3, se trituraron por separado en una licuadora con etanol al 96 % v/v, y se procedió a realizar extracción con el mismo solvente durante 48 horas por el método de maceración, el cual se realizó en frío y bajo agitación. En seguida los extractos se filtraron y concentraron por rotaevaporación hasta el mínimo volumen o sequedad a presión reducida, logrando de esta forma obtener unos extractos etanólicos totales, también llamados extractos crudos. Este proceso se realizó por duplicado, obteniendo así dos extractos A y B de cada una de las muestras; los extractos A se concentraron hasta un volumen de 1 mL y los extractos B a volumen de 2.5 mL.

6.2.3 Obtención de fracciones por separación líquido-líquido.

Se tomó el extracto crudo B de cada una de las tres muestras (M1, M2 y M3) por separado, y se les adicionó 2.5 mL de agua destilada (porción hidroalcohólica) y se sometieron a separación discontinua líquido-líquido con bencina de petróleo (5 mL) por 3 repeticiones, así se obtuvieron las fracciones de compuestos apolares, grasas y aceites que se denominó fracción petrol y se llevó a sequedad en el rotaevaporador a presión reducida. Luego se sometieron las porciones hidroalcohólicas a fraccionamiento con diclorometano (CH_2Cl_2), solvente de polaridad media, igualmente con 3 repeticiones de 5 mL cada una obteniendo las fracciones diclorometano, que también se concentraron en el rotaevaporador a presión reducida. Por último, las fases hidroalcohólicas se sometieron a fraccionamiento con acetato de etilo (AcOEt), solvente de mayor polaridad, con 3 repeticiones de 5 mL cada una obteniendo las fracciones AcOEt, que se llevaron a sequedad en el rotaevaporador a presión reducida. Igualmente se obtuvieron los tres residuos etanólicos (fracciones hidroalcohólicas) que se secaron en el rotaevaporador a presión reducida hasta el mínimo volumen.

6.2.4 Obtención de extractos a partir de caldo por fraccionamiento líquido-líquido

En un embudo de separación se tomaron 500 mL de caldo (Muestra 4 M4), al cual se le adicionaron 50 mL de Bencina de petróleo, agitándose por 30 segundos y posteriormente tomándose la porción de bencina. Este procedimiento se realizó cinco veces (utilizando el

mismo volumen de solvente) hasta obtener una fracción de extracto de bencina del caldo de 250 mL aproximadamente, el cual se almacenó en frascos Schott hasta su posterior concentración. De igual manera se realizó lo anterior de manera seriada y de la misma forma con los solventes CH₂Cl₂ y AcOEt. Finalmente se tomó el líquido restante que se denominó extracto *caldo*, teniendo en cuenta que cada procedimiento se llevo a cabo durante un día. Los cuatro extractos se llevaron a sequedad en rotaevaporador a presión reducida hasta un volumen final de 1 mL.

6.3 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos crudos, fracciones y caldo.

6.3.1 Hongos miceliales patógenos oportunistas

Las cepas de *Aspergillus* spp, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum* se recuperaron de un trabajo de grado del mismo proyecto global, con los cuales se realizó un banco de trabajo mediante el método de conservación de discos de agar mantenidos en agua destilada estéril. Para los posteriores ensayos con los extractos y fracciones, todos los hongos patógenos miceliales se sembraron en agar avena (ANEXO 7) para estimular la producción de conidios, demostrado en otros estudios (26), a 28 °C, por 7 días máximo para las cepas de *Aspergillus* spp, y 14 días máximo para las cepas de los dermatofitos (ANEXO 7). La información y características esenciales de cada uno de los hongos patógenos se describen en las hojas de vida dentro del ANEXO 6.

6.3.2 Extractos y Fracciones

Todos los extractos se llevaron a una concentración stock de 10 mg/mL, a partir de la concentración inicial de cada uno (ANEXO 5), usando como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO). Luego se impregnaron discos de papel Whatman No. 1 de 6 mm de diámetro, con 10 uL del stock de cada uno de los extractos, quedando así una cantidad de 100 ug de extracto por cada disco.

6.3.3 Difusión en placa de agar

Se evaluó la actividad antifúngica de los extractos y fracciones, utilizando agar Mueller Hinton modificado por componentes, suplementado con 2% de glucosa y azul de metileno (ANEXO 2), en vez de agar Mueller Hinton comercial.

Se realizaron suspensiones conidiales a una concentración de 5×10^4 UFC/mL, de todos los hongos patógenos por desprendimiento con perlas y solución salina al 0.85% p/v, y solución salina más tween 80 al 0.1% v/v, para las cepas de *Aspergillus* spp. y para las cepas de los dermatofitos, respectivamente. Se tomaron 100 uL de las suspensiones y se sembraron masivamente sobre el agar, cuatro cajas por cada extracto, colocándose posteriormente los discos impregnados con cada uno de ellos. Finalmente las placas se

incubaron a 28°C y se realizaron lecturas a las 48 y 72 horas para *Aspergillus*, y para los dermatofitos a las 72 y 96 horas, en las cuales se midieron los halos de inhibición de crecimiento miceliar en mm, además de hallar los porcentajes de inhibición para el análisis descriptivo. El cual se halló tomando el diámetro completo de la placa como un 100% de inhibición, y de esta manera, de acuerdo con la medición de diámetro de halo en cada placa, se obtuvo el porcentaje respectivo de inhibición.

Como controles se usaron los solventes con los que se realizaron las extracciones (Acetato de Etilo, Diclorometano, Etanol y Éter de petróleo), así como un control con DMSO. Además se realizó un control de crecimiento para cada hongo, y finalmente, se realizó un control positivo con terbinafina tabletas de casa comercial MK, utilizado para el tratamiento de micosis, que en estudios anteriores ha mostrado inhibición sobre aislamientos de los patógenos evaluados. Se utilizó un stock de terbinafina a una concentración de 2.5 mg/mL, teniendo una cantidad final de terbinafina en el disco de 25 ug.

6.4 Análisis estadístico

Se analizaron las mediciones de inhibición de crecimiento frente a los extractos de *Ganoderma lucidum* por análisis de varianza ANOVA.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum*

Tanto del cuerpo fructífero inmaduro no esporulado M1 como del maduro esporulado M2, se obtuvo una cantidad de 30 g para cada uno, suficiente para la realización de los fraccionamientos y obtención de los extractos. Se liofilizaron cada una de las muestras con el fin de evitar que el agua contenida en los cuerpos fructíferos pudiera interferir negativamente, ya que el agua podía convertirse en un interferente para obtener una buena extracción de todos los metabolitos presentes en la muestra, y poder evaluar de esta manera y sin descartar ninguno, aquellos que presentaran actividad antifúngica frente a los patógenos evaluados.

7.2 Obtención de micelio y medio líquido

A partir de la preparación de tres litros de medio líquido optimizado por Romero y Zárate en 2009 (ANEXO 4), se obtuvo una cantidad aproximada de biomasa de 30 g, a los cuales se les realizaron las extracciones y fraccionamientos. Con esto se puede decir que por cada litro de medio estandarizado se obtienen aproximadamente 10 gramos de biomasa, bajo temperatura controlada a 28°C, en agitación constante por 10 días. Para procurar estimular la mayor producción de metabolitos se usó un medio líquido con un componente (aceite de oliva), que según algunos reportes (7), fomentan que *Ganoderma lucidum* produzca compuestos como los terpenoides, premisa que fue corroborada por el trabajo de grado “Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa y compuestos fenólicos a partir de una cepa de *Ganoderma lucidum* a escala de laboratorio” enmarcado dentro del mismo proyecto global.

7.3 Obtención de extractos y fracciones de *Ganoderma lucidum*

En las concentraciones obtenidas de todos los extractos y fracciones (ANEXO 5), se observa en cada una de las muestras la diferencia significativa en cuanto a concentración, entre las fracciones seriadas a partir de biomasa y las fracciones seriadas líquido-líquido. Las mayores concentraciones de los extractos se encuentran a partir de los fraccionamientos seriados de biomasa, y entre estos, las mayores concentraciones son de los extractos en los que se usó el éter de petróleo como solvente. Este solvente es uno de los más apolares, con lo que se puede decir que la mayoría de compuestos extraídos en las muestras de cuerpo fructífero inmaduro no esporulado, maduro esporulado y micelio, tienden a ser apolares, por lo tanto se reduce la presencia de metabolitos para las subsecuentes extracciones y fraccionamientos.

7.4 Evaluación actividad antifúngica de los extractos crudos, fracciones y caldo

Las cepas de *Aspergillus* spp presentaron buen crecimiento durante el desarrollo del proyecto, mostrando un rápido crecimiento cuando se realizaban siembras a partir del banco establecido. Se observó un crecimiento rápido (4 días aproximadamente), y características macroscópicas típicas, como colonias pulverulentas de color verde, exceptuando a la cepa de *Aspergillus* No. 10 de origen animal, que presentaban colonias de color negro y micelio de color blanco. Las cepas de los dermatofitos presentaron un crecimiento moderado (10 días aproximadamente), observándose una colonia algodonosa blanca con pigmento difusible al medio de amarillo a naranja, para *M. canis* No. 5, y una colonia de aspecto pulverulento de color crema a blanco para *M. gypseum*. Las demás características de los hongos patógenos trabajados se pueden observar en el ANEXO 6.

Se observó claramente (ANEXO 1), que la mayoría de los extractos de los tres estadios de *G. lucidum* y del medio líquido, presentaron inhibición sobre el crecimiento de la cepa de *Aspergillus* No. 10, la cual se vió afectada notablemente por los metabolitos que allí pudiesen encontrarse; a diferencia de las dos cepas restantes de *Aspergillus* de origen humano, que no presentaron inhibición alguna con los extractos de ambas muestras de cuerpo fructífero inmaduro no esporulado y de cuerpo fructífero maduro esporulado, contrariando lo observado en cuanto a los extractos provenientes de micelio y medio líquido o caldo, donde se encontró afectada la cepa No. 1 de *Aspergillus*, aunque no en gran medida con porcentajes de inhibición no superiores al 10%.

En cuanto a los dermatofitos, la cepa de *M. canis* No.5 no presentó sensibilidad alguna frente a ninguno de los 30 extractos de *G. lucidum*, demostrándose así que este hongo patógeno presenta muchos mecanismos de resistencia frente a los tipos de compuestos hallados en los extractos y fracciones. En contraste con lo que se observó con la terbinafina (usada como control positivo de los ensayos de actividad antifúngica), ninguno de los extractos actuaron para esta cepa de dermatofito, ni para la cepa No.2 de *Aspergillus*, con propiedades fungicidas ni fungistáticas, así como lo hace este antimicótico frente a todos los hongos patógenos miceliales evaluados. La terbinafina actúa ocasionando la muerte celular, al inhibir la síntesis del ergosterol (componente que hace parte fundamental de la membrana del hongo) y de su precursor el escualeno, el cual es esencial para la membrana celular fúngica, ya que bloquea la síntesis de la enzima escualeno epoxidasa (42). En contraste, las cinco cepas de hongos patógenos evaluados, no presentaron inhibición alguna frente a los solventes usados como control.

Por otro lado, *M. gypseum* tuvo los mayores porcentajes de inhibición determinados entre el 20% y el 35%, frente a dos extractos del cuerpo fructífero inmaduro no esporulado y un extracto del medio líquido. Para el extracto de CH₂Cl₂ seriado de biomasa de la muestra de cuerpo fructífero inmaduro no esporulado, se observó un porcentaje de inhibición del 21,91%, para el extracto de CH₂Cl₂ seriado Líquido-Líquido de la muestra M1 se observó un 32,8% de inhibición, y para el extracto del medio líquido con acetato se observó el

mayor porcentaje de inhibición de todos los patógenos frente a todos los extractos, con un 35% de inhibición, lo que demuestra que los metabolitos con actividad antifúngica de *G. lucidum* no sólo se producen intracelularmente sino que algunos de ellos son excretados por el hongo, al medio donde se encuentren creciendo. El único grupo funcional encontrado en este extracto, en el trabajo sobre la caracterización química de los compuestos perteneciente al mismo proyecto global; donde usaron como sustancia reveladora el anisaldehído, fueron los glucósidos, lo que permite que se le adjudique anticipadamente propiedades antimicóticas frente a las 3 cepas que coincidieron en presentar inhibición en el crecimiento frente a este extracto en particular.

Por otra parte, en los extractos crudos de cada una de las muestras de *G. lucidum*, no se observó inhibición alguna sobre las cepas de los hongos patógenos miceliales evaluados, debido posiblemente a que el etanol arrastró la mayoría de metabolitos y compuestos, lo que pudo producir un solapamiento de los efectos biológicos de la mezcla de compuestos, ocasionando que la presencia de algunos inhibieran la acción de los otros, ya que el efecto biológico de las sustancias, de manera individual puede ser opacada como resultado de la combinación de todos los compuestos presentes en la muestra, como ha sido descrito en otros reportes (32). A excepción del extracto M1-9 para *Aspergillus* No. 10 y el extracto M3-9 para *Aspergillus* No. 1, los cuales presentaron actividad antifúngica frente a las respectivas cepas.

Durante el desarrollo de los ensayos de los extractos frente a los patógenos miceliales, se estableció que el tiempo de lectura en el que se iba a basar el análisis estadístico de los datos, era el de 48 horas para las cepas de *Aspergillus*, y 72 horas para las cepas de los dermatofitos, ya que en estos tiempos específicos, se observaron los mayores halos de inhibición de crecimiento en mm de las cepas para cada uno de los extractos.

Para mostrar las diferencias encontradas con los 15 extractos y fracciones que presentaron actividad antifúngica, frente a la inhibición que se observó con las tres cepas de patógenos susceptibles, se realizó un análisis de varianza ANOVA y una prueba de Duncan (Tabla 1), arrojando como resultado que si existen diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición, donde *M. gypseum* se encuentra como la cepa menos susceptible en cuanto al número de extractos a los cuales mostró sensibilidad, y a su vez como la más sensible, ya que mostró los mayores halos de inhibición, referidos a los tres extractos en los cuales se observó actividad; *Aspergillus* No. 10 fue la cepa que menor halo de inhibición evidenció en uno de los extractos en los cuales mostró sensibilidad, sin embargo fue la cepa en la que se vio más heterogeneidad en las mediciones de los halos de inhibición frente a los 15 extractos a los cuales mostró susceptibilidad, lo cual demuestra que es la más sensible frente a los metabolitos de *Ganoderma lucidum*; por otro lado, *Aspergillus* No. 1 fue una de las cepas que mostró menor sensibilidad a los extractos de *G. lucidum*, además de ser la cepa en donde se observaron los menores halos de inhibición en general.

TABLA 1. Comparación de las mediciones de inhibición de crecimiento obtenidas en los ensayos de actividad antifúngica donde los hongos patógenos fueron evaluados frente a los extractos de las muestras de *G. lucidum*. En la tabla se muestra el valor p resultante del análisis de varianza y la prueba de Duncan.

Hongo	Extracto	Halo inhibición	Agrupaciones análisis de Duncan											
<i>Aspergillus 10</i>	M1-9	,681	a											
<i>Aspergillus 1</i>	M3-5	,750	a	b										
<i>Aspergillus 10</i>	M1-6	,800	a	b	c									
<i>Aspergillus 1</i>	M4-2	,806	a	b	c									
<i>Aspergillus 1</i>	M3-9	,813	a	b	c									
<i>Aspergillus 1</i>	M3-2	,850	a	b	c									
<i>Aspergillus 1</i>	M4-3	,975	a	b	c	d								
<i>Aspergillus 10</i>	M2-8	1,100		b	c	d	e							
<i>Aspergillus 10</i>	M3-2	1,119			c	d	e							
<i>Aspergillus 10</i>	M1-4	1,131			c	d	e							
<i>Aspergillus 10</i>	M1-3	1,156			c	d	e							
<i>Aspergillus 10</i>	M3-7	1,206				d	e							
<i>Aspergillus 10</i>	M3-5	1,219				d	e							
<i>Aspergillus 10</i>	M4-2	1,363					e	f						
<i>Aspergillus 10</i>	M2-3	1,450					e	f	g					
<i>Aspergillus 10</i>	M2-4	1,575						f	g	h				
<i>Aspergillus 10</i>	M1-7	1,606						f	g	h				
<i>Aspergillus 10</i>	M2-2	1,744							g	h	i			
<i>Aspergillus 10</i>	M3-3	1,744							g	h	i			
<i>Aspergillus 10</i>	M2-7	1,794							g	h	i			
<i>Aspergillus 10</i>	M4-3	1,863								h	i	J		
<i>M. gypseum</i>	M1-2	2,000									i	J		
<i>Aspergillus 10</i>	M2-6	2,138										J		
<i>Aspergillus 10</i>	M3-9	2,506											k	
<i>M. gypseum</i>	M1-6	3,000												l
<i>M. gypseum</i>	M4-3	3,188												l

Valor de significancia para ANOVA: 0,000

Mediante un análisis de varianza ANOVA y la prueba de Duncan, se muestran las diferencias que existen en los halos de inhibición que se observaron en la cepa de *Aspergillus* No. 10, frente a los 15 extractos donde presentó actividad (Tabla 2). Se encontró que si existen diferencias estadísticamente significativas entre los extractos y los halos de inhibición, donde el extracto crudo de micelio fue el más representativo, ya que fue donde la cepa mostró mayor sensibilidad, demostrando así que en este extracto no hubo sobrelapamiento de los metabolitos, sino que estos en conjunto potencializaron su acción fungicida o fungistática frente a esta cepa específicamente. De igual manera se

puede deducir que aparte de no existir un solapamiento entre los metabolitos encontrados en el extracto crudo de micelio, los metabolitos arrastrados por el éter de petróleo y el acetato de etilo en el fraccionamiento líquido-líquido de micelio (a partir del extracto crudo de micelio), reflejan su actividad antifúngica de forma individualizada, pero que al unirse con los demás metabolitos del extracto crudo, se observa una respuesta más eficaz, con respecto a la actividad antifúngica. La cepa de *Aspergillus* No. 10 es la más sensible, frente a los diferentes tipos de tejido o estadio de *Ganoderma lucidum*, ya que se puede observar que hubo extractos con actividad antifúngica, obtenidos tanto de micelio secundario, cuerpo fructífero maduro, cuerpo fructífero inmaduro y del medio líquido.

Tabla 2. Comparación de las mediciones de inhibición de crecimiento obtenidas en los ensayos de actividad antifúngica donde *Aspergillus* No. 10 fue evaluado frente a los extractos donde se observó actividad. En la tabla se muestra el valor p resultante del análisis de varianza y la prueba de Duncan.

Extracto	Halo de inhibición	Agrupaciones análisis de Duncan								
M1-9	,68125	a								
M1-6	,80000	a	b							
M2-8	1,10000		b	c						
M3-2	1,11875		b	c						
M1-4	1,13125		b	c						
M1-3	1,15625		b	c						
M3-7	1,20625			c	d					
M3-5	1,21875			c	d					
M4-2	1,36250			c	d	e				
M2-3	1,45000			c	d	e	f			
M2-4	1,57500				d	e	f	g		
M1-7	1,60625					e	f	g		
M2-2	1,74375					e	f	g		
M3-3	1,74375					e	f	g		
M2-7	1,79375						f	g	h	
M4-3	1,86250							g	h	
M2-6	2,13750								h	
M3-9	2,50625									i

Valor significancia para ANOVA: 0,000

En cuanto a la cepa de *Aspergillus* No. 1, frente a los extractos de *G. lucidum*, se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas luego de haber realizado un análisis de varianza ANOVA y una prueba de Duncan (Tabla 3). Los extractos se encuentran agrupados en dos zonas únicamente, lo que significa que aparte de no existir diferencias significativas entre todos los extractos con actividad para esta cepa, tampoco hay

diferencia entre las dos agrupaciones, ya que los halos de inhibición en estos no oscilan de manera significativa. En esta cepa también se ve la actividad antifúngica del extracto crudo del micelio. Esta premisa se puede analizar desde el punto de vista, donde los metabolitos que produce *G. lucidum* (como micelio secundario) no presentan una relación competitiva entre ellos, sino por el contrario presentan una relación de sinergismo, donde tal vez la acción de un compuesto potencialice la acción de otro o de todos los presentes en ese extracto. En cuanto a los metabolitos de los diferentes estadios de *G. lucidum*, sólo se observó que los asociados al micelio secundario, presentan actividad antifúngica frente a esta cepa de origen humano.

Tabla 3. Comparación de las mediciones de inhibición de crecimiento obtenidas en los ensayos de actividad antifúngica donde *Aspergillus* No. 1 fue evaluado frente a los extractos donde se observó actividad. En la tabla se muestra el valor p resultante del análisis de varianza y la prueba de Duncan.

Extracto	Halo de inhibición	Agrupaciones análisis de Duncan	
M3-5	,75000	a	B
M4-2	,80625	a	
M3-9	,81250	a	
M3-2	,85000	a	
M4-3	,97500	a	

Valor significancia para ANOVA: 0,114

Por otro lado, las diferencias significativas encontradas tras el análisis estadístico realizado (ANOVA y prueba de Duncan) para los extractos frente a la única cepa de dermatofitos que presentó inhibición, se encuentra en la tabla 4. En este análisis se evidenció, que si existen diferencias estadísticamente significativas, respecto a la comparación de los tres extractos que mostraron actividad frente a *M. gypseum*, donde se puede observar que los dos mayores halos de inhibición se agruparon (Análisis Duncan), y el otro extracto con un halo de inhibición mucho menor se localizó en otro grupo diferente. Los halos de inhibición presentados por *M. gypseum* comparados con los halos presentados por los aislamientos de *Aspergillus*, mostraron tener mayor diámetro frente a extractos que presentaron inhibición también en *Aspergillus*, demostrando que *M. gypseum* presenta un mayor grado de sensibilidad.

M. gypseum sólo presentó inhibición frente a extractos provenientes del micelio secundario de *Ganoderma lucidum*, y frente al caldo o medio líquido donde se produjo esa biomasa. Los metabolitos producidos por *Ganoderma lucidum*, como cuerpo fructífero (ya sea maduro esporulado o inmaduro no esporulado), no presentaron actividad antifúngica

frente a esta cepa, demostrándose que en ese estadío *Ganoderma lucidum* no podría ser de interés industrial.

Tabla 4. Comparación de las mediciones de inhibición de crecimiento obtenidas en los ensayos de actividad antifúngica donde *Microsporum gypseum* fue evaluado frente a los extractos donde se observó actividad. En la tabla se muestra el valor p resultante del análisis de varianza y la prueba de Duncan.

Extracto	Halo de inhibición	Agrupaciones análisis Duncan	
M1-2	2,00	a	
M1-6	3,00		b
M4-3	3,19		b

Valor significancia para ANOVA: 0,000

El extracto M4-3 presentó inhibición en las tres cepas mencionada anteriormente, por lo que se realizó un análisis de varianza y una prueba de Duncan, mostrando que si existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres cepas, frente a este extracto (Tabla 5), ya que cada cepa con su respectivo dato de halo de inhibición, se conformo un agrupamiento de Duncan. Aquí se confirma que la cepa de *Microsporum gypseum* es la más sensible entre las cinco cepas de hongos patógenos evaluados, y las cepas No. 10 y No. 1 de *Aspergillus*, presentan menor sensibilidad frente a este extracto. Además de lo mencionado anteriormente, en función de la producción biotecnológica de estos metabolitos producidos por *G. lucidum* de mayor interés en cuanto a actividad antifúngica, frente al tipo de patógenos evaluados en este trabajo, son los que este hongo excreta al medio, pudiendo ser de gran importancia a nivel industrial, ya que en la producción de este tipo de metabolitos a mediana o gran escala, no habría necesidad de separar y lisar las células por medio de costosos y complicados métodos, que se traducen en ahorro dinero y costos industriales.

Tabla 5. Comparación de las mediciones de inhibición de crecimiento obtenidas en los ensayos de actividad antifúngica donde las tres cepas con inhibición fueron evaluadas frente al extracto M4-3 donde se observó la mayor actividad. En la tabla se muestra el valor p resultante del análisis de varianza y la prueba de Duncan.

Hongo	Extracto	Halo Inhibición	Agrupaciones análisis Duncan
<i>Aspergillus 1</i>	M4-3	,98	a b c
<i>Aspergillus 10</i>	M4-3	1,86	
<i>M. gypseum</i>	M4-3	3,19	

Valor significancia para ANOVA: 0,000

En general para todas las cepas, el tejido o estadio que presentó mayor número de extractos con actividad antifúngica, fue el cuerpo fructífero inmaduro no esporulado y el cuerpo fructífero maduro esporulado, con seis extractos con actividad, seguido por el micelio secundario, con cinco extractos con actividad, y finalmente el caldo o medio líquido con dos extractos con actividad. En contraste, el estadio o tejido que mostró mayor actividad antifúngica, relacionado con mayores halos de inhibición por parte de los hongos patógenos, fue en primer lugar el caldo o medio líquido, posteriormente el micelio secundario, seguido por el cuerpo fructífero inmaduro no esporulado, y finalmente el cuerpo fructífero maduro esporulado. Lo anterior se puede ver relacionado en la tabla 1. Como se mencionó anteriormente, los extractos provenientes del caldo al ser los que mostraron mayor actividad, presentan gran relevancia a nivel industrial ya que la obtención de estos metabolitos sería mucho más fácil que la obtención de estos a partir de cuerpo fructífero, puesto que el cultivo de estos macromicetos tiene un costo más elevado.

Según el análisis descriptivo realizado, entre los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Aspergillus* No. 10 frente a los 15 extractos que presentaron actividad, se puede decir que no hay diferencias significativas entre estos, lo que se puede observar en el ANEXO 1, ya que los porcentajes no oscilaron más allá de un rango de más de 10 puntos de diferencia; siendo el extracto M2-2 (CH_2Cl_2 seriado biomasa del cuerpo fructífero maduro esporulado) con un porcentaje de inhibición del 19.06%, el extracto M3-3 (AcOEt seriado biomasa del micelio) con un porcentaje de inhibición del 18.16%, y el extracto M3-9 (extracto crudo del micelio) con un porcentaje de inhibición de 22.92%; los más representativos en cuanto a actividad antifúngica para esta cepa.

En el extracto M3-3, los grupos funcionales a los cuales se les puede adjudicar la actividad biológica son el grupo de las cetonas y aldehídos libres, los glucósidos, alcoholes, esteroides y fenoles. Para el extracto M2-2 se le adjudica la actividad antifúngica a los grupos funcionales como, los terpenoides, alcoholes, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, lactonas, cetonas, aldehídos libres y glucósidos; lo que evidencia que este extracto tiene gran parte de los grupos funcionales, pero que tal vez lo diferencia de los extractos crudos es que posiblemente en este extracto, esos compuestos se presentan en una concentración en la cual no existe un solapamiento entre estos.

Para la cepa de *Aspergillus* No. 1 frente a los cuatro extractos que presentaron actividad, se evidencia que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición, ya que ninguno de ellos supera el 10%, y entre ellos no hay una diferencia mayor a dos

puntos, ni tampoco son realmente significativos frente a los demás extractos en función de las cepas de los patógenos, ya que la mayoría de ellos superan el 10% de inhibición.

Finalmente la última cepa sobre la que se presentó actividad, fue el hongo *M. gypseum* frente a tres extractos, los cuales en cuanto a sus porcentajes de inhibición tuvieron diferencias significativas sobre los demás extractos con actividad, superando dos de ellos el 30% de inhibición de crecimiento sobre esta cepa. Entre estos dos extractos no se observó una diferencia significativa ya que ambos no se superan por más de tres puntos, el extracto M1-6 con un 32.81% y el extracto M4-3 con un 35%.

Según reportes como el de Mesa y colaboradores en 2004, el reino de los hongos dispone de una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad biológica, reportándose también la efectividad de estos como antimicóticos, para su uso en tratamientos de micosis como las producidas por *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp y el grupo de los dermatofitos.

Dentro de los grupos funcionales hallados en el trabajo de caracterización química de los extractos de *G. lucidum*, se encontró que hay presencia de varios grupos funcionales en cada uno de los extractos evaluados como se muestra en la Tabla 6 (22).

TABLA 6. Grupos funcionales en cada uno de los extractos

GRUPOS FUNCIONALES	EXTRACTOS
Alcoholes, esteroides, Fenoles y aceites esenciales	M1-1, M1-2, M1-3, M1-5, M1-7, M1-8, M2-1, M2-2, M2-3, M2-5, M2-6, M2-7, M2-8, M3-1, M3-2, M3-3, M3-5, M3-6, M3-8, M4-2, M4-4
Terpenoides	M1-1, M1-2, M1-3, M1-4, M1-5, M1-7, M2-1, M2-2, M2-3, M2-4, M2-5, M2-6, M2-7, M3-1, M3-2, M3-4, M3-5, M3-6, M3-7
Flavonoides y cumarinas	M1-1, M1-2, M1-3, M1-4, M1-5, M2-1, M2-2, M2-3, M2-4, M2-5, M2-6, M3-1, M3-2, M3-4, M3-5
Lactonas	M1-2, M1-3, M1-4, M1-5, M2-2, M2-3, M2-4, M2-5, M2-6, M2-7, M3-2, M3-4, M3-6
Cetonas y aldehídos libres	M1-1, M1-2, M1-3, M1-4, M1-5, M1-7, M2-1, M2-2, M2-3, M2-4, M2-5, M2-6, M2-7, M3-1, M3-2, M3-3, M3-4, M3-5, M3-6, M3-7
Glucósidos	M1-1, M1-2, M1-3, M1-5, M1-6, M1-7, M2-1, M2-2, M2-3, M2-5, M2-6, M2-7, M3-1, M3-3, M3-5, M3-7, M4-2, M4-3, M4-4

M1, M2 y M3; M-1: Éter de petróleo seriado biomasa; M-2: CH₂Cl₂ seriado biomasa; M-3: AcOEt seriado biomasa; M-4: Etanol seriado biomasa; M-5: Éter de petróleo seriado Líquido-Líquido; M-6: CH₂Cl₂ seriado

Líquido-Líquido; M-7: AcOEt seriado Líquido-Líquido; M-8: Hidroalcohólica; M-9: extracto crudo.

M4-2: fase CH₂Cl₂; M4-3: fase AcOEt; M4-4: fase *caldo*.

Basados en los resultados obtenidos por Niño en 2010, sobre la caracterización química de los compuestos encontrados en los mismos extractos evaluados en este trabajo de grado, se puede decir que hay compuestos activos con capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos miceliales, compuestos que presentan gran parte de los grupos funcionales, en todos los estadíos con los que se trabajó *G. lucidum*.

En los extractos M4-3 y M1-6, se encuentra solo un grupo funcional al cual se le puede adjudicar la actividad antifúngica de más prevalencia, aunque sólo para la cepa de *M. gypseum*, comparado con los otros 16 extractos con actividad, siendo el grupo de los glucósidos el único presente en estos extractos. De esta manera se puede decir que en los extractos evaluados, el grupo funcional de los glucósidos es el único que presenta actividad antifúngica apreciable para la cepa de *M. gypseum*.

Los grupos funcionales encontrados en los extractos con actividad biológica contra los hongos patógenos evaluados, según otros estudios, presentan actividad antimicrobiana frente a patógenos de interés clínico, agropecuario y ambiental. Así el grupo de los flavonoides y ácidos fenólicos, aparte de presentar actividad antimicrobiana contra algunas especies de bacterias (14), también presenta actividad antifúngica, atribuyéndose a la capacidad de reducir el crecimiento de hongos patógenos de importancia como *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, como se ha establecido en otros reportes (3,36).

En cuanto a las cumarinas, que son compuestos derivados de la lactona y del ácido o-hidroxinámico, especialmente aquellas que presentan cadenas de isopreno, presentan tanto actividad citotóxica como antimicrobiana (11), demostrando en este trabajo la actividad antifúngica frente a las cepas patógenas trabajadas. De igual manera se presenta la misma situación con grupos funcionales como los glucósidos, esteroides, alcoholes y lactonas.

Lo anterior coincide con los metabolitos producidos por *G. lucidum*, siendo los más reportados y estudiados los polisacáridos, triterpenos, ácidos grasos, nucleósidos y compuestos fenólicos, como los flavonoides, que son usados como mecanismo de defensa contra patógenos (5,22,37,29).

Las dos cepas que no tuvieron inhibición alguna frente a los extractos de *G. lucidum*, pudieron evidenciar este tipo de resultado, debido posiblemente a sus mecanismos de

resistencia frente a los compuestos evaluados, como la capacidad de disminuir la presencia de ergosterol en sus membranas impidiendo la acción de los metabolitos del basidiomiceto.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los ensayos de actividad antifúngica mostraron que tres de las cinco cepas presentaron inhibición en su crecimiento, frente a 15 extractos de los 30 evaluados. La cepa que presentó mayor porcentaje de inhibición fue *M. gypseum* de origen humano, y la cepa que presentó inhibición en su crecimiento en la mayoría de los extractos evaluados fue *Aspergillus* No. 10 de origen animal. Se encontraron compuestos o metabolitos tanto polares como apolares con actividad antifúngica frente a las cinco cepas evaluadas. La mayor actividad antifúngica la presentaron los extractos M4-3 y M1-6; el extracto M4-3 (fase AcOEt) presentó el mayor porcentaje de actividad frente a *M. gypseum* con un 35%, frente a *Aspergillus* No. 10 con un 19.82%, y frente a *Aspergillus* No. 1 con un 8.82%.

Se encontró actividad antifúngica de los extractos de *Ganoderma lucidum* en dos cepas de origen humano, *Aspergillus* No. 1 y *Microsporum gypseum*, y en una cepa de origen animal, *Aspergillus* No. 10.

Se estableció y se sugiere el agar Mueller Hinton modificado por componentes, como el medio más apropiado para la realización de ensayos de actividad antifúngica por medición de la inhibición de crecimiento, ya que además de su adición de azul de metileno, el medio preparado de esta manera permite que se observe con mayor claridad la zona de inhibición, ya que aumenta el contraste de visualización, permitiendo una mejor lectura de resultados.

En cuanto a las condiciones con las que se trabaja con los dermatofitos, es necesario mantener el ambiente y demás variables lo más asépticamente posibles, ya que se presentaron muchas contaminaciones con microorganismos del ambiente, que pueden representar una interferencia en la correcta interpretación de los resultados, así como de perjudicar los cultivos y bancos de conservación establecidos con las cepas de los dermatofitos.

Los extractos de *Ganoderma lucidum* que presentan actividad antifúngica pueden ser estudiados más a fondo en estudios con otros tipos de patógenos, preferiblemente de origen fúngico, para que posiblemente se le dé aplicabilidad y un futuro interés industrial y farmacéutico.

Para complementar este estudio se recomienda correr una bioautografía para asociar con mayor precisión la naturaleza química de los compuestos que presentaron actividad antifúngica.

9. BIBLIOGRAFIA

1. **Arenas R. 2008.** Micología médica ilustrada. Editorial McGraw Hill.
2. **Bach G., Breiding-Mack S., Grabley S., Hammann P., Huter K., Thiericke R., Uhr H., Wink J., Zeeck A. 1993.** Secondary metabolites by chemical screening, Gabisines, new carba-sugars from *Streptomyces*. *Liebigs Annals of Chemistry*, 241-350.
3. **Barberan T. 1998.** Nuevas Tendencias en el Análisis de Multirresiduos de Plaguicidas en Vegetales Mediante Gc/Ms Y Gc/Ms/Ms. *Revisita profesional sobre sanidad vegetal*. **129**: 33-35.
4. **Berovic M., Habijanac J., Zore I., Wraber B., Hodzar D., Boh B., Pohleven F. 2003.** Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, **103**: 77-86.
5. **Castro C., Martín E. 2000.** Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. *Control Calidad SEIMC*, 1-10.
6. **Chamilos G., Kontoyiannis D. 2005.** Usistance mechanisms os *Aspergillus fumigatus*. *Drug resistance updates*, 344-358.
7. **Chang M., Tsai G., and Hounng J. 2006.** Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme and Microbial Technology* **38**:407 -414.
8. **Chen Y., Ming-Yong Y., Nie S., Liu W., Gong X., and Wang Y. 2008.** Development of a chromatographic fingerprint for the chloroform extracts of *Ganoderma lucidum* by HPLC and LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **47**:469 - 477.
9. **Córdoba S., Rodero L., Vivot W., Abrantes R., Davel G., Vitale R. 2008.** In vitro interactions of antifungal agents againts clinical isolates of *Fusarium* spp. *International Journal Antimicrobial agents*, 171-174.
10. **Cragg G., Newman D., Snader K. 1997.** Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal Natural Products* **60**: 52-60.
11. **Deviennea F., Raddib G., Varandab E., and Vilegasa W. 2002.** In Vitro Cytotoxicity of Some Natural and Semi-Synthetic Isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, **57**: 85-88.
12. **Donnelly F., McCarron A., Tunney M. 2008.** Antifungal photodynamic therapy *Microbiological Research*, **163**:1-12.
13. **Espinel A. 2008.** Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, **25**:101-106.
14. **Flores, M. 1992.** Identificación de metabolitos secundarios y actividad antibacteriana. Facultad de ciencias, departamento de biología. Pontificia Universidad Javeriana.
15. **Göhr A., Grabley S., Thiericke R., Zeeck. 1996.** Secondary metabolites by chemical screening, Agistatines, novel pyranacetals from the fungus FH-A 6239. *Liebigs Annals of Chemistry*, 627-633.
16. **Grabley S., Thiericke R. 2000.** The Impact of Natural Products on Drug Discovery In Grabley S, Thiericke R. *Drug Discovery from Nature*.

17. **Gräfe U. 2000.** Secondary Metabolites: From Past to Present. In Grabley S, Thiericke R. Drug Discovery From Nature.
18. **Li Z., Liu J., and Zhao Y. 2005.** Possible Mechanism Underlying the Antiherpetic Activity of a Proteoglycan Isolated from the Mycelia of *Ganoderma lucidum* in Vitro. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, **38**:34-40.
19. **Lull C., Wichers H., Savelkoul H. 2005.** Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators inflamm **2**:63-80.
20. **Mesa C., Bueno G., y Betancur A. 2004.** Productos naturales con actividad antimicótica. Revista especializada Quimioterapia, **17**:325-331.
21. **Moellering C., Graybill R., Mc Gowan E., and Corey L. 2007.** Antimicrobial Resistance Prevention initiative-an update: proceedings of an expert panel on Resistance. The American Journal of Medicine, **7**: 4-25.
22. **Nino F. 2010.** Evaluación de metabolitos secundarios del hongo *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a *Fusarium* spp. de interés clínico. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
23. **Ofodile N., Uma U., Kokubun T., Grayer J., Ogundipe T., and Simmonds S. 2005.** Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. Phytotherapy Research, **19**:310-313.
24. **Paduch R., Szerszeñ , Trytek M., and Fiedurek J. 2007.** Terpenes: substances useful in human healthcare. Archives of Immunology, **55**: 315–327.
25. **Petrikkos G., Skiada A. 2007.** Recent advances in antifungal chemotherapy. International Journal Antimicrobial agents, **30**: 108-117.
26. **Prada D., Vega P. 2008.** Caracterización y evaluación de actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hongos de la familia *Tricholomataceae* frente a agentes causales de dermatomicosis en animales. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.
27. **Rogers T. 2006.** Antifungal Drug resistance: limited data, dramatic impact. International journal of Antimicrobial agent, 7-11.
28. **Romero M., Zárate C. 2009.** Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa y compuestos fenólicos a partir de una cepa de *Ganoderma lucidum* a escala de laboratorio. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.
29. **Ruiz J. 2001.** El asombroso reino de los hongos. Avance y perspectiva **20**: 275-281.
30. **Russell R, Paterson M. 2006.** *Ganoderma*-A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry, **67**:1985-2001.
31. **Saltarelli R., Ceccaroli M., Lotti A., Zambonelli M., Buffalili L., Casadei L., Vallorani., and V Stocchi. 2009.** Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma Lucidum* from Central Italy. Food Chemistry **116**:143-149.
32. **Schmid I., Sattler I., Grabley S., Thiericke R. 1999.** Natural Products in High Throughput Screening: Automated High-Quality Simple Preparation. Journal of Biomolecular Screening **4**: 15-25.
33. **Tang J., Zhong J., 2003.** Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide ans ganoderic

- acid. Enzyme and Microbial technology, **32**:478-484.
34. **Vermeris W., and Nicholson R. 2006.** Phenolic Compounds Biochemistry.
35. **Verpoorte R. 1998.** Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. Drug Discovery Today **3**: 323-238.
36. **Viuda M., Ruiz Y., Fernández J., Pérez J. 2008.** Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. Food Control, **19**: 1130–1138.
37. **Wang H., and Ng B. 2005.** Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*.
38. **Yang M., Wang S., Guan, and J Xia. 2007.** Analisis of Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. American Society for Mass Spectrometry **18**:927 - 939.
39. **Yoon Y., Eo K., Kim S., Lee K., Han S. 1994.** Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. Archives of Pharmacological Research, **17**: 438-442.
40. **Zjawiony K. 2004.** Biologically active compounds from aphyllophorales (polypore) fungi. Journal of natural products, **67**: 300-310.
41. **Zuluaga J., Pérez C., Angulo A., Torres O., Santafé G. 2007.** Química y actividades antioxidante y bactericida del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*. Scientia Et Technica, **33**: 329-332.
42. MK. Tecnoquímicas.
(http://www.thomsonplm.com/Diccionarios/Col_PLM37/PLM/productos/47192.htm).
Fecha de consulta: 17 de Mayo de 2010.

ANEXOS

ANEXO 1. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS FRENTE A LAS CEPAS EVALUADAS

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA					
	<i>Aspergillus</i> 10	<i>Aspergillus</i> 1	<i>Aspergillus</i> 2	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i> 5
EXTRACTO	% inhibición	% inhibición	% inhibición	% inhibición	% inhibición
M1-1	0	0	0	0	0
M1-2	0	0	0	21,91	0
M1-3	11,91	0	0	0	0
M1-4	9,76	0	0	0	0
M1-5	0	0	0	0	0
M1-6	8,89	0	0	32,81	0
M1-7	15,63	0	0	0	0
M1-8	0	0	0	0	0
M1-9	7,81	0	0	0	0
M2-1	0	0	0	0	0
M2-2	19,06	0	0	0	0
M2-3	16,11	0	0	0	0
M2-4	17,67	0	0	0	0
M2-5	0	0	0	0	0
M2-6	23,78	0	0	0	0
M2-7	18,16	0	0	0	0
M2-8	11,15	0	0	0	0
M2-9	0	0	0	0	0
M3-1	0	0	0	0	0
M3-2	13,19	9,65	0	0	0
M3-3	18,19	0	0	0	0
M3-4	0	0	0	0	0
M3-5	10,73	8,47	0	0	0
M3-6	0	0	0	0	0
M3-7	13,40	0	0	0	0
M3-8	0	0	0	0	0
M3-9	22,92	0	0	0	0
M4-2	13,75	8,92	0	0	0
M4-3	19,82	8,82	0	35	0
M4-4	0	0	0	0	0

M1, M2 y M3; M-1: Éter de petróleo seriado biomasa; M-2: CH₂Cl₂ seriado biomasa; M-3: AcOEt seriado biomasa; M-4: Etanol seriado biomasa; M-5: Éter de petróleo seriado Líquido-Líquido; M-6: CH₂Cl₂ seriado Líquido-Líquido; M-7: AcOEt seriado Líquido-Líquido; M-8: Hidroalcohólica; M-9: extracto crudo.

M4-2: fase CH₂Cl₂; M4-3: fase AcOEt; M4-4: fase *caldo*.

ANEXO 2. COMPONENTES Y PREPARACIÓN DEL AGAR MUELLER HINTON MODIFICADO

COMPONENTES	CANTIDAD O VOLUMEN/LITRO DE MEDIO
Peptona de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Extracto de carne	4 g
Glucosa	2% p/v
Azul de metileno	100 UI
Agar-Agar	15 g
PREPARACIÓN	
Disolver todos los componentes en agua destilada, y calentar hasta ebullición, luego añadir el azul de metileno y por último autoclavar a 121°C por 15 minutos.	

ANEXO 3. PREPARACIÓN Y COMPONENTES DEL AGAR AVENA

COMPONENTES	CANTIDAD/LITRO DE MEDIO
Harina de avena	20 g
Agar-Agar	15 g
PREPARACIÓN	
Disolver todos los componentes en agua destilada, calentar hasta ebullición y finalmente autoclavar a 121°C por 15 minutos.	

ANEXO 4. PREPARACIÓN Y COMPONENTES DEL MEDIO LÍQUIDO CON EL QUE SE PRODUJO LA BIOMASA DE *G. lucidum*

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Cloruro de amonio	2 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L
MgSO ₄ ·H ₂ O	0,5 g/L
Cloranfenicol	0,1 g/L
Aceite de oliva (%v/v)	4.04 g/L
Extracto de levadura	17.46 g/L
Sacarosa	50 g/L
PREPARACIÓN	
En un litro de agua destilada agregar cloruro de amonio, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , y MgSO ₄ ·H ₂ O, agitando y calentando si es necesario, hasta disolver los compuestos totalmente en el agua. Posteriormente agregar el cloranfenicol, extracto de levadura y la sacarosa, agitando hasta su completa disolución, llevándolo a un volumen total de 3000 mL. Luego ajustar el pH a 5.7 y llevarlo a 3040 mL usando micropipeta de 100-1000 uL. Finalmente se debe alicuotar 66,77 mL por erlenmeyer de 250 mL, para después agregar 3230 uL de aceite de oliva a cada erlenmeyer.	

ANEXO 5a. CODIFICACIÓN DE EXTRACTOS Y FRACCIONES

MUESTRA	CODIFICACIÓN	FRACCIÓN O EXTRACTO
Cuerpo Fructífero inmaduro no esporulado	M1-1	Éter fraccionamiento sólido-líquido
	M1-2	CH ₂ Cl ₂ fraccionamiento sólido-líquido
	M1-3	AcOEt fraccionamiento sólido-líquido
	M1-4	Etanol fraccionamiento sólido-líquido
	M1-5	Éter fraccionamiento líquido-líquido
	M1-6	CH ₂ Cl ₂ fraccionamiento líquido-líquido
	M1-7	AcOEt fraccionamiento líquido-líquido
	M1-8	Hidroalcohólica
	M1-9	Extracto crudo etanólico
Cuerpo Fructífero maduro esporulado	M2-1	Éter fraccionamiento sólido-líquido
	M2-2	CH ₂ Cl ₂ fraccionamiento sólido-líquido
	M2-3	AcOEt fraccionamiento sólido-líquido
	M2-4	Etanol fraccionamiento sólido-líquido
	M2-5	Éter fraccionamiento líquido-líquido
	M2-6	CH ₂ Cl ₂ fraccionamiento líquido-líquido
	M2-7	AcOEt fraccionamiento líquido-líquido
	M2-8	Hidroalcohólica
	M2-9	Extracto crudo etanólico
Micelio secundario	M3-1	Éter fraccionamiento sólido-líquido
	M3-2	CH ₂ Cl ₂ fraccionamiento sólido-líquido
	M3-3	AcOEt fraccionamiento sólido-líquido
	M3-4	Etanol fraccionamiento sólido-líquido
	M3-5	Éter fraccionamiento líquido-líquido
	M3-6	CH ₂ Cl ₂ fraccionamiento líquido-líquido
	M3-7	AcOEt fraccionamiento líquido-líquido
	M3-8	Hidroalcohólica
	M3-9	Extracto crudo etanólico
Caldo o medio líquido	M4-2	CH ₂ Cl ₂ fraccionamiento líquido-líquido
	M4-3	AcOEt fraccionamiento líquido-líquido
	M4-4	Extracto caldo

ANEXO 5b. CONCENTRACIONES DE LOS 30 EXTRACTOS DE *G. lucidum*

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (g/mL)
M1-1	0,261
M1-2	0,119
M1-3	0,328
M1-4	0,562
M1-5	0,054
M1-6	0,256
M1-7	0,015
M1-8	0,011
M1-9	0,171
M2-1	0,387
M2-2	0,064
M2-3	0,229
M2-4	0,277
M2-5	0,057
M2-6	0,207
M2-7	0,055
M2-8	0,014
M2-9	0,236
M3-1	0,678
M3-2	0,155
M3-3	0,131
M3-4	0,092
M3-5	0,059
M3-6	0,018
M3-7	0,017
M3-8	0,010
M3-9	0,054
M4-2	0,651
M4-3	0,083
M4-4	0,083

ANEXO 6. HOJAS DE VIDA DE LOS HONGOS PATÓGENOS OPORTUNISTAS

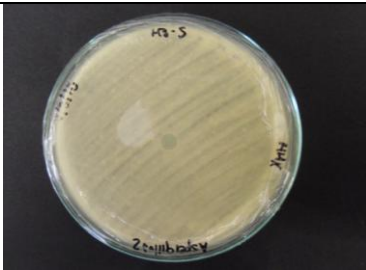
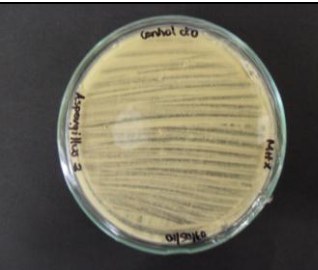
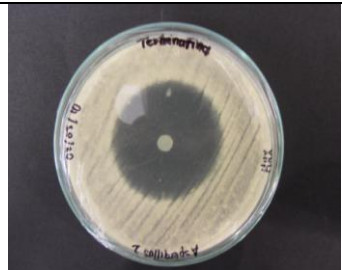
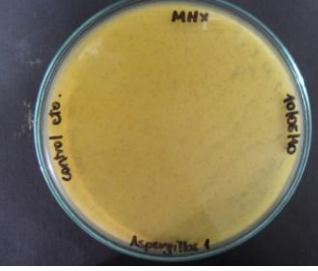
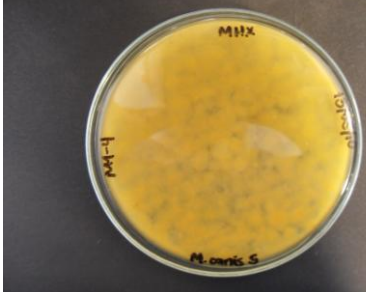
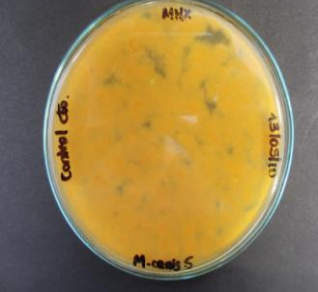
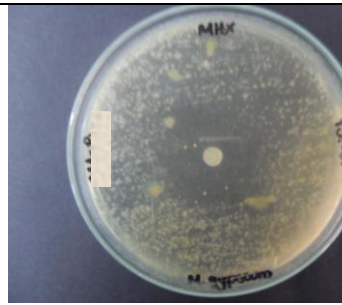
COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA – PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable:		Melva Linares Linares	
Número CMDM-PUJ		31 (5)	
Microorganismo		<i>Microsporum canis</i>	
Fuente	Laboratorio micología clínica P.U.J	Origen	Aislado de perro bebé callejero
Almacenamiento	Agua destilada en discos de agar	Historial PUJ	Cepario desde Junio de 2004
Nivel de seguridad	2	Conservación	Agua destilada
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura 25°C durante 6 días.	
Pruebas biológicas <i>In vitro</i> : perforación de pelo POSITIVA		Características morfológicas Características Macroscópicas: de crecimiento moderado (6-10 días) Anverso: pigmento difusible de amarillo oscuro a claro. Reverso: pigmento difusible de blanco a amarillo. Textura: cremosa Aspecto: radiado Características Microscópicas: hifas en raqueta con clamidosporas y cuerpos nodulares; microconidios ocasionales; macroconidios en huso, xtremos afilados, pared gruesa y con 6 o mas lóculos.	
Reacciones atípicas		No presenta	
Identificación de peligros	Forma de transmisión Período de incubación Enfermedades que produce	Animales domésticos (gatos, perros)- Humanos Persona-Persona Fómites/ Zoonótico 6-10 días Infección endotrix, <i>Tinea capitis</i> y <i>Corporis</i>	
Medidas de protección/Manipulación		- EL personal debe usar equipo de protección normal (Uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro) - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: Lavado de manos - Intervención solo por personal capacitado	
Conservación del microorganismo		Conservación en agua Objetivos a conseguir en todo proceso de conservación de microorganismos son el mantenimiento de: - Viabilidad: Debe de ser posible recuperar el microorganismo conservado cuando sea necesario. - Estabilidad: Los microorganismos recuperados deben presentar las mismas características genotípicas y fenotípicas de aquellos de los que provienen. - Pureza: Los cultivos en conservación no deben presentar ningún tipo de contaminación.	

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA – PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable:		Melba Linares Linares	
Número CMDM-PUJ		7	
Microorganismo		<i>Microsporium gypseum</i>	
Fuente	Donado Dra Mery Santaella	Origen Humano	Aislado de Uña de pie
Almacenamiento	Agua destilada en discos de agar		
Nivel de seguridad	2	Conservación	Agua destilada
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura 25°C durante 7-10 días.	
Pruebas biológicas		Características morfológicas Características Macroscópicas: crecimiento moderado (6-10 días) Anverso: color amarillo a blanco Reverso: color amarillo a crema Textura: pulverulenta, aspecto plano Aspecto: radial Características Microscópicas: hifas con macroconidias en huso, paredes delgadas y con menos de 6 lóbulos lo que la diferencia de <i>M canis</i> (mas de 6 lóbulos); microconidias ocasionales.	
Reacciones atípicas		No presenta	
Identificación de peligros	Forma de transmisión	Animales domésticos (gatos, perros)- Humanos Persona-Persona Fómites/ Geofísico	
	Período de incubación	7-10 días	
	Enfermedades que produce	<i>Tinea capitis</i> , Onicomycosis	
Medidas de protección/Manipulación		- EL personal debe usar equipo de protección normal (Uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro) - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: Lavado de manos - Intervención solo por personal capacitado	
Conservación del microorganismo		Conservación en agua Objetivos a conseguir en todo proceso de conservación de microorganismos son el mantenimiento de: - Viabilidad: Debe de ser posible recuperar el microorganismo conservado cuando sea necesario. - Estabilidad: Los microorganismos recuperados deben presentar las mismas características genotípicas y fenotípicas de aquellos de los que provienen. - Pureza: Los cultivos en conservación no deben presentar ningún tipo de contaminación.	

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA – PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable:		Melba Linares Linares	
Número CMDM-PUJ		11 (1)	
Microorganismo		<i>Aspergillus sp</i>	
Fuente	Donado Dra Mery Santaella	Origen HUMANO	Aislado de muestra de esputo
Almacenamiento	Agua destilada en discos de agar		
Nivel de seguridad	2	Conservación	Agua destilada
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura 25°C durante 4 días.	
Pruebas biológicas		Características morfológicas Características Macroscópicas: crecimiento rápido (3-4 días), Anverso: colonias con pigmento difusible de amarillo a verde Reverso: colonias color verde Textura: pulverulenta Aspecto: radiado Características Microscópicas: se caracteriza por presentar la “cabeza aspergilar” constituida por el conidióforo, vesícula, fiálides. Hifas hialinas	
Reacciones atípicas		No presenta	
Identificación de peligros	Forma de transmisión	Inhalación de esporas Persona-Persona	
	Período de incubación	3-4 días	
	Enfermedades que produce	Enfermedad pulmonar alérgica o invasora, aspergiloma, lesiones en piel, invasión cerebral, micetoma.	
Medidas de protección/Manipulación		- EL personal debe usar equipo de protección normal (Uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro) - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: Lavado de manos - Intervención solo por personal capacitado	
Conservación del microorganismo		Conservación en agua Objetivos a conseguir en todo proceso de conservación de microorganismos son el mantenimiento de: - Viabilidad: Debe de ser posible recuperar el microorganismo conservado cuando sea necesario. - Estabilidad: Los microorganismos recuperados deben presentar las mismas características genotípicas y fenotípicas de aquellos de los que provienen. - Pureza: Los cultivos en conservación no deben presentar ningún tipo de contaminación.	

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA – PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable:		Melba Linares Linares	
Número CMDM-PUJ		12 (2)	
Microorganismo		<i>Aspergillus sp</i>	
Fuente	Donado Dra Mery Santaella	Origen HUMANO	Aislado de muestra de esputo
Almacenamiento	Agua destilada en discos de agar		
Nivel de seguridad	2	Conservación	Agua destilada
Condiciones de crecimiento		Aerobio estricto. Temperatura 25°C durante 4 días.	
Pruebas biológicas		Características morfológicas Características Macroscópicas: crecimiento rápido (3-4 días), Anverso: colonias con pigmento difusible de amarillo a verde Reverso: colonias color verde Textura: pulverulenta Aspecto: radiado Características Microscópicas: se caracteriza por presentar la “cabeza aspergilar” constituida por el conidióforo, vesícula, fiálides. Hifas hialinas	
Reacciones atípicas		No presenta	
Identificación de peligros	Forma de transmisión	Inhalación de esporas Persona-Persona	
	Período de incubación	3-4 días	
	Enfermedades que produce	Enfermedad pulmonar alérgica o invasora, aspergiloma, lesiones en piel, invasión cerebral, micetoma.	
Medidas de protección/Manipulación		- EL personal debe usar equipo de protección normal (Uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro) - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: Lavado de manos - Intervención solo por personal capacitado	
Conservación del microorganismo		Conservación en agua Objetivos a conseguir en todo proceso de conservación de microorganismos son el mantenimiento de: - Viabilidad: Debe de ser posible recuperar el microorganismo conservado cuando sea necesario. - Estabilidad: Los microorganismos recuperados deben presentar las mismas características genotípicas y fenotípicas de aquellos de los que provienen. - Pureza: Los cultivos en conservación no deben presentar ningún tipo de contaminación.	

**ANEXO 7. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LAS CEPAS FRENTA A LOS EXTRACTOS
DE *Ganoderma lucidum*.**

Cepa del hongo patógeno	Foto extracto más característico	Control crecimiento	Control positivo inhibición Terbinafina
<i>Aspergillus</i> No. 2			
<i>Aspergillus</i> No. 1			
<i>Aspergillus</i> No. 10			
<i>Microsporum</i> <i>canis</i> No. 5			
<i>Microsporum</i> <i>gypseum</i>			

Contenido

Diagnóstico fitosanitario

Ácaros tuckerélidos (Acari, Tetranychidea, Tuckerellidae) asociados a *Casuarina equisetifolia* L. en La Habana 69
Josefina Cao López y Juan L. Leal Hechavarría

Catálogo de ácaros interceptados en la provincia de Granma 73
Yaquelin Labrada Hernández, Héctor Luis Sariol Bring, Blanca Margarita Nieves Torres, José L. García Bretones y Pedro E. de la Torre Santana

Incidencia del carbón *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll and Oberw. en variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en la provincia de Las Tunas 87
Heriberto Domínguez Salazar, Mérida L. Rodríguez Regal, Alberto N. González Marrero, Damián Fernández Cabreja e Irene Pérez Ortiz

Ecología

Supervivencia de *Ralstonia solanacearum* en suelo y tejido de plantas de banano en Urabá, Colombia 91
Mónica Obregón Barrios, Paola Andrea Rodríguez Gaviria y Mauricio Salazar Yepes

Control químico

Compatibilidad entre nuevos plaguicidas químicos sistémicos y el hongo micorrizógeno *Glomus intraradices* Schenk y Smith 99
Rigel Fernández Valle, Marlene M. Veitía Rubio y Yoandry Rodríguez Rivero

Eficacia del benomyl y el fludioxonil para el control de *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold y *V. dahliae* Klebahn en semillas de vegetales 107
Luis Pérez Vicente, Jorge Abreu Fundora, Michel Pérez Miranda, Einar Martínez de la Parte y María Pueyo Figueroa

Control biológico

Selección de *Bacillus* spp. con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo 117
Arturo Reyes Ramírez, Esaú Ruiz Sánchez, Carmen Yam Chimal y Mirza Dzul Chan

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Navisporus floccosus* y *Ganoderma* sp. contra hongos fitopatógenos 123
Jorge R. Palacios Atencio, Carlos R. Romeu Carballo, Rebeca Ramírez Ochoa, Vivian Leliebre Lara y Jorge L. Ortiz Medina

Contents

Phytosanitary diagnosis

- Tuckerelids Mites (Acari, Tetranychidae, Tuckerellidae) Associated to *Casuarina equisetifolia* in Havana** 69
Josefina Cao López and Juan L. Leal Hechavarría

- Mites Catalogue Intercepted in Cuban Granma Province** 73
Yaquelín Labrada Hernández, Héctor Luis Sariol Bring, Blanca Margarita Nieves Torres, José L. García Bretones and Pedro E. de la Torre Santana

- Incidente of Sugarcane Smut *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll and Oberw. in Sugarcane Varieties (*Saccharum officinarum* L.) in Las Tunas Province** 87
Heriberto Domínguez Salazar, Mérida L. Rodríguez Regal, Alberto N. González Marrero, Damián Fernández Cabreja and Irene Pérez Ortiz

Ecology

- Survival of *Ralstonia solanacearum* in Soil and Banana Plants Tissue in Urabá, Colombia** 91
Mónica Obregón Barrios, Paola Andrea Rodríguez Gaviria and Mauricio Salazar Yepes

Chemical control

- Compatibility of New Systemic Chemical Pesticides and Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* Schenk & Smith** 99
Rigel Fernández Valle, Marlene M. Veitía Rubio and Yoandry Rodríguez Rivero

- Efficacy of Benomyl and Fludioxonil in the Control of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* in Vegetable Seeds** 107
Luis Pérez Vicente, Jorge Abreu Fundora, Michel Pérez Miranda, Einar Martínez de la Parte and María Pueyo Figueroa

Biological control

- Selection of *Bacillus* spp. with Antagonistic Activity *in vitro* on *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in Different Culture Media** 117
Arturo Reyes Ramírez, Esaú Ruiz Sánchez, Carmen Yam Chimal and Mirza Dzul Chan

- Antifungal Activity *in vitro* of *Navisporus floccosus* and *Ganoderma* sp. Extracts Against Phytopathogenic Fungi** 123
Jorge R. Palacios Atencio, Carlos R. Romeu Carballo, Rebeca Ramírez Ochoa, Vivian Leliebre Lara and Jorge L. Ortiz Medina

ÁCAROS TUCKERÉLIDOS (ACARI, TETRANYCHOIDEA, TUCKERELLIDAE) ASOCIADOS A CASUARINA EQUISETIFOLIA L. EN LA HABANA

Josefina Cao López¹ y Juan L. Leal Hechavarría²

¹ Departamento de Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 no. 455 e/ J e I, La Habana, C.P. 10400, jcao@fbio.uh.cu

² Estudiante de segundo año de Biología, Universidad de La Habana

RESUMEN

Conocer la biodiversidad de los ácaros fitófagos es decisivo para poder suministrar información sobre las especies dañinas en los agroecosistemas. Los ácaros tuckerélidos son frecuentes en los cítricos; sin embargo, en los últimos años en varios países se han colectado sobre otras plantas. No se ha comprobado que sean vectores de enfermedades, ni que causen serios trastornos a sus plantas hospedantes; pero sí son un elemento a tener en cuenta porque su distribución como especies polífagas se ha incrementado paulatinamente. Por lo tanto, se deben efectuar observaciones más minuciosas que permitan explicar su verdadero desempeño en el ecosistema en que se hallan. En 1980 se informó la presencia de esta familia por primera vez en Cuba. Ahora los ácaros se colectaron en los municipios de Playa y Plaza de la Revolución sobre plantas de Casuarina equisetifolia L. entre diciembre de 2009 a febrero de 2010, y desde diciembre de 2010 a febrero de 2011. Las colectas se decoloraron con ácido láctico y se montaron en portaobjetos planos medidos por solución Berlese. Se identificaron mediante claves dicotómicas. Las especies identificadas fueron *Tuckerella pavoniformis* Ewing, *T. knorri* Baker y Tuttle, *T. ornata* Tucker y *T. ablutus* Chaudri. Constituye *C. equisetifolia* L. una nueva adición a la lista de plantas hospedantes de tuckerélidos en Cuba, y *T. ablutus* es una nueva especie para la fitoacarofauna cubana. Se confeccionó una clave para las cuatro especies de *Tuckerella* presentes en Cuba.

Palabras claves: Acarina, ácaros nocivos, *Tuckerella*, *Casuarina*

ABSTRACTS

To know the biodiversity of plant feeding mites is very important in order to obtain information about the harmful species in the agroecosystems. Tuckerelid mites are frequent on the citric fruits; however, in the last years, they have been collected on other plants in several countries. It has not been proven that they are biological vectors of diseases, or that they cause serious dysfunctions to their host plants. But, they are a concern, because their distribution has progressed little by little. Therefore, more meticulous observations should be made that allow explaining their true acting in the ecosystem. In 1980, this family was informed for the first time in Cuba. The mites were collected in the municipalities Plaza de la Revolución and Playa on *Casuarina equisetifolia* L. plants between December of 2009 to February of 2010 and December of 2010 to February of 2011. Collects were decolorized with lactic acid and mounted in slides with Berlese solution. They were identified by means of keys. Collected species were *Tuckerella pavoniformis* Ewing, *T. knorri* Baker and Tuttle, *T. ornata* Tucker and *T. ablutus* Chaudri. *C. equisetifolia* constitutes a new addition to the list of tuckerelids host plants in Cuba, and *T. ablutus* it is a new species for the Cuban fauna of plants feeding mites. A key for the four species known in Cuba is given.

Key words: Acari, pest mites, *Tuckerella*, *Casuarina*

INTRODUCCIÓN

Con la diversificación agrícola que incluye la explotación de nuevos cultivos, tanto alimentarios, ornamentales y medicinales, se ha favorecido el incremento poblacional de numerosas especies de ácaros fitófagos. Esto obliga a una observación, detección y manejo más estricto de estas plagas. Es muy importante saber cómo

llegaron al país y qué cambios pueden ocasionar en sus plantas hospedantes.

Los ácaros del género *Tuckerella* (Acari, Tuckerellidae) son relativamente poco conocidos en Cuba, y por lo general muchas veces no se informan como especies

fitoparásitas importantes [Aguilar y Murillo, 2008]. Esta es una familia de ácaros que aparentemente no produce daños visibles derivados de su hábito fitófago; sin embargo, se ha confirmado que sus miembros son especies polífagas que podrían pasar a otros hospedantes y convertirse en plagas. De esto se deriva una primera etapa que consiste en saber qué especies están presentes y qué plantas las albergan. A partir de este conocimiento básico se podrán efectuar otras observaciones que permitan arribar a conclusiones aceptables relacionadas con su desempeño en el ecosistema en que se hallan.

La familia Tuckerellidae es un grupo monogénico con alrededor de treinta especies [Smith-Meyer y Ueckermann, 1997; Beard y Walter, 2005]. Se distinguen de otros ácaros tetranychoides por la presencia de 36 setas dorsales histerosomales en forma de abanico, y por las setas caudales filamentosas que le han otorgado el nombre vulgar de *ácaros pavo real*. Aparecen frecuentemente en los cítricos. Observaciones realizadas por Ochoa (1989) y Ochoa *et al.* (1991, 1994) demostraron que *Tuckerella knorri* Baker y Tuttle puede provocar, si las condiciones son favorables, daños significativos en limón Mesina (*Citrus limon* Osbeck).

En los últimos años, en varios países como Estados Unidos, Costa Rica, Brasil, Guatemala, Colombia, México, África del Sur, Filipinas, Japón, Pakistán, China, Egipto, Nueva Zelanda y Australia se han colectado ácaros tuckerélicos en un numeroso grupo de plantas, como por ejemplo frutabomba (*Carica papaya* L.), cerezo (*Malpighia glabra* L.), mango (*Mangifera indica* L.), naranja de China (*Citrus sinensis* Osbeck), chalmugra (*Hydnocarpus anthelmintica* Pierre), café (*Coffea arabica* L.), guanábana (*Annona muricata* L.), aralia (*Polyscias fruticosa* Bailey), y también en pastos y césped [Barbosa *et al.*, 2003; Caniz, 2006; Aguilar y Murillo, 2008; CeNBIO, 2009; Leal, 2011]. Esto demuestra que su distribución como especies polífagas se ha incrementado paulatinamente.

En Cuba ha aparecido, además de en cítricos (*Citrus* sp. y *Citrus aurantifolia* Swingle), en otras plantas como mamey (*Mammea americana* L.), aguacate (*Persea americana* Mill.) y zapote (*Achras sapote* L.).

Recientemente apareció en *Casuarina equisetifolia* L., que es el llamado *pino* en La Habana y *pino de Australia* en otros lugares del país; por lo tanto, el objetivo de este trabajo es identificar qué especies de *Tuckerella* están asociadas a esta planta en Playa y Plaza de la Revolución, municipios costeros de La Habana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ácaros se colectaron en los municipios de Playa y Plaza de la Revolución sobre plantas de *C. equisetifolia* L. entre diciembre de 2009 y febrero de 2010, y diciembre de 2010 a febrero de 2011. La extracción se realizó directamente por medio de una aguja enmangada y bajo visión estereoscópica. Los ácaros se decoloraron con ácido láctico y se montaron en portaobjetos planos mediados por solución Berlese y se colocaron en una estufa a 40 °C por un tiempo mínimo de tres días. Posteriormente se procedió a su identificación mediante claves [Smith-Meyer y Ueckermann, 1997] en un microscopio clínico (100x, 400x, 1000x). Se confeccionó una clave para identificar las especies de *Tuckerella* presentes en Cuba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el municipio de Playa se colectaron las especies *T. pavoniformis* Ewing, *T. knorri* Baker y Tuttle, *T. ornata* Tucker y *T. ablutus* Chaudri en *Casuarina equisetifolia*, mientras que el municipio de Plaza de la Revolución se colectaron solamente *T. ornata* Tucker y *T. pavoniformis* Ewing; por lo tanto, esta planta constituye una nueva adición a la lista de plantas hospedantes de tuckerélicos en Cuba, y *T. ablutus* es una nueva especie para la acarofauna cubana.

La especie *T. indica* se informó en *Casuarina* sp. en la India [Prasad, 1973], y *T. ablutus* se colectó en Pakistán [Chaudri, 1974].

Los ácaros adultos, así como los juveniles, se encontraron fundamentalmente en los tallos gruesos en los meses de invierno, entre diciembre de 2009 y febrero de 2010, mientras que en el mismo período, entre 2010 y 2011, se ubicaron en las ramas más finas, cercanos a las hojas. Este comportamiento pudo haber estado influido por la sequía predominante durante este tiempo, que forzó a los ácaros a migrar a zonas de la planta con mejores condiciones para obtener alimento. Se observó también que estos ácaros aprovechan la protección que le brinda la superficie áspera y abrupta de los tallos y ramas de esta planta.

Los ácaros de este género se alimentan principalmente de los tallos de su planta hospedante, y también pueden hacerlo de los frutos o brotes [Prasad, 1973]. Muchas veces la mayoría de los investigadores ignora esta conducta.

En Cuba la familia Tuckerellidae se informó por primera vez en 1980 [Cao, 1980]. En esa ocasión se identi-

ficaron las especies *T. ornata* Tucker y *T. knorri* Baker y Tuttle en *Mammea americana* L. en la Sierra de Caballos (Isla de la Juventud); *T. pavoniformis* Ewing en *Achras sapote* L. en Santiago de Las Vegas (La Habana) y *Tuckerella* sp. en *Citrus aurantifolia* Swingle, también en Santiago de Las Vegas. Esta autora señaló que la corteza áspera y el color pardo rojizo de los frutos donde encontró a los tuckerélidos contribuyeron a su protección y camuflaje. Observó también que áreas de la corteza de los frutos cítricos afectados por el ácaro del moho (*Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead)) y el ácaro chato (*Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)) formaban costras que los ácaros tuckerélidos utilizaban como protección.

Veinte años después Suárez (2004) reporta *T. ornata* Tucker en *A. sapote* y *Citrus* sp., y *T. pavoniformis* Ewing

en *Persea americana* Mill. en Guantánamo. De la Torre (2005) halla *T. pavoniformis* Ewing en *P. americana* Mill., y *T. ornata* Tucker en *C. limon* Burm y en *P. americana* Mill., todas en La Habana. Domínguez y Mateo (2008) encuentran *T. ornata* Tucker en *C. sinensis* Osbeck en los municipios de Rafael Freyre, Banes y puerto Vita, provincia de Holguín.

Tuckerella ablutus Chaudhri se reconoce por los seis pares de setas (caudales) opistosomales (h) flageliformes. El par de setas anteriores prodorsales verticales V_1 son mayores que V_2 . La región dorsal del cuerpo no tiene reticulación o está muy débilmente reticulada. Las cuatro últimas setas histerosomales mediodorsales (f_1 y f_2) son palmeadas y se disponen linealmente; f_1 es ligeramente mayor que f_2 y están alejadas del margen posterior del cuerpo.

Clave para las especies cubanas de *Tuckerella*

1. Con cinco pares de setas (caudales) opistosomales (h) flageliformes..... *T. ornata*
 Con seis pares de setas (caudales) opistosomales (h) flageliformes.....2
2. Cuerpo sin reticulación dorsal o muy débilmente ornamentado..... *T. ablutus*
 Cuerpo reticulado.....3
3. Setas anteriores prodorsales V_1 aovadas, casi tan largas como anchas. Setas histerosomales mediodorsales posteriores palmeadas y desiguales en tamaño, f_2 anterior a f_1 *T. pavoniformis*
 Setas anteriores prodorsales V_1 mucho más largas que V_2 . Setas histerosomales mediodorsales posteriores palmeadas y semejantes entre sí, con ápice redondeado. *T. knorri*

CONCLUSIONES

- *Tuckerella ablutus* Chaudri es una nueva especie de ácaros tuckerélidos para la acarofauna cubana.
- *Casuarina equisetifolia* L. es una nueva planta hospedante para los ácaros tuckerélidos en Cuba.
- Se confeccionó una clave dicotómica para la identificación de las especies de *Tuckerella* presentes en Cuba.

REFERENCIAS

- Aguilar, H.; P. Murillo: «Nuevos hospederos y registros de ácaros fitófagos para Costa Rica: período 2002-2008» *Agronomía Costarricense* 32 (2): 7-28, 2008.
- Barbosa, D. G. F.; M. G. C. Gondim; R. Barros; J. Oliveira: «Diversidade de ácaros em aceroleira (*Malpighia emerginata* A. DC.) na Universidade Federal Rural de Pernambuco em Recife», *PE. Neotropical Entomology* 32 (4): 577-583, Brasil, 2003.
- Beard, J. J.; D. E. Walter: «New Species of *Tuckerella* (Prostigmata: Tetranychidae) from Australia with Descriptions of All Stages and a Discussion of the Tritonymphal Stage», *Acarologia* 45 (1): 49-60, Francia, 2005.
- Caniz, I. A. T.: «Análisis cualitativo del riesgo de plagas, para la exportación de frutos de papaya (*Carica papaya* L.), de Guatemala hacia Estados Unidos», tesis de graduación como Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Licenciado, Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2006.
- Cao, J.: «La familia Tuckerellidae y su presencia en Cuba», *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Cítricos y otros frutales* 3 (1-2): 47-56, Cuba, 1980.
- CeNBIO: «Diversidad biológica cubana», Centro Nacional de Biodiversidad, Cuba, 2009, <http://www.ecosis.cu/cenbio/cenbio.htm> (consultado en septiembre de 2011).
- Chaudri, W. M.: *Taxonomic Study of Mites Belonging to the Family Tenuipalpidae, Tetranychidae, Tuckerellidae, Caligonellidae, Stigmaeidae and Phytoseiidae*, Univ. Agric., Lyallpur, Pakistán, 1974.
- De la Torre, P.: «Colectas acarológicas realizadas por la Sanidad Vegetal en la provincia de La Habana», *Fitosanidad* 9 (3): 3-11, Cuba, 2005.

Ácaros tuckerélidos (Acari, Tetranychoidae, Tuckerellidae) asociados a...

- Domínguez, L.; A. Mateo: «Inventario de los ácaros en la provincia de Holguín», *Fitosanidad* 12 (1): 9-14, Cuba, 2008.
- Leal, J. L.: «Ácaros tuckerélidos (Tuckerellidae) colectados en *Casuarina equisetifolia* L.», Fórum Científico Estudiantil, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, 2011.
- Ochoa, R.: «The Genus *Tuckerella* in Costa Rica (Acari: Tuckerellidae)», *International Journal of Acarology* 15 (4): 205-207, EE. UU., 1989.
- Ochoa, R.; H. Aguilar; C. Vargas: *Ácaros fitófagos de América Central*, Ed. Turrialba, Catie, Costa Rica, 1991.
- Ochoa, R.; H. Aguilar; C. Vargas: *Phytophagous Mites of Central America*, Ed. Turrialba, Catie, Costa Rica, 1994.
- Prasad, V.: «A New Species of *Tuckerella* (Acarina: Tuckerellidae) from India», *Acarologia* 15 (2): 237-239, Francia, 1973.
- Smith-Meyer, M. K. P.; E. A. Ueckermann: «A Review of Some Species of the Families Allochaetophoridae, Linotetranychidae and Tuckerellidae», *International Journal of Acarology* 23: 67-92, EE. UU., 1997.
- Suárez, A.: «Catálogo de ácaros de la provincia de Guantánamo», *Fitosanidad* 8 (1): 3-17, Cuba, 2004.

CATÁLOGO DE ÁCAROS INTERCEPTADOS EN LA PROVINCIA DE GRANMA

Yaquelin Labrada Hernández¹, Héctor Luis Sariol Bring,¹ Blanca Margarita Nieves Torres,¹ José L. García Bretones¹ y Pedro E. de la Torre Santana²

¹ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Central vía Holguín 371, Bayamo, Granma, Cuba, labsanveg@eimagr.cu

² Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal. Ayuntamiento 231 e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución, La Habana, entomologia@sanidadvegetal.cu

RESUMEN

En este trabajo se dan a conocer los ácaros interceptados en la provincia de Granma desde 1980 hasta 2011. Se determinaron 56 especies agrupadas en 12 familias y 33 géneros, las cuales se colectaron en 62 especies de plantas hospedantes. Dentro de las especies interceptadas tres constituyen nuevos registros de plagas para la fauna acarológica de la provincia, y un nuevo depredador para el país. Las especies detectadas fueron enumeradas y ordenadas alfabéticamente por familia, hospedante, municipio y año de interceptación. Los ácaros de mayor importancia en la provincia son *Rhizoglyphus* spp., *Tyrophagus* spp., *Aculops lycopersici*, *Aceria tulipae*, *Polyphagotarsonemus latus*, *Steneotarsonemus spinki* y *Tetranychus tumidus*.

Palabras claves: catálogo, ácaros

ABSTRACT

Mites intercepted in Granma province since year 1980 to 2011 are given in this work. There were determined 56 species contained in 12 families and 33 genera, collected in 62 species of host plants. Inside the intercepted species three constitute new pest reports for mite fauna of the province, and one is new predator for Cuba. The detected species were enumerated and orderly alphabetically for family, host, municipality and year of detection. The more importance mite was *Rhizoglyphus* spp., *Tyrophagus* spp., *Aculops lycopersici*, *Aceria tulipae*, *Polyphagotarsonemus latus*, *Steneotarsonemus spinki* and *Tetranychus tumidus*.

Key words: catalogue, mites

INTRODUCCIÓN

La acarología en Cuba ha logrado un desarrollo sostenido en el conocimiento de los ácaros de importancia agrícola, ya que cada día es mayor la diversidad de estas plagas sobre plantas y animales, que en muchos casos constituyen vectores eficientes de enfermedades.

En sentido general los ácaros están considerados como los artrópodos de menor talla; constituyen un grupo muy diverso; su origen y filogenia siempre han sido aspectos debatidos por los especialistas, ya que la multitud de formas, colores, hábitos, morfología y comportamientos son extremadamente variables.

Desde el punto de vista económico, muchas especies pueden llegar a constituir verdaderas plagas de culti-

vos y de productos almacenados, tanto al alimentarse directamente de ellos como al transmitir virus vegetales [Iraola, 2001]. También se ha profundizado en el conocimiento de los ácaros depredadores como controladores biológicos de otras especies nocivas en diferentes agroecosistemas.

Varios autores han contribuido al conocimiento de los ácaros presentes en Cuba a través de listas y catálogos [Bruner *et al.*, 1975; Pérez y Almaguel, 1978; Cuervo *et al.*, 1994; Socarrás y Palacios-Vargas, 1999; Álvarez y Alarcón, 2004; Martínez *et al.*, 2004; Ramos y de la Torre, 2004; Torre *et al.*, 2005; Torre, 2005; Santos *et al.*, 2005; Bong *et al.*, 2008; Domínguez y Mateo, 2008; Casas y Lafargue, 2009].

Granma se caracteriza por ser una provincia eminentemente agrícola, donde las formas de producción son muy diversas, entre las que aparecen los huertos intensivos, organopónicos de vegetales, plantas medicinales, flores y ornamentales, y los productores populares de arroz, por lo que las especies acarinas presentes en esta región solo son conocidas parcialmente.

Es por ello que este trabajo tiene como objetivo ofrecer un listado actualizado de los ácaros hallados en la provincia de Granma, a partir de los datos aportados por el sistema de la sanidad vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se tomaron los resultados del diagnóstico de los ácaros detectados por los especialistas del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal en la provincia de Granma, desde 1980 hasta 2011 en plantas de interés agrícola, ornamentales y productos almacenados. Las especies detectadas fueron enumeradas y ordenadas alfabéticamente por fa-

milia, planta hospedante, municipio y año de interceptación. Las especies informadas están representadas en los órdenes Mesostigmata, Trombidiformes y Sarcop-
tiformes, según la clasificación de Krantz y Walter (2009). Los nuevos registros para la provincia se señalan con un asterisco (*), los nuevos registros para el país con dos asteriscos (**), los de mayor importancia económica con el signo más (+), los depredadores con el signo más duplicado (++), y triplicado (+++) para los ácaros de los productos almacenados. Las plantas hospedantes también están ordenadas alfabéticamente, con el nombre científico [Roig, 1965], nombre vulgar y el número correspondiente a cada especie interceptada. También se relacionan los productos almacenados y el número de la especie detectada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinaron 53 especies de ácaros agrupadas en 12 familias y 32 géneros, y se encontraron asociadas a 62 especies de plantas hospedantes y 10 productos almacenados (Tablas 1, 2 y 3).

Tabla 1. Listado de ácaros por familia y plantas hospedantes
Acaridae. Latreille, 1802

No.	Especies de ácaros	Hospedantes	Lugar y año de interceptación
1	<i>Acarus</i> sp.	<i>Allium sativum</i> Lin.	Manzanillo, 1991
2	<i>Acotyledon</i> sp.	<i>Allium cepa</i> Lin.	Manzanillo, 1982
		<i>Daucus carota</i> Lin.	Manzanillo, 1991
3 +++	<i>Aleuroglyphus</i> sp.	Barreduras de almacén	Pilón, 1980
4 * +++	<i>Aleuroglyphus ovatus</i> Troupen	Residual de casilla	Manzanillo, 2008
5	<i>Caloglyphus</i> sp.	<i>Capsicum annuum</i> Lin.	Bayamo, 1980
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Bayamo, 1983
			Manzanillo, 1992
			Campechuela, 1993
		<i>Allium sativum</i> Lin.	Niquero, 1990
			Niquero, 2002
			Manzanillo, 2004
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Vado del Yeso, 1990
		<i>Daucus carota</i> Lin.	Bayamo, 1990
6	<i>Rhizoglyphus echinopus</i> (Fumouze y Robin)	<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Manzanillo, 1984
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Manzanillo, 1988
			Campechuela, 1996
			Manzanillo, 2002
		<i>Allium shoenoprassum</i> Lin.	Manzanillo, 2004
		<i>Polianthes tuberosa</i> Lin.	Bayamo, 2004
		<i>Gladiolus communis</i> Lin.	Bayamo, 2004
7	<i>Rhizoglyphus robini</i> Claparede	<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Bayamo, 1981
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Manzanillo, 1983
			Manzanillo, 1991
		<i>Allium sativum</i> Lin.	Cauto Cristo, 2008
		<i>Carica papaya</i> Lin.	Bartolomé Masó, 1992

8 + + + +	<i>Rhizoglyphus setosus</i> Manson	<i>Phaseolus vulgaris</i> Lin.	Bayamo, 1980
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Niquero, 1980
			Bayamo, 1982
			Bayamo, 1983
			Pilón, 1985
			Campechuela, 1986
			Manzanillo, 2006
		<i>Allium sativum</i> Lin.	Bayamo, 1982
			Jiguaní, 1982
			Niquero, 1982
			Niquero, 1983
			Bayamo, 1983
			Bartolomé Masó, 1983
			Bayamo, 1984
			Bartolomé Masó, 1985
			Manzanillo, 1986
			Niquero, 1986
			Manzanillo, 1988
			Bayamo, 2000
			Campechuela, 2000
			Niquero, 2000
			Bartolomé Masó, 2000
			Bartolomé Masó, 2002
			Cauto Cristo, 2008
		<i>Polianthes tuberosa</i> Lin.	Bayamo, 1985
			Buey Arriba, 1991
			Bayamo, 1996
			Bayamo, 2004
			Bayamo, 2006
		<i>Gladiolus communis</i> Lin.	Bayamo, 1996
			Bayamo, 2004
			Manzanillo, 2004
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Bayamo, 1980
			Bayamo, 1981
			Bayamo, 1982
			Bayamo, 1985
			Manzanillo, 2004
			Veguita, 2004
		<i>Dahlia coccinea</i> Cav.	Bayamo, 1985
			Jiguaní, 2003
		<i>Capsicum annuum</i> Lin.	Bayamo, 1981
		<i>Carica papaya</i> Lin.	Niquero, 1981
		<i>Colocasia esculenta</i> Schott	Bayamo, 1987
			Bayamo, 1988
			Veguita, 1988
			Bartolomé Masó, 2002
			Yara, 2007
			Buey Arriba, 2007
			Guisa, 2008
			Buey Arriba, 2009
		<i>Solanum melongena</i> Lin.	Cauto Cristo, 1995
		<i>Cucumis sativus</i> Lin.	Manzanillo, 2004
			Manzanillo, 2009
		<i>Musa</i> sp.	Buey Arriba, 2007
		<i>Capsicum frutescens</i> Lin.	Manzanillo, 2004
		<i>Vinca rosea</i> Lin.	Dos Ríos, 1996
		Residual de casilla ferrocarril	Manzanillo, 2004
		Café decomisado (almacén)	Bayamo, 2008

9	<i>Rhizoglyphus tacitri</i> Manson	<i>Dioscorea alata</i> Lin.	Bayamo, 1990
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Bayamo, 1992
10 +	<i>Rhizoglyphus</i> sp.	Cactaceae	Bayamo, 1982
		<i>Allium sativum</i> Lin.	Campechuela, 1987
			Bayamo, 1987
		<i>Vitis vinifera</i> Lin.	Jiguaní, 1987
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Manzanillo, 1988
			Bayamo, 1989
			Manzanillo, 1990
			Ceiba Hueca, 1992
			Campechuela, 1993
			Manzanillo, 1997
			Manzanillo, 1998
		<i>Polianthes tuberosa</i> Lin.	Niquero, 1990
			Buey Arriba, 2002
		<i>Gladiolus communis</i> Lin.	Bayamo, 1992
		<i>Aloe barbadensis</i> Mill.	Bayamo, 1993
		<i>Lagerstroemia indica</i> Lin.	Bayamo, 1997
11	<i>Tyrophagus longior</i> Gerv.	<i>Capsicum annuum</i> Lin.	Río Cauto, 1997
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Manzanillo, 1997
		<i>Portullaca pilosa</i> Lin.	Veguita, 2004
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Media Luna, 1982
			Manzanillo, 1983
			Manzanillo, 1985
12 + + + +	<i>Tyrophagus putrescentiae</i> (Scharank)		Manzanillo, 2000
			Manzanillo, 2003
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Manzanillo, 1984
			Manzanillo, 1985
			Manzanillo, 1986
		<i>Citrus paradisi</i> Macf.	Manzanillo, 1982
13 + + +	<i>Tyrophagus</i> sp.	<i>Allium sativum</i> Lin.	Media Luna, 1982
			Bayamo, 2000
			Campechuela, 2000
		<i>Oryza sativa</i> Lin.	Manzanillo, 2006
		<i>Colocasia esculenta</i> Schott	Manzanillo, 2008
		Café pergamino (almacén)	Bartolomé Masó, 2007
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Manzanillo, 1983
			Manzanillo, 1984
			Manzanillo, 1987
			Manzanillo, 1988
			Manzanillo, 1989
			Pilón, 1989
			Manzanillo, 2006
		<i>Allium sativum</i> Lin.	Manzanillo, 1984
			Manzanillo, 1989
			Manzanillo, 1993
			Bayamo, 1995
			Manzanillo, 2004
			Manzanillo, 2005
			Manzanillo, 2006
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Campechuela, 1990
			Manzanillo, 1984
			Manzanillo, 1986
			Manzanillo, 1987
			Manzanillo, 1988
			Manzanillo, 1991
			Manzanillo, 1994
			Manzanillo, 2001
			Manzanillo, 2004

		<i>Veta vulgaris</i> Lin.	Manzanillo, 1989
			Manzanillo, 1991
			Manzanillo, 2002
		<i>Daucus carota</i> Lin.	Manzanillo, 1989
			Manzanillo, 2002
		<i>Polianthes tuberosa</i> Lin.	Bayamo, 2005
		Arroz en cáscara (almacén)	Campechuela, 1988
		Pienso	Bayamo, 2007
		Insectos muertos	Manzanillo, 2006
		Semillas de cedro	Bayamo, 2008

Cheyletidae Leach, 1814

14 ++	<i>Cheyletogenes</i> sp.	<i>Vitis vinifera</i> Lin.	Pilón 1980
		<i>Achras zapota</i> Lin.	Campechuela 1983
		Harina de soya	Manzanillo 1980
15 ++	<i>Cheyletus</i> sp.	<i>Citrus</i> sp.	Manzanillo 1988
		<i>Cocos nucifera</i> Lin.	Niquero 1991

Caligonellidae Grandjean, 1944

16 *** ++ +++	<i>Paraneognathus</i> sp.	Arroz en cáscara (silos)	Bartolomé Masó, 2009
------------------	---------------------------	--------------------------	----------------------

Eriophyidae Nalepa, 1898

17 +	<i>Aculops lycopersici</i> (Massee)	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Veguita, 1980
			Bayamo, 1980
			Veguita, 1981
			Bayamo, 1981
			Bayamo, 1982
			Ceiba Hueca, 1982
			Campechuela, 1983
			Manzanillo, 1985
			Bayamo, 1988
			Bayamo, 1990
			Yara, 1991
			Bayamo, 1992
			Veguita, 1995
			Bayamo, 2000
			Bayamo, 2002
			Bayamo, 2003
			Bayamo, 2004
			Cauto Cristo, 2005
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Bayamo, 1984
18 ***	<i>Aceria boycei</i> Keifer	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> Lin.	Bayamo, 1991
19	<i>Aceria guerreronis</i> Keifer	<i>Cocos nucifera</i> Lin.	Manzanillo, 1990
			Niquero, 1992
			Bayamo, 2009
			Pilón, 2002
20 *	<i>Aceria hibisci</i> Nalepa	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Lin.	Guisa, 2011
21	<i>Aceria sheldoni</i> (Ewing)	<i>Citrus</i> sp.	Jiguaní, 1992
22 +	<i>Aceria tulipae</i> Keifer	<i>Allium sativum</i> Lin.	Manzanillo, 1981
			Manzanillo, 1982
			Manzanillo, 1983
			Manzanillo, 1985
			Manzanillo, 1986
			Manzanillo, 2000

			Manzanillo, 2002
			Manzanillo, 2009
			Bayamo, 1982
			Bayamo, 1983
			Bayamo, 1987
			Bayamo, 1988
			Bayamo, 1991
			Bayamo, 1994
			Bayamo, 2001
			Veguita, 1988
			Veguita, 1990
			Veguita, 1992
			Guisa, 1984
			Guisa, 1990
			Cauto Cristo, 1983
			Bartolomé Masó, 1983
			Niquero, 1985
			Niquero, 1990
			Niquero, 1992
			Campechuela, 1987
23	<i>Eriophyes</i> sp.	<i>Allium cepa</i> Lin.	Manzanillo, 1984
			Campechuela, 2001
			Niquero, 2001
		<i>Hibiscus elatus</i> Lin.	Buey Arriba, 1988
			Buey Arriba, 1983
			Buey Arriba, 2000
			Guisa, 1990
24	<i>Phyllocoptura oleivora</i> (Ashmead)	<i>Ipomoea batatas</i> Lin.	Cauto Cristo, 1996
		<i>Solanum melongena</i> Lin.	Cauto Cristo, 1995
		<i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.	Campechuela, 1990
		<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Jiguaní, 1981
			Jiguaní, 1982
			Jiguaní, 1984
			Jiguaní, 1985
25	<i>Platyphytoptus multitermatus</i> Keifer		Jiguaní, 1991
			Jiguaní, 1992
			Jiguaní, 2001
			Jiguaní, 2003
			Manzanillo, 1984
		<i>Citrus limonus</i> Burm.	Bayamo, 2004
		<i>Pinus caribea</i> Morel	Guisa, 1984
26	<i>Tegonotus</i> sp.		Guisa, 1985
		<i>Psidium guajava</i> Lin.	Veguita, 1986
			Veguita, 2003

Histiostomatidae Berlese, 1897

27	<i>Histiostoma</i> sp.	<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	Bayamo, 1987
----	------------------------	--------------------------------------	--------------

Phytoseiidae Berlese, 1916

28 ++	<i>Amblyseius</i> sp.	<i>Vitis vinifera</i> Lin.	Pilón, 1980
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Bayamo, 1980
			Manzanillo, 1988
		<i>Carica papaya</i> Lin.	Campechuela, 1983

Pyemotidae Oudemans, 1931

29 ++	<i>Pyemotes ventricosus</i> (Newport)	<i>Oryza sativa</i> Lin.	Campechuela, 1988
			Manzanillo, 1988

Suidasiidae Hughes, 1948

30 *	<i>Suidasia medanensis</i> Oudemans	<i>Allium sativum</i> Lin.	Cauto Cristo, 2009
31	<i>Suidasia</i> sp.	<i>Allium sativum</i> Lin.	Campechuela, 1990

Tarsonemidae Kramer, 1877

32 +	<i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Banks)	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Jiguaní, 1980
			Jiguaní, 2002
			Bayamo, 1991
			Manzanillo, 2003
		<i>Capsicum annum</i> Lin.	Bayamo, 1990
			Bayamo, 1988
			Cautillo, 1996
			Jiguaní, 2000
			Campechuela, 1987
			Campechuela, 1988
			Ceiba Hueca, 1983
			Cauto Cristo, 1985
			Cauto Cristo, 1987
			Cauto Cristo, 1988
			Cauto Cristo, 2000
			Cauto Cristo, 2002
			Cauto Cristo, 2004
			Cauto Cristo, 2005
			La Pupa, 2007
		<i>Capsicum frutescens</i> Lin.	Jiguaní, 1989
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Vegueta, 1990
			Cautillo, 1991
			Cautillo, 1992
			Cautillo, 1994
			Bayamo, 1995
			Bayamo, 1996
			Bayamo, 1997
			Bayamo, 1998
			Manzanillo, 2004
		<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Bayamo, 1992
			Pilón, 1993
			Cauto Cristo, 2001
			Vegueta, 2001
			Cauto Cristo, 2004
			Cautillo, 2004
		<i>Nicotiana tabacum</i> Lin.	Bayamo, 1996
		<i>Solanum melongena</i> Lin.	Cauto Cristo, 2001
		<i>Ficus carica</i> Lin.	Bayamo, 2004
33 +	<i>Steneotarsonemus spinki</i> (Smiley)	<i>Oryza sativa</i> Lin.	Buey Arriba, 1998
			Buey Arriba, 2000
			Bartolomé, 1998
			Bartolomé, 2000
			Bartolomé, 2001
			Bartolomé, 2002
			Bartolomé Masó, 2003
			Río Cauto, 2000
			Río Cauto, 2001
			Río Cauto, 2002
			Río Cauto, 2003
			Vado del Yeso, 1998
			Vado del Yeso, 2000

			Vado del Yeso, 2001
			Vado del Yeso, 2002
			Vado del Yeso, 2003
			Yara, 2000
			Yara, 2001
			Yara, 2002
			Yara, 2003
			Veguita, 2000
			Veguita, 2001
			Veguita, 2002
			Veguita, 2003
			Manzanillo, 2000
			Manzanillo, 2001
			Manzanillo, 2002
			Manzanillo, 2003
			Bayamo, 2004
			Bayamo, 2005
34	<i>Tarsonemus</i> sp.	<i>Polianthes tuberosa</i> Lin.	Buey Arriba, 1980
		<i>Pyrus malus</i> Lin.	Manzanillo, 2009

Tenuipalpidae Berlese, 1913

35	<i>Brevipalpus californicus</i> (Banks)	<i>Rosa</i> sp.	Guisa, 1982
			Manzanillo, 2000
36 +	<i>Brevipalpus phoenicis</i> Geijskes	<i>Vitis vinifera</i> Lin.	Jiguaní, 1980
		<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Jiguaní, 1980
			Jiguaní, 1981
			Jiguaní, 1982
			Jiguaní, 1985
			Jiguaní, 2002
			Manzanillo, 1991
		<i>Psidium guajava</i> Lin.	Veguita, 1981
			Veguita, 1986
			Veguita, 1987
			Veguita, 2000
			Campechuela, 1982
			Campechuela, 2000
			Bayamo, 2003
		<i>Citrus lemons</i> Burm.	Ceiba Hueca, 1983
			Bayamo, 2004
		<i>Fragaria vesca</i> Lin.	Pilón, 1983
		<i>Theobroma cacao</i> Lin.	Buey Arriba, 1983
37	<i>Brevipalpus</i> sp.	<i>Rosa</i> sp.	Yara, 1991
		<i>Citrus paradise</i> Maca.	Bayamo, 1993
38	<i>Dolichotetranychus floridanus</i> Banks	<i>Ananas comosus</i> (Lin.) Merrill	Campechuela, 1981
39 * +	<i>Raoiella indica</i> Hirst.	<i>Cocos nucifera</i> Lin.	Bartolomé Masó, 2011
			Bayamo, 2011
			Veguita, 2011

Tetranychidae Donnadieu, 1876

40	<i>Eutetranychus banksi</i> (Mc Gregor)	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Jiguaní, 1980
			Jiguaní, 2002
			Jiguaní, 2003
			Bayamo, 1985
			Manzanillo, 1988
		<i>Ricinus communis</i> Lin.	Manzanillo, 1980
		<i>Carica papaya</i> Lin.	Río Cauto, 1980
41	<i>Eutetranychus</i> sp.	<i>Gerbera jamesonii</i> Hook	Bayamo, 2005

42	<i>Oligonychus</i> sp.	<i>Vitis vinifera</i> Lin.	Pilón, 1980		
			Pilón, 1981		
			Pilón, 1983		
			Pilón, 1985		
			Pilón, 2000		
			Pilón, 2003		
				<i>Hibiscus elatus</i> Lin.	Bayamo, 1980
		<i>Mangifera indica</i> Lin.	Campechuela, 1982		
			Campechuela, 2002		
43	<i>Oligonychus ununguis</i> (Jacobi)	<i>Pinus caribea</i> Morel	Bartolomé Masó, 1980		
44	<i>Mononychelus caribbeannae</i> Mc Gregor	<i>Manihot esculenta</i> Cranz.	Veguita, 1980		
			Veguita, 1981		
			Veguita, 1981		
			Veguita, 1983		
			Veguita, 1998		
			Yara, 1988		
			Yara, 2002		
			Ceiba Hueca, 1981		
			Ceiba Hueca, 1983		
			Ceiba Hueca, 1992		
			Campechuela, 1983		
			Campechuela, 2001		
			Cauto Cristo, 1981		
			Cauto Cristo, 1996		
			Cauto Cristo, 2003		
			Bayamo, 1984		
			Bayamo, 1986		
			Bayamo, 1996		
			Bayamo, 2001		
			Bayamo, 2003		
			Bayamo, 2004		
			Buey Arriba, 2002		
			Bartolomé Masó, 2001		
			Guisa, 1992		
			Guisa, 1993		
			Cautillo, 1992		
			Cautillo, 2000		
			Jiguaní, 2003		
			Río Cauto, 1990		
			Manzanillo, 2001		
			Manzanillo, 2002		
			Manzanillo, 2003		
			Manzanillo, 2008		
			Pilón, 2001		
			Pilón, 2003		
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Manzanillo, 1983		
45	<i>Schizotetranychus elymus</i> Mc Gregor	<i>Oryza sativa</i> Lin.	Vado del Yeso, 1982		
			Guisa, 1984		
			Bartolomé Masó, 2001		
			Buey Arriba, 2001		
46	<i>Schizotetranychus</i> sp.	<i>Pyrus malus</i> Lin.	Manzanillo, 1987		
		<i>Oryza sativa</i> Lin.	Niquero, 1990		
			Vado del Yeso, 1991		
			Vado del Yeso 1996		
				<i>Allium sativum</i> Lin.	Bayamo, 1991
					Niquero, 1994
					Buey Arriba, 1994
					Cauto Cristo, 1994
			Cauto Cristo, 1997		

47 +	<i>Tetranychus tumidus</i> Banks	<i>Musa paradisiaca</i> Lin.	Bayamo, 1980
			Bayamo, 1994
			Bayamo, 2000
			Bayamo, 2004
			Cauto Cristo, 2000
			Cauto Cristo, 2006
			Veguita, 2000
			Manzanillo, 1998
			Manzanillo, 2007
			Ceiba Hueca, 1983
			Niquero, 1983
		<i>Dahlia coccinea</i> Cav.	Buey Arriba, 1986
			Bayamo, 2003
		<i>Ricinus communis</i> Lin.	Buey Arriba, 2002
48	<i>Tetranychus mexicanus</i> Mc Gregor	<i>Amaranthus viridis</i> Lin.	Bayamo, 1980
		<i>Ipomoea batatas</i> (Lin.) Lam.	Bayamo, 1987
49 +	<i>Tetranychus</i> sp.	<i>Allium sativum</i> Lin.	Manzanillo, 1985
			Campechuela, 1987
			Ceiba Hueca, 1983
			Niquero, 1987
		<i>Allium cepa</i> Lin.	Bayamo, 1995
		<i>Cucumis sativus</i> Lin.	Bayamo, 1992
		<i>Pyrus malus</i> Lin.	Manzanillo, 1991
			Manzanillo, 1992
			Manzanillo, 2005
			Veguita, 1990
		<i>Phaseolus vulgaris</i> Lin.	Manzanillo, 1990
		<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Guisa, 1995
		<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Manzanillo, 1997
		<i>Oryza sativa</i> Lin.	Veguita, 1998
		Planta ornamental	Bartolomé Masó, 1998
		<i>Ficus carica</i> Lin.	Mabay, 2004
		<i>Solanum nigrum</i> Lin.	Bayamo, 2007
		<i>Columbrina ferruginosa</i> Brongn	Bartolomé Masó, 1986
50 +	<i>Tetranychus urticae</i> Koch	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Jiguaní, 1981
			Jiguaní, 1982
			Jiguaní, 2000
51	<i>Tetranychus desertorum</i> Banks	<i>Callistephus hortensis</i> Cass.	Bayamo, 1992

Tydeidae Kramer, 1877

52	<i>Tydeus</i> sp.	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Jiguaní, 1980
----	-------------------	-------------------------------	---------------

Suborden Oribatida

53	Sp. indeterminada	<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Bayamo, 1980
		<i>Cocos nucifera</i> Lin.	Niquero, 1991

Tabla 2. Listado de plantas por hospedantes

<i>Nombre científico</i>	<i>Nombre vulgar</i>	<i>Número de la especie interceptada</i>
<i>Achras zapota</i> Aut.	Mamey colorado	16
<i>Allium cepa</i> Lin.	Cebolla	3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 24, 52
<i>Allium sativum</i> Lin.	Ajo	2, 6, 8, 9, 12, 14, 15, 24, 32, 33, 49, 52
<i>Allium shoenoprasum</i> Lin.	Cebollino	7
<i>Aloe barbadensis</i> Mill.	Sábila	12
<i>Ambrosia artemisifolia</i> Lin.	Artemisa	20
<i>Amaranthus viridis</i> Lin.	Bledo	51
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merril	Piña	49
<i>Arecacia</i> sp.	Areca	51
<i>Cactus burbank</i>	Cactus	12
<i>Callistephus hortensis</i> Cass.	Extrañarrosa	54
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pimiento	6, 9, 12, 34
<i>Capsicum frutescens</i> L.	Ají	9, 34
<i>Carica papaya</i> Lin.	Frutabomba	8, 9, 40, 42
<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Naranja de China	26, 34, 38, 43, 53, 55
<i>Citrus lemons</i> Burm.	Limón	26, 38
<i>Citrus paradisi</i> Maca.	Toronja	14, 39
<i>Citrus</i> sp.	Cítrico	17, 23
<i>Cocos nucifera</i> L.	Coco	17, 21, 41, 50, 56
<i>Colocasia esculenta</i> Schott	Malanga	9, 14
<i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.	Uva caleta	25
<i>Columbrina ferruginosa</i> Brongn.	Bijáguara	52
<i>Cucumis sativus</i> Lin.	Pepino	9, 52
<i>Dahlia coccinea</i> Cav.	Dalia	9, 50
<i>Daucus carota</i> L.	Zanahoria	3, 6, 15
<i>Dioscorea alata</i> Lin.	Ñame	10
<i>Fragaria vesca</i> L.	Fresa	38
<i>Ficus carica</i> Lin.	Higo	34, 52
<i>Gladiolus communis</i> L.	Gladiolo	7, 9, 12
<i>Gerbera jamesonii</i> Hook	Margarita	43
<i>Hibiscus elatus</i> Lin.	Majagua	25, 44
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> Lin.	Marpacífico	22
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	Boniato	25, 52
<i>Ixora</i> sp.	Ixora	7
<i>Lagerstroemia indica</i> Lin.	Astronomía	12
<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	Tomate	19, 29, 34
<i>Mangifera indica</i> L.	Mango	44
<i>Manihot esculenta</i> Cranz.	Yuca	47, 52
<i>Musa paradisiaca</i> L.	Plátano	50
<i>Musa</i> sp.		9
<i>Nicotiana tabacum</i> Lin.	Tabaco	34
<i>Oryza sativa</i> L.	Arroz	14, 31, 35, 48, 49, 52
<i>Persea americana</i> Mill.	Aguacate	26
	Palmacea	52
<i>Phaseolus vulgaris</i> Lin.	Frijol	9, 52
<i>Pinus caribea</i> Morel	Pino macho	27, 46
<i>Polianthes tuberosa</i> L.	Azucena	7, 9, 12, 15, 36
<i>Portulaca pilosa</i> Lin.	Diez del día	12
<i>Psidium guajava</i> Lin.	Guayaba	28, 38
<i>Pyrus malus</i> Lin.	Manzana	36, 49, 52
<i>Rosa</i> sp.	Rosa	37, 39
<i>Ricinus comunis</i> L.	Higuereta	42, 50

<i>Solanum tuberosum</i> Sw.	Papa	6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 19, 30, 34, 47, 52, 56
<i>Solanum melongena</i> L.	Berenjena	9, 25, 34
<i>Solanum nigrum</i> L.	Yerba mora	52
<i>Tagetes erecta</i> L.	Flor de muerto	50
<i>Theobroma cacao</i> L.	Cacao	38
<i>Veta vulgaris</i> Lin.	Remolacha	15
<i>Vitis vinifera</i> Lin.	Uva	12, 16, 30, 38, 44
<i>Vinca rosea</i> Lin.	Vicaria	
<i>Zinnia elegans</i> Jack	Cajigal	50
	Planta ornamental	52

Tabla 3. Listado de productos almacenados asociados con ácaros

Productos	Número de la especie detectada
Arroz en cáscara (almacén)	15
Arroz almacenado (silos)	18
Barreduras de almacén	4
Café almacenado	9
Café pergamino	14
Insectos muertos	15
Harina de soya	16
Pienso	15
Semillas de cedro	15
Residual de casilla de ferrocarril	5, 9

De las especies listadas 50 son fitófagas, cuatro depredadoras, cuatro constituyen nuevos registros para la provincia Granma y dos para el país.

Por el resultado de la frecuencia de aparición, intensidad del daño causado y distribución, las especies de mayor importancia económica que constituyen o pueden constituir riesgo para las producciones agrícolas en la provincia son *Rhizoglyphus* spp., *Tyrophagus* spp., *A. lycopersici*, *A. tulipae*, *P. latus*, *S. spinki* y *T. tumidus*. Esto coincide con lo observado por Torre *et al.* (2005) en las provincias habaneras.

Entre las especies nuevas para la provincia se detectaron a *R. indica* y *A. hibisci*. La primera es cuarentenaria en Cuba con distribución restringida [Torre *et al.*, 2010] y la segunda se observó al provocar serios daños en la amapola o marpacífico, con síntomas similares a los descritos por Welbourn *et al.* (2008). Ambos diagnósticos se confirmaron en el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal.

En los productos almacenados se colectaron los ácaros plagas nuevos en el territorio *A. ovatus* y *S. medanensis*.

El primero es una especie que tiene una distribución mundial y se ha encontrado en salvado almacenado, trigo, harina de pollo y en productos de pescado secos [Silton *et al.*, 1992]. *S. medanensis* se ha identificado en muestras de polvo de las casas de diferentes áreas tropicales. Además se les encuentra como contaminante de arroz, trigo, avena, sémola, harina de pescado [Guillén *et al.*, 1997].

Como nuevo registro para Cuba se señala a *Paraneognathus* sp. (Caligonellidae), el cual estaba asociado a Psocopteros en un silo del municipio de Bartolomé Masó. Los ácaros de esta familia lo integran cinco géneros de pequeñas especies de constitución blanda y coloreada de rojo o naranja. Primariamente están asociadas con suelos secos, pero también pueden encontrarse en plantas, nidos de aves, entre otros [Krantz y Waltwer, 2009]. *Paraneognathus* es un género que se distingue por tener estilóforo alargado, peritrema ubicado en la base del estilóforo y escasamente proyectado hacia delante, dos solenidios situados en la parte basal del tarso del palpo, garra de la tibia del palpo desarrollada, ojos ausentes, la seda c2 ubicada hacia

fuera con respecto a la seda *sce*, escudo medio propodoomal ausente, tres pares de sedas anales, escudo coxisternal ausente, tres pares de sedas genitales y solenidio en la gena II presente [Fan, 2000].

Otra nueva especie para el país es *A. boycei* (Eriophyiidae), la cual se distingue por la ornamentación del escudo dorsal, micros tubérculos punteados y por tener cuatro filamentos en la garra plumosa de los tarsos. Se identificó por primera vez en California el 8 de agosto de 1940 sobre *Ambrosia psilostachya* D.C. [Keifer, 1943]. Este ácaro está considerado como agente de control biológico de malezas. Fue introducido en Rusia procedente de Estados Unidos para el control de *Ambrosia* spp. en 1971 y 1972 [Hoy, 2008].

Cook (1906) y Torre y Martínez (2004) mencionaron la presencia de *Eriophyes ambrosiae* Cook, 1906 sobre *Ambrosia* sp. en Cuba. Este eriófido fue una de varias especies que Cook propuso como nuevas para Cuba y la ciencia; sin embargo, e inexplicablemente Cook no describió taxonómicamente ninguna de sus taxas, por lo que es imposible saber actualmente cuál especie este autor quiso nombrar a la hallada en *Ambrosia* sp. Es probable que los daños observados por Cook correspondan a *A. boycei*.

Varios especialistas en el mundo han registrado diversos eriofioideos que hasta el momento suman 12 en *Ambrosia* spp. Dentro de este grupo figuran ocho especies de *Aceria* (género confundido con *Eriophyes* en muchas publicaciones) [De Lillo y Amrine, 2003]. Debido a esto, al hecho de no haberse observado hasta el momento el género *Eriophyes* en Cuba, y la no designación de holotipo ni de descripción como postula el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, se considera que la especie *E. ambrosiae* mencionada por Cook (1906) y Torre y Martínez (2004) no tiene validez.

Los montajes en láminas de las especies nuevas halladas se encuentran depositados en la colección de Acarología del Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal.

CONCLUSIONES

- Se informan 56 especies de ácaros interceptados en la provincia Granma desde 1980 hasta 2011, agrupados en 12 familias, y el suborden Oribatida en 62 especies de plantas hospedantes.
- Se informan a *A. ovatus*, *R. indica*, *S. medanensis* y *A. hibisci* como nuevos registros para la provincia.

- Las especies consideradas más importantes en la provincia son *Rhizoglyphus* spp., *Tyrophagus* spp., *A. lycopersici*, *A. tulipae*, *P. latus*, *S. spinki* y *T. tumidus*.
- *Paraneognatus* sp. (Caligonellidae) y *Aceria boycei* Keifer (Eriophyiidae) son detectados por primera vez en la provincia y el país.

REFERENCIAS

- Almaguel, Lérida: «Ácaros de importancia económica en Cuba», Boletín Técnico no. 2, Cidisan, Inisav, La Habana, 1996.
- Álvarez, L.; L. Alarcón: «Catálogo de ácaros fitófagos de la provincia de las Tunas», *Fitosanidad* 8 (1): 19-21, La Habana, 2004.
- Bong, A.; J. Viñals; P. de la Torre: «Catálogo de los fitoácaros de la Isla de la Juventud», *Fitosanidad* 12 (1): 3-7, La Habana, 2008.
- Bruner, S. C.; L. C. Scaramuzza; A. R. Otero: *Catálogo de los insectos que atacan a las plantas económicas de Cuba*, 2.ª ed., Academia de Ciencias, Cuba, 1975.
- Casas, G. C.; S. Lafargue: «Catálogo de ácaros de la provincia de Santiago de Cuba», *Fitosanidad* 13 (3): 155-162, La Habana, 2009.
- Cook, M. T.: «Algunas agallas de Cuba provocadas por insectos», Informe Anual 1, Estación Central Agronómica, Cuba, 1-251, 1906.
- Cuervo, N.; J. L. González; M. Reyes; H. Martínez: «Lista alfabética de las especies de ácaros de Cuba (Arachnida: Acari)», Instituto de Ecología y Sistemática y Laboratorio Central de Cuarentena, La Habana, 1994.
- De Lillo, E.; J. Amrine: *Catalog of the Eriophyoidea (Acari, Prostigmata) of the World*, version in Filemaker Pro 4.0, 2003.
- Domínguez, L.; A. Mateo: «Inventario de los ácaros presentes en la provincia de Holguín», *Fitosanidad* 12 (1): 9-14, La Habana, 2008.
- Fan, Q. H.: «A Phylogenetic Analysis of the Family Caligonellidae (Acari: Prostigmata) with Description of Two New Species», *Acta Entomológica Sinica* 43 (4): 421-428, China, 2000.
- Guillén, Z.; G. Romero; E. Pareja; M. Valencia; M. López; R. Suárez: «Ácaros astigmata y prostigmata de importancia médica en el Perú», *Anales de la Facultad de Medicina* 58 (2): s/p, Perú, 1997. Disponible en http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/anales/v58_n2/acaros.htm (consultado el 26 de abril de 2008).
- Hoy, M. A.: «Four-Legged Mites (Eriophyoidea or Tetrapodili)», *Encyclopedia of Entomology*. 2ª ed., Science + Business Media B. V. Univ. of Florida, Gainesville, EE. UU., 2008.
- Iraola, V.: «Introducción a los ácaros (II): Hábitat e importancia para el hombre», *Aranet 7-Bol. S.E.A.* (28): 141-146, 2001.
- Keifer, H. H.: «Eriophyid. Series XIII», *Bull. Calif. Dept. Agr.* 32: 212-222, EE. UU., 1943.
- Krantz, G. W.; D. E. Walter: *A Manual of Acarology*, 3ª ed., Tech. University Press, Texas, EE. UU., 2009.
- Martínez, A. Z.; P. de la Torre; S. García: «Principales ácaros detectados en la provincia de Villa Clara», *Fitosanidad* 8 (1): 3-17, La Habana, 2004.
- Pérez, R.; Lérida Almaguel: «Los ácaros fitófagos de Cuba y sus principales plantas hospedantes», Centro de Información y Documentación Agropecuaria, Inisav, La Habana, 1978.
- Ramos, A.; P. de la Torre: «Catálogo de ácaros de la provincia de Matanzas», *Fitosanidad*, 8 (4): 19-22, La Habana, 2004.

Catálogo de ácaros interceptados en la provincia de Granma

- Roig, J. T.: *Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos*, 2 t., Ed. Consejo Nacional de Universidades, La Habana, 1965.
- Santos, G. M.; E. Botta; E. A. Rivero: «Catálogo acarológico de la provincia de Sancti Spiritus», *Fitosanidad* 9 (2): 3-12, La Habana, 2005.
- Silton, R.; W. Trudeau; M. Swanson; R. Jockey: «Prevalence of Specific IgE to the Storage Mite, *Aleuroglyphus ovatus*», *J. Allergy Clin. Immunol.* 89 (5): 1062, EE. UU., 1992.
- Socarrás, A. Ana.; G. J. Palacios: *Ácaros productores de sarna en los vertebrados de interés económico de Cuba*, Ediciones Veterinarias del Consejo Científico Veterinario de Cuba, 1990.
- Torre, P. de la; H. Martínez: «Lista de los ácaros eriofioideos (Acari: Prostigmata: Eriophyoidea) de Cuba», *Revista Ibérica de Aracnología* 9: 123-126, España, 2004.
- Torre, P. de la: «Colectas acarológicas de Ciudad de La Habana registradas por la Sanidad Vegetal», *Fitosanidad* 9 (1): 3-8, La Habana, 2005.
- Torre, P. de la; E. Botta; L. Almaguel: «Colectas acarológicas realizadas por la Sanidad Vegetal en la provincia de La Habana», *Fitosanidad* 9 (3): 3-11, La Habana, 2005.
- Torre, P. de la; A. Suárez; A. González: «Presencia del ácaro *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) en Cuba», *Rev. Protección Veg.* 25 (1): 1-4, La Habana, 2010.
- Welbourn, C.; J. C. Rodrigues; J. E. Peña: «The Hibiscus Erineum Mite, *Aceria hibisci* (Acari: Eriophyidae) a New Introduction in the Caribbean and a Potential Threat to Florida's Hibiscus», Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN77700.pdf> (consultado en 2008).

INCIDENCIA DEL CARBÓN *SPORISORIUM SCITAMINEUM* (SYD.) M. PIEPENBR., M. STOLL AND OBERW. EN VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) EN LA PROVINCIA DE LAS TUNAS

Heriberto Domínguez Salazar,¹ Mérida L. Rodríguez Regal,² Alberto N. González Marrero,² Damián Fernández Cabreja² e Irene Pérez Ortiz³

¹ Filial del Centro Nacional de Capacitación Azucarera. Carretera Central Km 7½, Arroyo Muerto, Majibacoa, Las Tunas, Cuba, C.P. 79440, sdirdocente@cnca.lt.minaz.cu; profmetodologopa@cnca.lt.minaz.cu

² Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Carretera al CAI Martínez Prieto Km 2½, Boyeros, La Habana, C.P. 19390

³ Departamento de Suelo, Delegación Provincial de la Agricultura. Las Tunas, Cuba

RESUMEN

Se realizó un estudio para evaluar la incidencia del carbón *Sporisorium scitamineum* (Sydow) M. Piepenbr., M. Stoll & F. Oberw. en variedades de la caña de azúcar *Saccharum* spp. (híbrido), considerada una enfermedad reemergente y de primer orden en las áreas cañeras de la provincia de Las Tunas, para lo cual se hizo una comparación entre 2004 y 2009. Se empleó la metodología de investigación instituida por el servicio fitosanitario (Sefit), que consiste en trazar una diagonal imaginaria en el campo cañero y establecer seis estaciones (puntos) de muestreo, compuesta cada una por dos surcos de 10 m de largo (32 m²), en las que se cuantificó el total de tallos y plantones, número de tallos enfermos y cantidad de plantones de naturaleza herbácea. Se logró mejorar la composición varietal de la provincia de Las Tunas al cierre de 2009 con la introducción de nuevas variedades resistentes, principalmente C86-12, C90-469, C86-456, C86-502 y C90-530, y reducir el área plantada de variedades susceptibles y potencialmente susceptibles al agente etiológico de la enfermedad. Las pérdidas agrícolas producidas por el carbón en 2004 ascendieron a 164 148,74 t de caña; sin embargo, en 2009 descendieron a 11 132,78 t, por lo que se dejó de ingresar al presupuesto estatal \$3 567 607,84 y \$242 249,73, respectivamente, por concepto de azúcar dejada de producir.

Palabras claves: carbón de la caña, *Sporisorium scitamineum*, variedades, caña de azúcar

ABSTRACT

A study was realized to evaluate the incidence of smut *Sporisorium scitamineum* (Sydow) Piepenbr., Stoll and Oberw. in sugar cane *Saccharum* spp. (hybrid) varieties, considered a reemerging disease and first order in sugar cane areas of Las Tunas province; in this way a comparison between years 2004 and 2009 was done. The investigation methodology instituted by Phytosanitary Service (SEFIT) was employed, that it involves drawing an imaginary diagonal at the cane field and establishing six sampling stations (points); compound each by two furrows of 10 m length (32 m²), where were quantified total of stems and seedling plants, number of sick stems and the number of seedling plants with herbaceous nature. Varietal composition of Las Tunas province improve at the end of year 2009 with the introduction of new resistant varieties; principally C86-12, C90-469, C86-456, C86-502 and C90-530 and reducing the area planted with varieties susceptible and potentially susceptible to etiological agent. Agricultural losses due to smut in the year 2004 were higher than 164 148.74 tons of cane, however decreased to 11 132.78 in 2009; so the deficit in depositing to state budget was \$3 567 607.84 and \$242 249.73, respectively by the way of non produced sugar.

Key words: sugarcane smut, *Sporisorium scitamineum*, varieties, sugarcane

INTRODUCCIÓN

La obtención de nuevos genotipos de caña de azúcar mejorados es un proceso continuo en el tiempo, debido a la necesidad del reemplazo de las variedades ya existentes por otras mejor adaptadas y resistentes a las principales plagas que afectan el cultivo [Gálvez y Almeida, 2000; Jorge *et al.*, 2007].

En el cultivo de la caña de azúcar la incidencia de plagas es un factor de vital importancia, debido a que tienen una contribución considerable en las pérdidas tanto agrícolas como industriales que se producen en el proceso productivo [Chinea y Rodríguez, 1994].

Recibido: 10/3/2011

Aceptado: 14/4/2011

En el inventario mundial aparecen registradas unas 130 patologías que afectan al cultivo, producidas por diferentes microorganismos, trastornos ambientales, plantas parásitas, entre otras causas [Chinea, 2004].

En Cuba, hasta el presente se han informado 57 enfermedades, dentro de las cuales el carbón, la roya, el raquitismo de los retoños, la escaldadura foliar y el amarillamiento foliar resultan las más importantes por los daños y las pérdidas que ocasionan [Piñón *et al.*, 2002].

El carbón de la caña de azúcar afecta a un gran número de variedades, independientemente de su origen genético y geográfico. Durante los últimos años se descartan numerosas variedades comerciales y clones en diferentes fases del proceso de selección por susceptibilidad al carbón [Inica, 2008].

Con el desarrollo de la biotecnología y la aplicación de la ingeniería genética en la mejora de la caña de azúcar se abren nuevas perspectivas para la obtención de variedades resistentes en menor tiempo, y aumentar la eficiencia del mejoramiento tradicional con técnicas de marcadores moleculares [Borrás *et al.*, 2005; Arencibia *et al.*, 2006].

A mediano plazo el propósito es marchar hacia una agricultura cañera intensiva. Para ello se hace necesario seleccionar los suelos con mejores condiciones, aprovechar los recursos hidráulicos, aplicar nuevas tecnologías agrícolas, así como la plantación de variedades de probada resistencia a plagas [León y Ravelo, 2007].

El estudio consistió en un análisis para evaluar la incidencia de la enfermedad del carbón *Sporisorium scitamineum* (Sydow) M. Piepenbr., M. Stoll & F. Oberw. en variedades de la caña de azúcar en la provincia de Las Tunas, para lo cual se hizo una comparación entre 2004 y 2009.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la investigación se tomaron los datos de los muestreos realizados en áreas cañeras de la provincia de Las Tunas de 2004 y 2009 del servicio fitosanitario (Sefit) a las unidades productoras de caña [Inica, 2002].

Se muestreó la totalidad de los bloques cañeros. El método de muestreo consistió en trazar una diagonal imaginaria en el campo cañero, en la que se establecieron seis estaciones de muestreo compuestas por dos surcos de 10 m de largo (32 m²). En cada una de ellas se

cuantificó el total de tallos y plantones, número de tallos enfermos y cantidad de plantones de naturaleza herbácea. Los muestreos se desarrollaron entre los 15 días después de cosechado hasta los nueve meses de edad del cultivo.

Para conocer las variaciones del comportamiento del carbón se adoptaron como factores de estudio las localidades (empresas) y las variedades. Los datos se procesaron mediante el empleo de un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial.

Los datos obtenidos en las dos variables en estudio (porcentaje de tallos enfermos y de plantones herbáceos) se sometieron a prueba de homogeneidad de varianza y normalización de datos, premisas indispensables para realizar los análisis de varianza factoriales. En los casos necesarios se realizaron transformaciones de datos por medio del arcoseno $\sqrt{x+1}$.

Se empleó la prueba de Duncan con un nivel de significación de $p < 0,05$ como método de comparación múltiple de medias, para determinar las diferencias correspondientes a los factores estudiados, con la explotación del software InfoStat [Di Rienzo *et al.*, 2001].

Para realizar la valoración económica se tuvieron en cuenta las pérdidas agrícolas (toneladas de caña) que ocasionó la enfermedad en la provincia de Las Tunas en 2004 y 2009. Se hizo el cálculo de la cantidad de azúcar dejada de producir con un rendimiento industrial promedio de 10 (porcentaje de azúcar extraída por caña molida), y se procedió a calcular la cantidad de dinero dejado de ingresar al presupuesto estatal con un precio promedio del azúcar en el mercado mundial en los últimos años de \$0,10 la libra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto al comportamiento que tuvieron las variedades ante el carbón en 2004 (*Tabla 1*), se aprecia que existieron diferencias significativas en las variables tallos enfermos y plantones herbáceos entre las siete variedades que se explotaban comercialmente en esa etapa. Esto se debió a que existía el 18 % del área cañera plantada con la variedad C323-68. De igual forma hubo diferencias significativas entre las cinco localidades (empresas) en las variables estudiadas.

Debe señalarse que históricamente en la zona sur de la provincia de Las Tunas el carbón ha tenido una mayor incidencia debido a que las condiciones climáticas son

favorables; es decir, temperaturas que oscilan entre los 25 y 30 °C, y humedad relativa por encima del 85 %, son las óptimas para el desarrollo de la enfermedad [Bayer CropScience, 2009].

La variedad C323-68 fue evaluada de reacción intermedia en pruebas estatales de resistencia al carbón, y en condiciones naturales de alta presión de inóculo se compor-

tó como susceptible [González *et al.*, 2004]. Además, el 2 % del área estaba ocupada de la variedad Ja60-5, y el 7 % con la B63118, consideradas susceptibles, y potencialmente susceptibles al agente etiológico de la enfermedad; sin embargo, no hubo diferencias significativas en la interacción variedad por localidad para ambas variables.

Tabla 1 Comportamiento que tuvieron las variedades ante el carbón en 2004

Factor de variación	gl	Tallos enfermos				Plantones herbáceos			
		SC	CM	F	Sig.	SC	CM	F	Sig.
Variedad (A)	6	2,01	0,33	2,54	*	13,60	2,27	2,57	*
Localidad (B)	4	1,18	0,30	2,25	*	7,98	1,99	2,26	*
A X B	24	3,16	0,13	2,42	NS	21,15	0,88	2,45	NS
Error	34	6,35	0,19			42,72	1,26		

En la *Tabla 2* se presentan los resultados del análisis de varianza del comportamiento de las variedades ante el carbón en 2009. Se aprecia que no existieron diferencias significativas en las variables estudiadas entre las variedades en estudio, tampoco entre las localidades, de igual forma en la interacción de estas por localidades, a pesar de que la variedad C323-68 tuvo una reducción en el porcentaje de área cubierta por ella, a excepción de la empresa azucarera Colombia, que al cierre de 2009 aún contaban con el 31,6 % del área cañera plantada de esa variedad.

Resultados similares en cuanto al comportamiento ante el carbón de las variedades Ja60-5 y C323-68 obtuvieron Rodríguez y Contreras (1994), Guerra (2002) y Peña (2007).

El trabajo llevado a cabo con las variedades como un importante factor de manejo del cultivo de la caña de azúcar ha posibilitado sin duda mejorar la compo-

sición varietal actual, que al comparar 2004 con 2009 se aprecia un significativo avance en la introducción de nuevas variedades, las cuales han proporcionado una mayor fuente de resistencia que ha repercutido de manera positiva en la disminución de la incidencia de la enfermedad.

Actualmente se puede considerar al carbón como una enfermedad reemergente para la provincia de Las Tunas por la significativa disminución en la incidencia, debido a la introducción de nuevas variedades resistentes que ha posibilitado disminuir la presión de inóculo.

Se considera que debe fomentarse la plantación de variedades de ciclo largo tales como C87-51, C1051-73, C86-12, Co997 y C90-501, y de otras que se encuentran en proceso de introducción y desarrollo como B80250, C89-161, C89-176, C88-380, C86-156, C88-556, C88-381, C90-469 y B78505.

Tabla 2. Comportamiento de las variedades ante el carbón en 2009

Factor de variación	gl	Tallos enfermos				Plantones herbáceos			
		SC	CM	F	Sig.	SC	CM	F	Sig.
Variedad (A)	7	0,52	0,07	0,64	NS	13,65	1,95	1,39	NS
Localidad (B)	4	0,26	0,07	0,57	NS	6,36	1,59	1,13	NS
A X B	28	3,22	0,12	0,61	NS	59,33	1,40	1,30	NS
Error	39	4,0	0,10			59,33	1,52		

En la *Tabla 3* se presentan las pérdidas agrícolas (expresadas en t × ha⁻¹ de caña) ocasionadas por el carbón. En 2004 las mayores pérdidas ocurrieron en la empresa azucarera Colombia, las que ascendieron a 42 833,37 t de caña, con las que se pudo haber fabrica-

do 4 283,34 t de azúcar. Por tal motivo se dejó de ingresar al presupuesto del estado \$932 054,78.

En 2009 la situación fue diferente debido a que las pérdidas agrícolas bajaron significativamente. Esto se debió

en lo fundamental a que las mermas en el rendimiento producto a la incidencia del carbón fueron inferiores, aunque se mantuvieron en la empresa azucarera Colom-

bia las más elevadas, que estuvieron en el orden de las 3 787,90 t de caña. Por tal razón el monto dejado de ingresar al presupuesto rondó los \$35 679,87.

Tabla 3 Evaluación económica de las pérdidas producidas por el carbón en 2004 y 2009

Empresa	2004			2009		
	Tonelada de caña (pérdidas)	Azúcar ddp (t) (R/10)	Valor (\$)	Tonelada de caña (pérdidas)	Azúcar ddp (t) (R/10)	Valor (\$)
Jesús Menéndez	18 190,34	1 819,03	395 820,93	1 063,56	106,36	23 143,94
Antonio Guiteras	28 354,74	2 835,47	616 478,38	1 768,01	176,80	38 471,68
Majibacoa	33 834,67	3 383,47	736 243,10	1 639,68	163,97	35 679,87
Amancio Rodríguez	40 935,62	4 093,56	890 758,66	2 873,63	287,36	62 529,54
Colombia	42 833,37	4 283,34	932 054,78	3 787,90	378,79	82 424,70
Provincia	164 148,74	16 414,87	3567 607,84	11 132,78	1 113,28	242 249,73

ddp: Dejada de producir.

CONCLUSIONES

- Se logró mejorar la composición varietal de la provincia de Las Tunas al cierre de 2009 con la introducción de nuevas variedades resistentes, y la reducción del área plantada de variedades susceptibles y potencialmente susceptibles.
- Debe considerarse al carbón como una enfermedad de tipo reemergente para la provincia de Las Tunas por la significativa disminución en la incidencia en sus áreas cañeras.
- Las pérdidas agrícolas producidas por el carbón en la provincia de Las Tunas experimentaron una significativa disminución en 2009 con respecto a 2004.

REFERENCIAS

Arencibia, A.; Y. Estévez; F. Vinagre; A. Bernal; J. Pérez; E. Carmona; A. Hemerly; I. Santana: «Induced Resistance in Sugarcane Against Pathogenic Bacteria *Xanthomonas albilineans* Mediated by An Endophytic Interaction», Proc. Intern. Symp. on the Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries, dic. 5-8. Guilin. P. R., China, 2006, pp. 343-351. Bayer CropScience. *Ustilago scitaminea* Syd., <http://www.bayercropscience.com.pe/web/index.aspx> (consulta: 8/8/2009).

Borrás, O.; B. P. Thomma; E. Carmona; C. J. Borroto; M. Pujol; A. Arencibia; J. López: «Identification of Sugarcane Genes Induced in Disease-Resistant Somaclones Upon Inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*», *Plant Physiol. and Biochem.* 43: 1115-1121, EE. UU., 2005.

Chinea, A.; Eida Rodríguez: *Enfermedades de la caña de azúcar*, Publicaciones Imago, La Habana, 1994, pp. 22-24.

Chinea, A.: «Las enfermedades de la caña de azúcar en Cuba durante las últimas décadas», Jornadas Científicas por el 40 aniversario del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (Extraído del CD40 aniv/index.htm, La Habana, 2004).

Di Rienzo, J. A.; M. Balzarini; F. Casanoves; L. González; M. Tablada; W. Guzmán; W. Robledo: InfoStat. Software Estadístico. Versión 1, Ed. Trunfar, La Rioja. Córdoba, Argentina, 2001.

Gálvez, G.; R. Almeida: «Variedades de caña de azúcar, su obtención y manejo comercial», *Cañaveral* 5 (1): 14-17, La Habana, 2000.

González, R.; O. Carvajal; A. Chinea; G. Pérez: «Mejoramiento para la resistencia a enfermedades de la caña de azúcar en Cuba. Actualidad y perspectivas», Jornadas Científicas por el 40 aniversario del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, nov. 11-12, CD40aniv/index.htm, 2004.

Guerra, I.: «Comportamiento del carbón de la caña de azúcar en la provincia de Las Tunas», *Revista Protección Vegetal* 17 (3): 191, La Habana, 2002.

Inica: *Manual de procedimientos del Sefit*, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Ediciones Publinica, La Habana, 2002.

Inica: «Informe a la XVI Reunión Nacional de Variedades, Semillas y Sanidad Vegetal», Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar, La Habana, 2008.

Jorge, H.; H. García; N. Bernal; I. Jorge; A. Vera; O. Suárez: «Variedades de caña de azúcar en Cuba. Una nueva concepción y manejo», XXX Convención Nacional ATAM, Veracruz, 2007.

León, P.; R. Ravelo: *Fitotecnia general aplicada a las condiciones tropicales*, Ed. Félix Valera. La Habana, 2007, pp. 187-200.

Peña, M.: «Implementación de un servicio fitosanitario en la agricultura cañera de la provincia de Guantánamo», tesis en opción al título de Máster en Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Cuba, 2007.

Piñón, Dolores; R. de Armas; C. Vicente; María Elena Legaz: «Bases fisiopatológicas de la resistencia de la caña de azúcar al carbón», *Revista Protección Vegetal* 17 (3): 184, La Habana, 2002.

Rodríguez, J.; O. Contreras: «Efecto del carbón sobre las variedades comerciales de la caña de azúcar de la provincia de Holguín durante el período 1982-1992», IV Jornada Científica, Inica, La Habana, 1994.

SUPERVIVENCIA DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* EN SUELO Y TEJIDO DE PLANTAS DE BANANO EN URABÁ, COLOMBIA

Mónica Obregón Barrios,¹ Paola Andrea Rodríguez Gaviria² y Mauricio Salazar Yepes³

¹ Centro de Investigaciones del Banano. Augura, Medellín, Colombia

² Investigación y Desarrollo, Bayer CropsScience S.A., Carepa. Antioquia, Colombia

³ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, masalazay@unal.edu.co

RESUMEN

La enfermedad del moko –causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* Raza 2– es uno de los problemas fitopatológicos más limitantes en la producción de plátano y banano en Colombia. Las áreas afectadas por la bacteria exigen un riguroso control para evitar su diseminación, el cual incluye la erradicación de las plantas enfermas y aparentemente sanas en un radio de 5 m a la redonda. La determinación de la supervivencia de la bacteria en campo se realizó en muestras de suelo y tejido, tomadas cada quince días alrededor de la planta enferma tratada con herbicida. Para el aislamiento de la bacteria de suelo y tejido se utilizó el medio semiselectivo SMSA. Los aislamientos se sometieron a pruebas bioquímicas y de patogenicidad en plantas de banano cultivar Gran Enano. Bajo condiciones de campo las mayores poblaciones de la bacteria en suelo se encontraron a 1 m de distancia y a 10 cm de profundidad, y hasta ciento cincuenta días después del tratamiento, días de supervivencia que aumentan en el tejido vegetal afectado donde el patógeno puede sobrevivir hasta ciento noventa y cinco días.

Palabras claves: bacteriosis, *Ralstonia solanacearum*, supervivencia, cuarentena

ABSTRACT

Moko disease caused by the bacterium *Ralstonia solanacearum* race 2 is one of the most restraining phytosanitary problems to deal with banana and plantain production in Colombia. Infected areas must be carefully controlled to prevent dispersal. Control measures include eradication of both infected and apparently non-infected plant within a 5 meters radius around the infected plant treated with herbicide. Survival determination of this bacterium was carried in field conditions taking soil and tissue samples every 15 days around the infected plant. SMSA medium was used to isolate this bacterium, Isolates were screened by biochemical and pathogenicity test in banana plants Grand Naine cultivar. Under field conditions larger bacterial populations in soil were found at a distance of 1 meter away and 10 centimeters deep from the infected plant and up to 150 days after the treatment. Survival was increased in infected plant tissues where the pathogen could be recovered after 195 days.

Key words: bacteriosis, *Ralstonia solanacearum*, survival, quarantine

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del moko –causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Raza 2– es la enfermedad de origen bacterial más importante en cultivos de plátano y banano, distribuida ampliamente en las regiones productoras. La importancia de la bacteria en los cultivos de musáceas radica en su exigente y riguroso control (cuarentena), altos costos de mantenimiento y recuperación de áreas perdidas por la destrucción de las plantas enfermas y asintomáticas y fácil diseminación.

En la zona bananera de Urabá por cada planta enferma se deben destruir en promedio nueve plantas aparentemente sanas, y tratarlas con una solución de glifosato al 20 % [Morales y Castañeda, 2001; Castañeda y Espinosa, 2005]. Las plantas afectadas, así como todas las que conforman la unidad productiva, pierden el total de su producción, y se incrementan las pérdidas por costos de mantenimiento en áreas afectadas (cuarentena) y el establecimiento de resiembra [Belalcázar y Merchán, 1991].

La bacteria cuenta con un amplio rango de hospedantes, más de doscientas especies entre cultivos y arvenses en más de cincuenta familias botánicas [Obregón *et al.*, 2008; Núñez *et al.*, 2002; Genin y Boucher, 2002; Schell, 2000; Hayward, 1985, 1991; Granada y Sequeira, 1983a]. De acuerdo con el rango de hospedantes se ha clasificado en cinco razas [Buddenhagen *et al.*, 1962; Aragaki y Quinon, 1965; He *et al.*, 1983], y estas se han dividido en biovares determinados por algunas propiedades bioquímicas y fisiológicas [Hayward, 1964; French, 1985; He *et al.*, 1983]. Ha sido reclasificada en cuatro grupos genéticos correspondientes a diferentes orígenes geográficos, clasificación jerárquica basada en cuatro niveles equivalentes a especie, subespecie (filotipos), grupos infrasubespecíficos (sequevares) y líneas clonales, por lo que se considera como un patógeno muy diverso genéticamente [Fegan y Prior, 2005].

La bacteria causante del moko, como la mayoría de las bacterias fitopatógenas, se desarrolla principalmente en el hospedante como parásito, y parcialmente como saprófito en desechos vegetales o en el suelo. Esta bacteria es habitante del suelo; pero sus poblaciones se reducen lentamente de acuerdo con las condiciones ecológicas de la zona, con capacidad de sobrevivir en la rizosfera y en el rizoplano al aprovechar las secreciones de las plantas hospedantes [Martins, 2002], por lo que las infecciones latentes en suelo son potencialmente importantes en la permanencia y diseminación del patógeno [Denny y Hayward, 2001].

Sequeira (1962) estudió el efecto del barbecho sobre la supervivencia de la bacteria, y determinó que dieciocho meses después de establecida una nueva siembra se presentaron plantas con síntomas de la enfermedad. Por otro lado, Belalcázar y Reyes (1972) encontraron que en suelos mantenidos sin ningún tipo de vegetación la bacteria no sobrevive por más de seis meses. En suelos naturalmente infestados la bacteria se recupera entre los 15 y 75 cm de profundidad, lo que indica su supervivencia por largos períodos en capas profundas del suelo, y se favorece posiblemente por la alta humedad al incrementar tanto su supervivencia como la cantidad de inóculo [Graham y Lloyd, 1979].

Granada y Sequeira (1983a) afirman que la bacteria sobrevive en el suelo por varios años, y que las poblaciones solo se pueden reducir con la rotación de cultivos que no sean susceptibles. Las poblaciones de la bacteria en el suelo pueden declinar progresivamente a través del tiempo en dependencia de muchos factores

ambientales y agroecológicos, y llegar a un nivel indetectable [Coutinho, 2005]; sin embargo, existen reportes que indican que la bacteria en algunos campos puede sobrevivir por períodos entre diez y doce meses al adaptarse a diferentes condiciones edafoclimáticas del trópico y subtrópico, favorecida por algunas condiciones del medio como es la humedad en el suelo y la presencia de arvenses [Belalcázar *et al.*, 2004; Van Elsas *et al.*, 2000]. La interacción que desarrolla el patógeno con hospedantes alternos favorece la persistencia, el incremento de las poblaciones bacterianas y la supervivencia por largos períodos aun en ausencia de las plantas cultivadas.

El objetivo principal de esta investigación ha sido contribuir al conocimiento de la enfermedad, al precisar algunos aspectos epidemiológicos de la supervivencia de la bacteria causante del moko en suelo y tejidos vegetales de banano, bajo condiciones de campo en la zona de Urabá, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la supervivencia de la bacteria en suelo y tejido bajo condiciones de campo

Los ensayos de supervivencia de la bacteria en campo se realizaron en tres fincas de la zona bananera de Urabá, con características diferenciales de precipitación, tipo de suelo, manejo agronómico y distribución geográfica. La finca El Guineo, localizada en la zona norte, en el corregimiento de Nueva Colonia, presenta una precipitación promedio anual de 2513 mm, suelo con pH entre 5 y 5,3, y textura franco arenosa. En la zona centro se seleccionó la finca El Rincón, con una precipitación promedio anual de 2871 mm, pH inferior a 5,2 y textura franco arcillosa; y en la zona sur la finca Girasoles, que presenta una precipitación anual de 3305 mm y es la más alta del eje bananero, textura franco arcillosa y con pH que tiende a la acidificación. En todo el eje bananero el promedio anual de humedad relativa es del 87 %, la temperatura de 28 °C y la radiación es de 5 h/día [Ideam, 2006]. En cada finca se seleccionaron tres focos recientes, y posterior al tratamiento de las plantas con herbicida en un radio de 5 m (tratamiento de la enfermedad descrito y recomendado en la zona) se realizaron los respectivos muestreos de tejido y suelo.

Muestreo de tejido vegetal

Para el aislamiento de la bacteria de tejido de plantas enfermas se tomaron porciones de tejido afectado, se

desinfectó superficialmente con hipoclorito de sodio al 4 % y alcohol al 70 %, y luego se lavó con agua destilada estéril. Se cortaron trozos para extraer el fluido de los haces vasculares y se sembró en medio SMSA modificado [Granada y Sequeira, 1983b; Denny y Hayward, 2001; Kelman, 1954], y se incubaron las placas de Petri a 30 °C por 48 h, tiempo durante el cual se seleccionaron las colonias típicas de color vino tinto con presencia de un halo claro, ligeramente fluido y centro rosado. Este procedimiento se realizó hasta obtener colonias individuales y purificadas. Las cepas aisladas fueron evaluadas por su respuesta a características bioquímicas y fisiológicas, tales como coloración de Gram, KOH al 3 %, oxidasa, catalasa, reducción de nitrato, crecimiento a 41 °C y tolerancia a sales (crecimiento en NaCl al 1, 2 y 3 %), y pruebas determinantes para la selección de cepas de *R. solanacearum* [French y Teddy, 1982; Denny y Hayward, 2001; Schaad *et al.*, 2001]. Estas colonias se conservaron en medio líquido semiselectivo SMSA más glicerol (relación 70:30) y se guardaron en nevera a -20 °C.

Muestreo de suelo

Se tomaron seis muestras de suelo por cada foco de la enfermedad, cada una conformada por tres submuestras dentro de un radio de 5 m. Las muestras se tomaron quincenalmente durante nueve meses. Se monitoreó a partir de la planta afectada en un radio de 0; 1; 2,5 y 5 m, y a profundidades de 0-10, 30 y 50 cm. Para el aislamiento de la bacteria se tomaron 10 g de suelo, los cuales se suspendieron en 100 mL de *buffer* fosfato de potasio (pH 7,0) estéril [Bashan *et al.*, 1993; Dandurand y Knudsen, 2002; Ramírez, 2005]. Cada muestra se dejó en agitación durante 30 min, y de esta suspensión se prepararon diluciones seriadas 1:10 y se tomaron 200 µL de las diluciones 10^{-4} - 10^{-8} que se esparcieron en placas de Petri con medio sólido SMSA. Se hicieron tres repeticiones por cada dilución, se incubaron por 24-72 h a una temperatura de 30 °C y se realizaron los respectivos recuentos ($\text{ufc} \times 10 \text{ g}^{-1}$ de suelo). Este procedimiento se realizó para cada muestra de suelo por duplicado.

Para el análisis espacial de la población de la bacteria en el suelo se tuvo en cuenta el promedio de la población bacteriana entre fincas y entre focos, se analizó la población encontrada con respecto a la distancia de la planta afectada y las profundidades evaluadas, además de la relación existente entre la precipitación de la zona, la textura del suelo, el porcentaje de materia orgánica y la supervivencia del patógeno. La textura y el porcentaje de materia orgánica del suelo se obtuvieron mediante análisis

de suelo en el laboratorio de química y física de suelos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. El análisis espacial y temporal de la población bacteriana y su relación con las otras variables evaluadas se hizo a través de un diseño de modelos mixtos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia de la bacteria bajo condiciones de campo

Supervivencia en tejido vegetal

Las cepas aisladas de los tejidos de plantas afectadas en el campo correspondieron a colonias con características típicas de la bacteria en medio semiselectivo SMSA, las cuales presentan color vino tinto, con borde o halo dorado bien definido y ligeramente fluidas [Kelman, 1954; French y Sequeira, 1970; Granada y Sequeira, 1983b].

En la *Tabla 1* se presentan los resultados de todas las pruebas bioquímicas y fisiológicas evaluadas para cada una de las cepas, y que corresponden a las características del grupo de *R. solanacearum*.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas y fisiológicas evaluadas en cepas de *Ralstonia solanacearum*

Prueba	Reacción
Tinción de Gram	Gram-negativa
Test de hidróxido de K (KOH 3 %)	Positivo
Catalasa	Positiva
Oxidasa	Positiva
Reacción de nitrato	Positiva
Tolerancia a sales al 1 y al 2 %	Positivo
Tolerancia a sales al 3%	Negativa
Crecimiento a 37 °C	Positivo
Crecimiento a 41 °C	Negativo

Los resultados de la presencia de la bacteria en tejido de plantas infectadas, después de la aplicación del tratamiento con herbicida en campo en la finca El Guineo, muestran la presencia de la bacteria en tejido vegetal hasta ciento cinco días después del tratamiento con herbicida en dos de los tres focos evaluados. En la finca El Rincón se detectó hasta los ciento sesenta y cinco días en un foco, y en la finca Girasoles se logró detectar la bacteria hasta los ciento noventa y cinco días después del tratamiento (*Tabla 2*). Esto indica que el patógeno puede mantenerse en el tejido vegetal por largos períodos en algunos focos (más de seis meses en campo), aun después del tratamiento con el herbicida, y que esta supervivencia se relaciona con el manejo que cada finca le proporcione en particular al material afectado.

Tabla 2. Evaluación en días de la presencia de *R. solanacearum* en el tejido de plantas de banano después del tratamiento (ddt) erradicante en tres fincas bananeras en Urabá, Colombia

Finca	Número de foco	Presencia en tejido vegetal (ddt)
El Guineo	1	105
	2	90
	3	105
El Rincón	1	105
	2	105
	3	135
Girasoles	1	165
	2	180
	3	195

La recomendación para el tratamiento de los focos de la enfermedad se basa en la erradicación de las plantas enfermas a través de la inyección de herbicida sistémico al 20 % del producto comercial con excelentes resulta-

dos, siempre y cuando se limiten los rebrotes y la presencia de tejido vivo que permita la supervivencia del patógeno [Granada 1997, 2003; Morales y Castañeda, 2001; Augura 2007]. Los resultados generados por esta investigación indican que en algunos casos, según sea el tratamiento, es necesario recurrir a nuevas inyecciones de herbicida para lograr la descomposición total de los tejidos con el fin de limitar la permanencia de la bacteria en el tejido de plantas y evitar su dispersión.

Supervivencia de la bacteria en suelo

En las tres fincas evaluadas el patrón de distribución de la bacteria presentó el mismo comportamiento. Las mayores poblaciones de la bacteria se encontraron a un metro de la planta afectada y a profundidades de 0-10 cm (Fig. 1A y B). Se observó que las poblaciones de la bacteria se reducen a medida que aumenta la distancia desde la planta afectada y la profundidad del suelo, posiblemente por la mayor cantidad de residuos de plantas que se encuentran en la parte superficial del suelo, muy cerca y alrededor de la planta enferma.

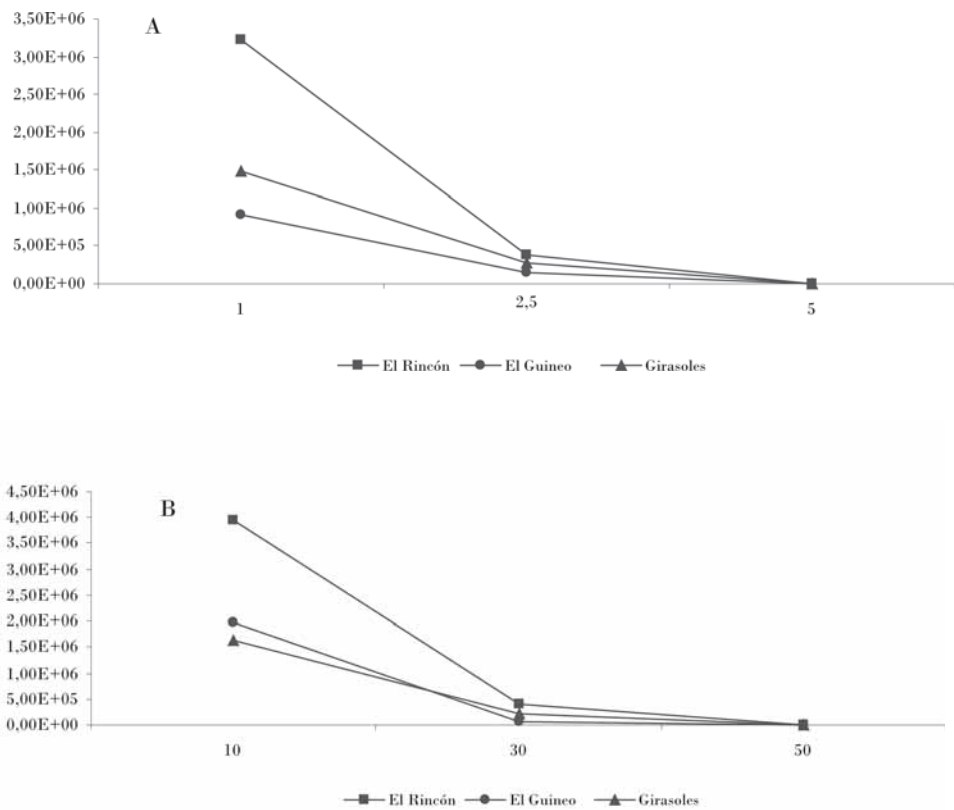


*Figura 1. Distribución radial (A) y vertical (B) de las poblaciones de *R. solanacearum* (ufc) en el suelo alrededor de plantas de banano afectadas por moko en tres fincas de la zona de Urabá, Colombia.*

Las poblaciones de la bacteria en suelo disminuyeron progresivamente en el tiempo después del tratamiento de la planta afectada. Se encontraron las mínimas cantidades entre los ciento veinte y ciento cincuenta días de muestreo (Fig. 2). Se determinó que la finca El Rincón es la que presenta mayores poblaciones y una disminución más lenta en el tiempo después del tratamiento, con diferencias estadísticamente significativas a las de

las otras dos fincas evaluadas y relacionadas con el manejo de la enfermedad. En las tres fincas evaluadas no se encontró ninguna relación de la población de la bacteria con el porcentaje de materia orgánica en el suelo, la textura y la precipitación. Estos resultados parecen indicar una relación directa con la cantidad de inóculo presente en las arvenses asintomáticas y en el material vegetal en descomposición alrededor de las plantas afectadas.

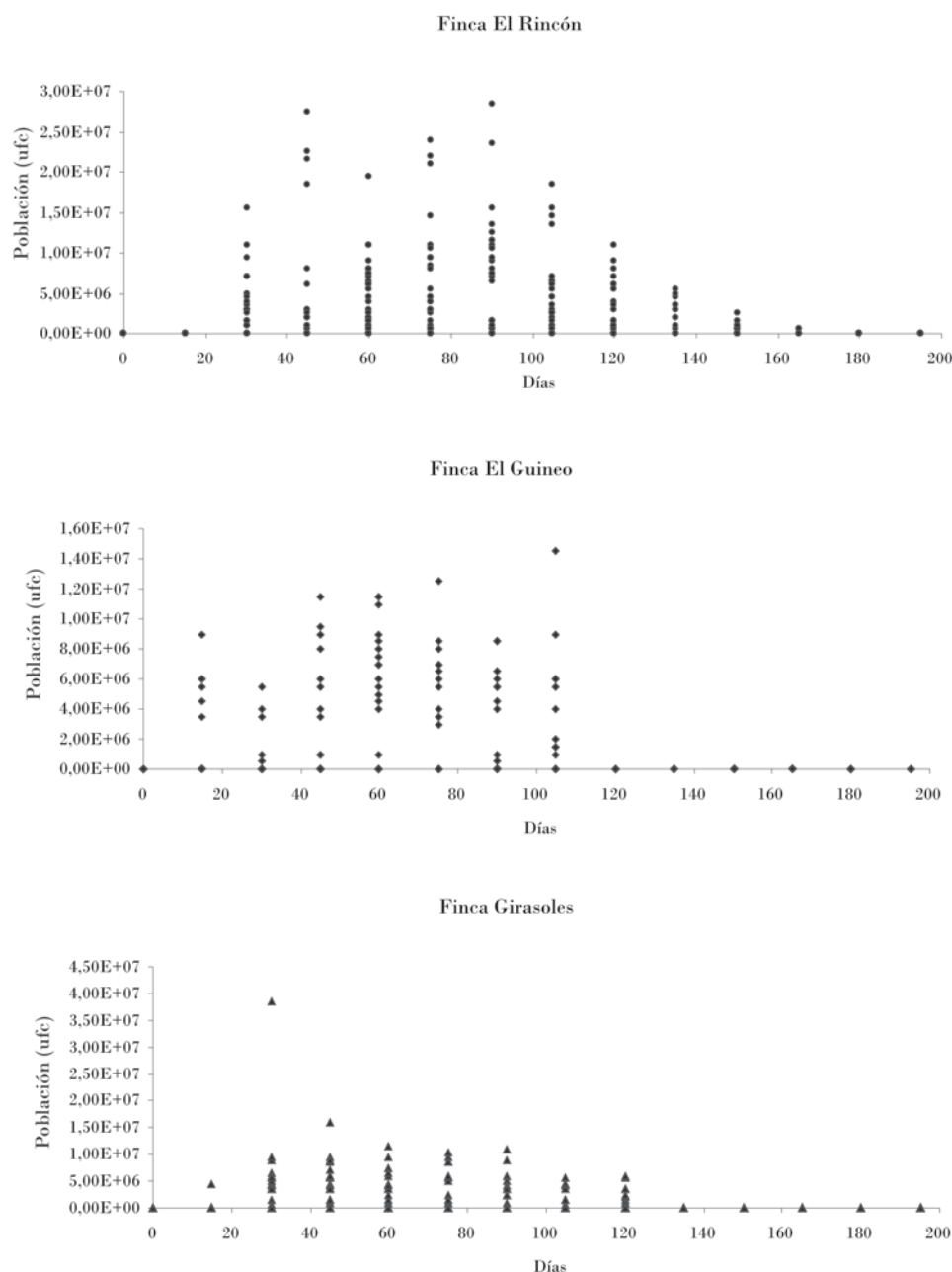


Figura 2. Distribución poblacional de la bacteria en el suelo después del tratamiento de la planta afectada en tres fincas bananeras en Urabá, Colombia.

Con respecto a la supervivencia de la bacteria en suelo, Sequeira (1962) reportó la supervivencia en condiciones de campo con presencia de arvenses hasta por veinticuatro meses; mientras, Van Elsas *et al.* (2000) afirman que la bacteria en algunos campos puede sobrevivir por períodos entre diez y doce meses, ya que se adapta a diferentes condiciones edafoclimáticas del trópico y subtrópico. De esta manera debe tenerse en cuenta que la bacteria puede sobrevivir por largos períodos en desechos de plantas hospederas o vivir en partes de plantas presentes en las capas profundas del suelo [Graham y Lloyd, 1979; Granada y Sequeira, 1983a]. Belalcazar y Reyes (1972) reportaron que la bacteria no sobrevive por más de seis meses en suelos sin ningún tipo de vegetación. Estos datos concuerdan con los resultados encontrados en las fincas evaluadas en la zona de Urabá; por lo tanto, la eliminación de arvenses dentro de un foco es parte fundamental de las estrategias para control de la enfermedad.

En estudios sobre el comportamiento de esta bacteria bajo condiciones de la zona cafetera se encontró que pudo sobrevivir por más de seis meses en el suelo y en el tejido afectado, y requerirse de una cuarentena mayor a ese tiempo para la resiembra de nuevas plantas [Granada, 1996]. La bacteria puede sobrevivir en la rizosfera y en el rizoplaneo al aprovechar las secreciones de las plantas hospedantes. De esta manera podría sobrevivir en el suelo el tiempo que persisten tales tejidos en el proceso de degradación, por lo que es indispensable erradicar el material vegetal en el menor tiempo posible. La alta humedad del suelo y las bajas temperaturas favorecen la supervivencia de la bacteria [Hayward, 1991]. Este autor sugiere que la persistencia del organismo se puede dar en las capas más profundas del suelo. Además, el patógeno puede sobrevivir en residuos de plantas y en la rizosfera de cultivos susceptibles y muchas arvenses.

En áreas afectadas por la enfermedad debe iniciarse el proceso de control mediante la erradicación de la plantas y continuarlo con el período de cuarentena obligado. La resiembra de nuevas plantas dependerá del adecuado manejo del inóculo, ya que se ha demostrado su capacidad de supervivencia en el suelo, en arvenses asociadas y también en el tejido de las plantas afectadas.

CONCLUSIONES

- Las poblaciones de la bacteria se reducen a medida que aumenta la distancia desde la planta afectada y

la profundidad del suelo. Las mayores poblaciones de la bacteria se encontraron hasta un metro de la planta afectada y a profundidades de 0-10 cm.

- El patógeno puede mantenerse en el tejido vegetal hasta ciento noventa y cinco días después del tratamiento con el herbicida (más de seis meses en campo). En algunos casos es necesario una nueva inyección del herbicida.
- Esta supervivencia se relaciona con el manejo que cada finca le proporcione en particular al material afectado.
- Se estableció en la región un período de cuarentena mínimo de seis meses en lotes con la enfermedad a fin de limitar la permanencia de la bacteria en el tejido de plantas y evitar su dispersión.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó con la cofinanciación del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, Colciencias, la Asociación de Bananeros de Colombia Augura y la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

- Aragaki, M.; V. L. Quinon: «Bacterial Wilt of Ornamental Gingers (*Hedychium* spp.) Caused by *Pseudomonas solanacearum*», *Plant Disease Reporter* 49: 378-379, EE. UU., 1965.
- Augura: «Guía para el reconocimiento y control de moko en plátano y banano», *Augura Plegable informativo*, Colombia, 2007.
- Bashan, Y.; G. Holguin; R. Lifshitz: «Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria», *Methods In Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press. Inc., EE. UU., 1993, pp. 331-345.
- Belalcazar, S.; A. Reyes: «Determinación de la supervivencia de *Pseudomonas solanacearum* bajo condiciones de campo», *Memorias 2.ª Reunión de Fitopatología y Sanidad Vegetal*, Ibagué, Colombia, 17-19 de julio, 1972.
- Belalcazar, S.; V. Merchan: «El cultivo del plátano (*Musa AAB Simonds*) en el trópico», *Manual de asistencia técnica no. 50*, Aciid, Cap. VI. «Control de enfermedades», pp. 243-290, Comité Departamental de Cafeteros del Quindío, Inibap, Armenia, Colombia, 1991.
- Belalcazar, S.; F. Rosales; L. Pocasangre: «El moko del plátano y banano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología», XVI Reunión Internacional Acorbat, Publicación especial Oxaca, México, 2004, pp. 16-35.
- Buddenhagen, I.; L. Sequeira; A. Kelman: «Designation of Races of *Pseudomonas solanacearum*», *Phytopathology* 52: 726, EE. UU., 1962.
- Castañeda, D.; J. A. Espinosa: «Comportamiento e impacto de la enfermedad de moko en la zona de Colombia en las últimas tres décadas y media, y propuesta de un índice de riesgo de la enfermedad», *Rev. Fac. Nac. Agr. Medellín* 58 (1): 2587-2599, Colombia, 2005.
- Coutinho, T. A.: «Introduction and Prospectus on the Survival of *R. solanacearum*», *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum species complex*, APS Press, St. Paul, MN, EE.UU., 2005, pp. 29-38.

- Dandurand, L. M. C.; G. R. Knudsen: «Sampling Microbes from the Rhizosphere and Phyllosphere», *Manual of Environmental Microbiology*, 2nd ed., Hurst, ASM Press, Washington D.C., EE. UU., 2002, pp. 516-526.
- Denny, T. P.; A. C. Hayward: «Gram Negative Bacteria. *Ralstonia*», *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd ed., APS Press, St. Paul, MN, EE. UU., 2001, pp. 151-174.
- Fegan, M.; P. Prior: «How Complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex?», *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum species complex*, APS Press, St. Paul, MN, EE. UU., 2005, pp. 449-461.
- French, E. R.; L. Sequeira: «Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America: A Comparative Study», *Phytopathology* 60: 506-512, EE. UU., 1970.
- French, E. R.; H. Teddy: *Métodos de investigación fitopatológica*, Instituto Interamericano de Ciencia Agrícola, San José, Costa Rica, 1982.
- French, E. R.: «Interaction Between Strains of *Ralstonia solanacearum*, its Hosts and the Environment», *Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific*, Aciar Proceedings no. 13, Centro Internacional de la Papa, Sec. 10-97, Perú, 1985, pp. 99-104.
- Genin, S.; C. Boucher: «*Ralstonia solanacearum*: Secrets of a Major Pathogen Unveiled by Analysis of its Genome», *Molecular Plant Pathology* 3 (3): 111-118, Inglaterra, 2002.
- Graham, J.; A. Lloyd: «Survival of Potato Strain (Raza 3) de *Ralstonia solanacearum* in the Deeper Soil Layers», *Australian Journal of Agricultural Research* 30 (3): 489-496, Australia, 1979.
- Granada, G. A.; L. Sequeira: «Survival of *Pseudomonas solanacearum* in Soil, Rhizosphere, and Plant Roots», *Can. J. Microbiol.* 29 (4): 433-440, Canadá, 1983a.
- Granada, G. A.; L. Sequeira: «A New Selective Medium for *Pseudomonas solanacearum*», *Plant Disease* 67 (10): 1084-1087, EE. UU., 1983b.
- Granada, G. A.: «Supervivencia de *Pseudomonas solanacearum* Raza 2, bajo condiciones de zona platanera del Quindío», *Tecnología del eje cafetero para la siembra y explotación rentable del cultivo del plátano*, Comité Departamental de Cafeteros del Quindío, Tercer informe técnico, 1994-1996, Regional 9, Corpoica, Armenia, Colombia, 1996, pp. 95 y 96.
- Granada, G. A.: «Moko del plátano y banano en Colombia», *Bananos y plátanos con el mejor entorno ambiental*, Cominpu, Colombia, 1997, pp. 39-43.
- Granada, G. A.: «Manejo integrado del moko (*Ralstonia solanacearum* Raza 2) en cultivos de banano y plátano», *Boletín técnico Cenibanano-Augura*, Boletín 2: 9-13, Colombia, 2003.
- Hayward, A. C.: «Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*», *Journal of Applied Bacteriology* 27 (2): 265-277, Inglaterra, 1964.
- Hayward, A. C.: «Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum* in Asia and Australia: An Overview», *Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific*, Australian Centre for International Agricultural Research Los Baños, Australia, 1985, pp. 15-24.
- Hayward, A. C.: «Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*», *Annual Review Phytopathology* 29: 65-67, EE. UU., 1991.
- He, L.; L. Sequeira; A. Kelman: «Characteristics of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from China», *Plant Disease* 67 (12): 1357-1361, EE. UU., 1983.
- Ideam: «Instituto de estudios de hidrología, meteorología y estudios ambientales, 2006», <http://institucional.ideam.gov.co/> (consultado: dic./2010).
- Kelman, A.: «The Relationship of Pathogenicity in *P. solanacearum* to Colony Appearance on a Tetrazolium Medium», *Phytopathology* 44: 693-695, EE. UU., 1954.
- Martins, J. M.: «Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 de Batata e Berinjela», tesis de grado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
- Morales, J. G.; D. Castañeda: «*Ralstonia solanacearum*, otro nombre para *Pseudomonas solanacearum*, el agente causal del moko», *Augura-Carta informativa*, Boletín 211: 4-6, Colombia, 2001.
- Núñez, G.; V. Guevara; D. Monterroso: «Efecto de la cal y la urea en el manejo del moko de las musáceas», *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66: 96-100, Costa Rica, 2002.
- Obregón, B. M.; P. G. Rodríguez; Y. M. Salazar: «Hospedantes de *Ralstonia solanacearum* en plantaciones de banano y plátano en Colombia», *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 61 (2): 4518-4526, Colombia, 2008.
- Ramírez, C. A.: «Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas de banano», tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 2005.
- Schaad, N.; J. Jones; W. Chun: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd ed., APS Press St. Paul, MN, EE. UU., 2001.
- Schell, M.: «Control of Virulence and Pathogenicity Genes or *Ralstonia solanacearum* by an Elaborate Sensory Network», *Annual Review Phytopathology* 38: 263-292, EE. UU., 2000.
- Sequeira, L.: «Control of Bacterial Wilt of Bananas by Crop Rotation and Following», *Trop. Agric.* 30: 211-217, Trinidad, 1962.
- Van Elsas, J. D.; P. Kastelein; P. Van Bekkum; J. M. Van Der Wolf; P. M. De Vries; L. S. Van Overbeek: «Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the Causative Agent of Potato Brown Rot, in Field and Microcosm Soils in Temperate Climates», *Phytopathology* 90 (12): 1358-1366, EE. UU., 2000.

COMPATIBILIDAD ENTRE NUEVOS PLAGUICIDAS QUÍMICOS SISTÉMICOS Y EL HONGO MICORRIZÓGENO *GLOMUS INTRARADICES* SCHENK Y SMITH

Rigel Fernández Valle, Marlene M. Veitía Rubio y Yoandry Rodríguez Rivero

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, La Habana, C.P. 11600, rfernandez@inisav.cu

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) influyen favorablemente en la nutrición vegetal; sin embargo, poco se conoce sobre la interacción de nuevos plaguicidas en los ecosistemas agrícolas. Actualmente la protección de cultivos se realiza generalmente por métodos químicos con tratamientos sobre las semillas. De este modo se determinó la colonización micorrízica, la densidad visual y la micomasa de micelio interno a la raíz, con el fin de detectar si hay inhibición de la simbiosis de *Glomus intraradices* en semillas de maíz tratadas con cuatro plaguicidas sistémicos. La combinación de fungicida e insecticida (neonicotinoide + triazol + fenilpirrol) propició una mayor colonización del hongo simbionte al registrar una colonización que promedió 62,62 %. Bajo las dosis recomendadas existe total compatibilidad entre *G. intraradices* y las moléculas empleadas en este ensayo. El tratamiento de semillas de maíz puede considerarse en programas de manejo integrado de plagas.

Palabras claves: micorrizas arbusculares vesiculares, plaguicidas, *Glomus*, maíz

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizae fungi (AMF) improve plants nutrition. However, the effect of new pesticides on agro-ecosystems is still unknown. Currently crops protection is done generally by chemical methods applied over seeds. Thus, the percent of mycorrhizal colonisation, visual density and the estimation of mycelium micomass endophytic to roots were determined, in order to find whether existence of inhibitory effect remains over symbiosis of *Glomus intraradices* at corn seeds enfolded with four systemic pesticides. Combination of fungicide and insecticide (neonicotinoide + triazol + fenilpirrol) enhance an upper mycorrhizal colonisation recording 62.62 %. Under such conditions, recommended doses have total compatibility between *G. intraradices* and molecules used in this assay. Film coating of corn seeds can be suggested at integrated pest's control management, as well.

Key words: vesicular arbuscular mycorrhizae, pesticides, *Glomus*, corn

INTRODUCCIÓN

La influencia de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la nutrición vegetal ha sido ampliamente documentada [Smith y Read, 1997; Brundrett, 2002] debido a las ventajas que brinda esta simbiosis planta-hongo. Registros fósiles ubican a estos hongos desde el período Ordovícico [Redecker *et al.*, 2000], y al interactuar con más del 85 % de las familias de plantas terrestres, se consideran fundamentales en la conquista del medio terrestre por las plantas [Brundrett, 2002].

Estos hongos inducen cambios anatómicos o morfológicos en el sistema radical [Atkinson *et al.*, 1994; Vigo

et al., 2000], que a su vez alteran las poblaciones de rizobacterias en el rizoplasma [Azcón-Aguilar y Barea, 1992]. De forma general, los mecanismos que involucran a los HMA en la bioprotección vegetal se justifican mediante la mejoría de la nutrición mineral de la planta anfitriona y la competencia con hongos fitopatógenos por fuentes de carbono y del espacio endófito o ectófito [Pérez, 2010].

La protección de los cultivos en la agricultura moderna se realiza fundamentalmente con agroquímicos. Estos pueden aplicarse de forma directa en determinadas eta-

pas del cultivo, mediante el tratamiento de las semillas. Wan *et al.* (1998) han documentado que el herbicida glifosato tiene efectos negativos sobre la germinación de esporas de *Glomus intraradices* Schenk y Smith, en condiciones *in vitro*; sin embargo Mujica *et al.* (1999) y Powell *et al.* (2009) han reportado lo contrario en cultivos de sorgo y soya, respectivamente.

No casualmente se seleccionó a *G. intraradices* para este tipo de estudio de compatibilidad. Dicha especie, junto a *Glomus mosseae* [(Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe], dentro del orden *Glomerales*, se consideran las *vedettes*, ya que son el ingrediente activo de la mayoría de los inoculantes comerciales a nivel mundial, ya sea en actuación independiente o en unión a otras especies de HMA.

La más reciente actualización de compatibilidad entre fungicidas e inoculantes de HMA fue realizada por Hernández-Dorrego y Mestre (2010), pero en ese estudio todos los fungicidas fueron aplicados tanto al suelo como por vía foliar.

Se desconoce la acción que algunos insecticidas y fungicidas aplicados a las semillas pueden causar sobre los microorganismos del suelo; pero se conoce que al someterse a constante estrés físico y químico, disminuyen su abundancia y diversidad [Helgason *et al.*, 1998]. El uso intensivo de productos químicos, sobre

todo plaguicidas y fertilizantes, constituyen una de las causas principales de la reducción en la diversidad biológica en los suelos, y dentro de ella los HMA [Convenio sobre la Diversidad Biológica, 1996].

El tratamiento de las semillas con bioproductos basados en HMA es una metodología que cobra auge entre los agricultores, mientras se reformulan nuevos plaguicidas y se aplican sobre las semillas, de forma que disminuyen los costos de producción y se incrementan los rendimientos en los cultivos [Agropanorama.com s/a].

Es por todo lo anterior que se propone determinar si existe inhibición de la colonización de *G. intraradices* en semillas de maíz *Zea mays* L., tratadas con nuevos fungicidas e insecticidas, solos y combinados, bajo condiciones semicontroladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo constó de cuatro variantes denominadas INS1, INS2, INFG y INS3, un testigo de HMA sin plaguicida y un control (Tabla 1). Cada una con cinco réplicas en un diseño completamente aleatorizado.

Se utilizó un total de 0,5 kg de semillas de maíz var. Rodrigo esparcidas sobre un papel gaceta para secar durante 4 h a temperatura ambiente.

Tabla 1: Variantes y moléculas empleadas con sus respectivas dosis y efectos

Variante	Ingrediente activo	Actividad biológica	Grupo químico	Dosis (mL de pc/kg de semilla)
INS1	Clotianidin	Insecticida	Neonicotinoide	2,5
INS2	Tiodicarb36,90 + imidacloprid 12,30	Insecticida	Carbamato + neonicotinoide	10
INFG	Thiametoxam 262,5 + difenoconazol 25 + fludioxonil 25	Insecticida Fungicida	Neonicotinoide + triazol + fenilpirrol	3
INS3	Imidacloprid	Insecticida	Neonicotinoide	8
Testigo HMA+	Glomus intraradices (IES-9)	Simbionte	–	–
Control	–	–	–	–

pc: Producto comercial.

Luego de secadas se seleccionaron 50 semillas por cada variante, que se colocaron en placas Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada hasta germinar. Al determinar el porciento de germinación se seleccionaron 10 por cada tratamiento según su calidad y desarrollo homogéneo.

Las esporas se obtuvieron por el método del tamizado en húmedo [Gerdemann y Nicolson, 1963] de un culti-

vo monoaxénico (IES-9), perteneciente a la Colección Cubana de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (CCHMA) del Instituto de Ecología y Sistemática (Citma).

Solo se tomaron en cuenta las esporas que lucían viables por su forma, color y contenido lipídico bajo el microscopio estereoscópico, acorde con criterios de la colección internacional de estos hongos, conocida por

sus siglas en idioma inglés (INVAM). A excepción del control, las diez semillas escogidas de cada variante fueron inoculadas con pipeta de Pasteur a nivel de sus hipocótilo a razón de 10 esporas de *G. intraradices* por semilla (Fig. 1), con el fin de garantizar su adherencia a la raíz. Teóricamente un solo propágulo es capaz de generar la simbiosis [INVAM, 2010].

Las semillas previamente inoculadas y revestidas con cada tratamiento fueron sembradas en macetas de 1 L. En cada una de las réplicas se sembraron dos semillas con suelo ferralítico rojo estéril Ferralsol [FAO, 1998]. Las plántulas se expusieron a condiciones naturales de luminosidad y se regaron en días alternos durante un mes con agua corriente.

A los treinta días se procesaron todas las muestras, por ser el período recomendado durante el cual está vigente el efecto de las moléculas involucradas en cada caso. A las raicillas se les determinó el porcentaje de colonización micorrízica (% CM).

En cada caso se extrajeron al azar algo más de 200 mg de muestra de las raicillas con pinzas de disección, y luego se sometieron a la clarificación y tinción con Trypan Blue [Phillips y Hayman, 1970]. Una vez teñidas se observaron al microscopio estereoscópico en una placa Petri con retículo de 1,27 cm² y se contaron las intersecciones de raicillas con las líneas del retículo en la base de la placa (> de 100 intersecciones), conforme al método de Giovannetti y Mosse (1980).

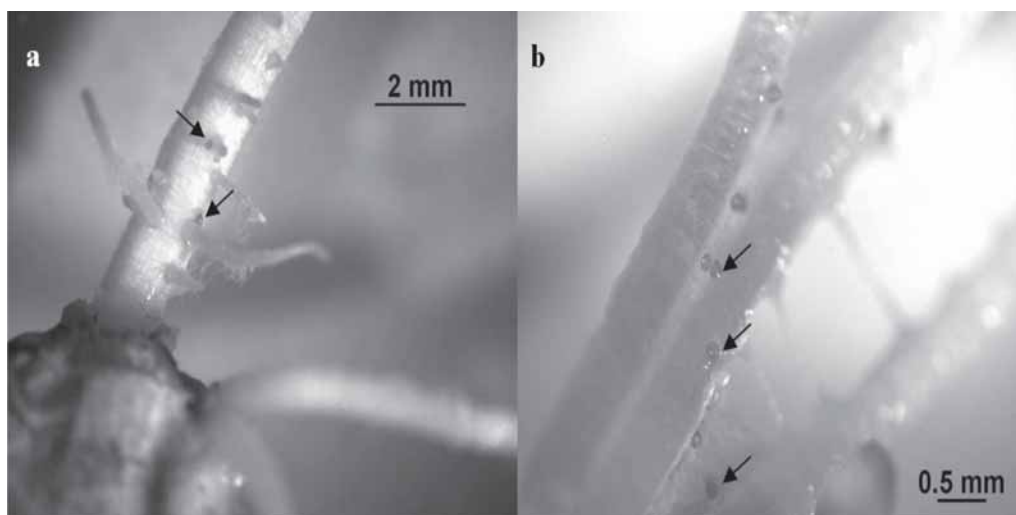


Figura 1. a) Semilla tratada con una de las variantes e inoculada con esporas de *G. intraradices* (IES-9). b) Detalles de raicillas del maíz con esporas.

Se clasificó la densidad visual de colonización (% DV) de 0 a 5 (Fig. 2) con sus respectivos valores de 0 al 47,5 %, según Herrera *et al.* (2004). El % DV es una variable que explica el grado de funcionalidad de la colonización. Se tomaron imágenes digitales al microscopio estereoscópico, con aumento de 2,5x a través de una cámara con *software* específicos a 1300 x 1030 dpi. También se realizaron fotos con microscopio compuesto y aumentos de 100x y 40x. A partir de las mismas muestras de raicillas y de los valores del % DV se estimó además la micomasa de micelio endófito (ME), según la fórmula:

$$ME = DV (\%) \frac{PSR}{100}$$

donde:

ME: Micomasa de micelio endófito

DV: Densidad visual de colonización

PSR: Peso seco de raicillas

Para comparar los valores medios de cada tratamiento se realizó un ANOVA, y como *post-hoc* la prueba Tukey a un nivel de significación del 5 %. Se realizó previamente el test de Levene para comprobar la homogeneidad de varianza. Todo el procesamiento estadístico se efectuó mediante el *software* SPSS vers.16 [SPSS Inc., 2007].

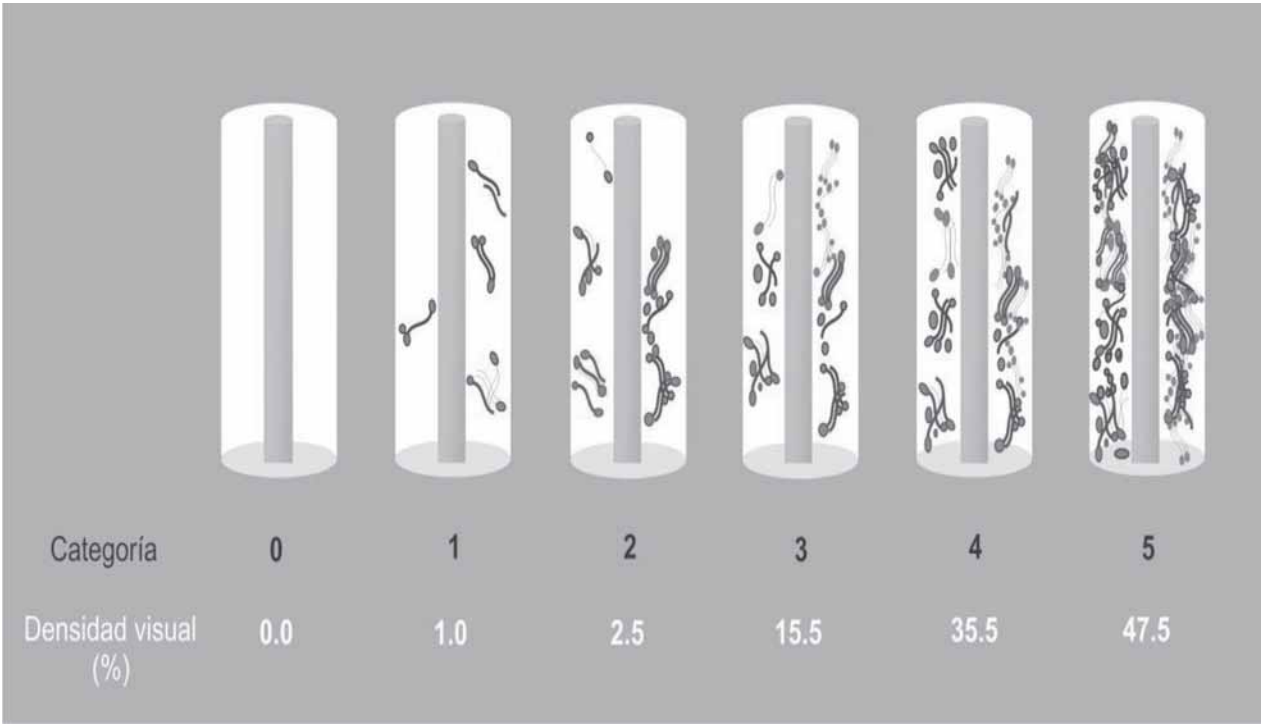


Figura 2. Diagrama de densidad de la colonización de raicillas por HMA [Herrera *et al.*, 2004].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de ME se reportan en $\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$. Es conveniente expresar esta variable fúngica respecto a unidades de volumen y no de masa de suelo, pues en los suelos tropicales la densidad es muy variable [Herrera *et al.*, 2004]. Se partió de una variable cualitativa, de presencia o ausencia, como el % CM para poder estimar cuán óptima es la simbiosis, a partir de considerar siempre que el mayor valor que alcanza es del 47,5 %. De lo

contrario, sería disfuncional la simbiosis y colapsaría el tejido cortical de la raíz [Herrera *et al.*, 2004].

Se observó una colonización aceptable por parte de *G. intraradices* (Tabla 2). No fue frecuente observar vesículas o esporas internas en las raíces teñidas; sin embargo, se pudieron observar estructuras incipientes (Fig. 3a) y algunas ya maduras (3b). El mayor valor de % CM se alcanzó en INS2 (tiodicarb 36,90 + imidacloprid 12,30), mientras el mínimo se registró en el testigo HMA⁺.

Tabla 2. Variantes empleadas y variables estimadas

Variantes	% CM ± E.E.	% CM		% DV ± E.E.	ME ± E.E. (mg x dm ⁻³)
		Máx.	Mín.		
INS1	58,25 ± 5,63 a	72,73	38,52	2,35 ± 0,86	1,34 ± 0,50
INS2	59,99 ± 10,05 a	87,38	24,76	4,06 ± 1,68	2,28 ± 0,93
INFG	62,62 ± 9,39 a	77,12	25,71	4,16 ± 1,12	2,27 ± 0,62
INS3	59,11 ± 5,72 a	74,77	45,83	2,87 ± 0,74	1,55 ± 0,36
Testigo HMA ⁺	47,42 ± 12,75 a	69,37	11,76	2,10 ± 0,87	1,14 ± 0,46
Control	0 b	0	0	0	0

(n = 5). E.E.: Error estándar.

El INFG (thiametoxam 262,5 + difenoconazol 25 + fludioxonil 25) produjo el mayor valor promedio de co-

lonización de todos los tratamientos, aunque no existieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ellos.

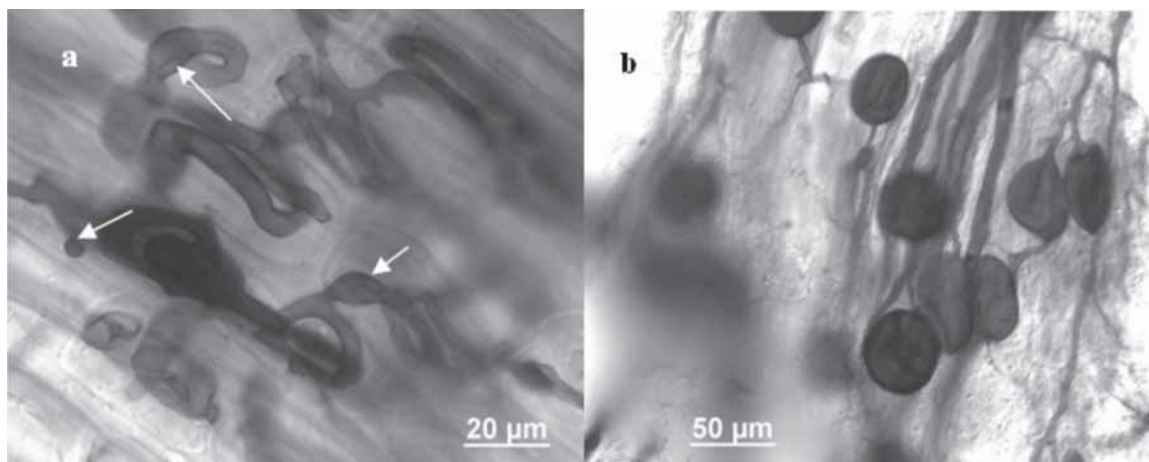


Figura 3. a) Raíz teñida con Trypan Blue (foto tomada al microscopio compuesto (100x)). Se destacan con flechas protuberancias en estructuras de intercambio tipo Paris. b) Esporas o vesículas internas a la raíz (foto tomada al microscopio compuesto (40x)).

Los valores estimados de la densidad visual fueron ligeramente bajos en todos los tratamientos, resultado quizás influido por el corto tiempo que duró el ensayo. En cambio, todas las semillas tratadas con plaguicidas tuvieron un valor promedio de % DV por encima del valor del testigo. Los valores de ME en INS2 y INFG fueron muy similares (Tabla 2), e incluso mayores que el tratamiento testigo HMA. Esto sugiere que las dosis recomendadas de los plaguicidas utilizados no afectan de forma negativa la simbiosis entre la planta y *G. intraradices*.

Los altos valores de % CM alcanzados por INSFG pudieran estar influenciados por el efecto vigorizante de las raíces del Thiamethoxam, que a su vez modula positivamente la respuesta de la simbiosis. Según Acevedo (2009), esta molécula estimula el crecimiento de las raíces en maíz.

Aun cuando no exista diferencia significativa entre los valores de % CM registrado respecto al testigo, estos resultados sugieren que la presencia de moléculas xenobióticas en la planta pudieran inducir algún estrés que aprovecha oportunamente el hongo simbionte para expresar mayor colonización. Quizás las alteraciones al metabolismo secundario de la planta [Leitner *et al.*, 2010] genera mayor gasto energético y coloca a la planta hospedera en asimetría competitiva, por lo que asume más fácilmente el consorcio con el HMA. En este sentido, recientemente se ha identificado en *G. intraradices* un gen que codifica para transportadores de membrana que contribuyen a la detoxificación del citosol, y actúan ante

estrés oxidativo y acumulación de metales en niveles tóxicos [González-Guerrero *et al.*, 2010].

Se pudiera afirmar, para continuar el enfoque energético del consorcio planta-hongo, que la colonización por *G. intraradices* es potenciada a favor del hongo. La inducción o activación de estos transportadores en el HMA favorece la detoxificación o tolerancia a algunas sustancias xenobióticas. En términos de eficiencia energética le resulta a la planta menos costoso asumir la simbiosis que activar sus propios mecanismos de tolerancia a moléculas ajenas.

Estos resultados coinciden con los de Afek *et al.* (1991) y Hwang *et al.* (1993), quienes obtuvieron superiores % CM en presencia del fungicida metalaxyl a dosis pequeñas. Algunos fungicidas incluso no tienen efecto alguno sobre los HMA [Goslin *et al.*, 2006]. Recientemente se encontró que el fenhexamid producía cierta atenuación del crecimiento de *G. intraradices* en hifas externas a la raíz transgénica de chicoria (*Cichorium intybus* L.) sin afectar la colonización, mientras el fenpropimorph afectaba negativamente la colonización y el desarrollo de las estructuras externas a la raíz [Campagnac *et al.*, 2010]. El fenpropimorph y el fenhexamid son inhibidores de la biosíntesis de esteroides; sin embargo, la misma especie de HMA responde diferente, independientemente del efecto de las moléculas xenobióticas.

Numerosas pruebas necesitan realizarse para discernir entre tipo de cultivo, ecotipo de HMA involucrado en la simbiosis, método de aplicación del biocida y estado fenológico de la planta al momento de la aplicación. Según Goslin *et al.* (2006), existe un desafío mayor, el cual consiste en discriminar efectos individuales de los biocidas aplicados a un cultivo durante todo su ciclo. Otros ensayos con nuevos productos y dosis debieran emplearse para corroborar o rechazar la validez del enfoque energético de la asociación planta-HMA ante el efecto de moléculas xenobióticas. La aplicación de productos químicos directamente a la semilla abre una nueva línea de estudios en la compatibilidad de microorganismos del suelo con los plaguicidas sintéticos de acción sistémica.

CONCLUSIONES

- El tratamiento combinado de fungicida e insecticida (neonicotinoide + triazol + fenilpirrol) propicia una mayor colonización micorrízica.
- La colonización de *G. intraradices* en maíz es independiente del volumen o dosis recomendadas para los productos comerciales evaluados.
- Los plaguicidas probados, aplicados a la semilla, pueden integrarse a los programas de manejo de plagas.
- Ninguna de las moléculas empleadas en este ensayo es incompatible o produce efecto negativo sobre la colonización por esta especie de hongo micorrizógeno.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Eduardo Furrázola Gómez (Instituto de Ecología y Sistemática) por facilitar parte del análisis de las muestras en su laboratorio. De igual modo, los autores agradecen la obtención de las imágenes digitales en su laboratorio y el suministro de la cepa IES-9.

A la Fundación Rufford Maurice Laing para la conservación de la naturaleza por el apoyo con un modesto presupuesto.

A la máster en Ciencias Ángela Porras y a la técnica Rebeca Ramírez (Inisav) por su inestimable ayuda con el análisis estadístico y procesamiento de las muestras, respectivamente.

REFERENCIAS

Acevedo, J. C.: «Evaluación del efecto de la aplicación de Thiamethoxam sobre la calidad de semilla de cinco híbridos de maíz (*Zea mays* L.) y cinco variedades de arroz (*Oryza sativa* L.)», tesis de Maestría como requisito parcial para optar al título de Máster en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Área Agraria, Bogotá, Colombia, 2009.

Afek, U.; J. A. Menge; E. L. V Johnson: «Interaction Among Mycorrhizae, Soil Solarization, Metalaxyl, and Plants in the Field», *Plant Dis.* 75: 665-671, 1991.

Agropanorama.com, <http://www.agropanorama.com/index.asp#03agricultura> (consultado: feb. de 2011).

Atkinson, D.; G. Berta; J. E. Hooker: «Impact of Mycorrhizal Colonisation on Root Architecture, Root Longevity and the Formation of Growth Regulators», *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1994, pp. 89-99.

Azcón-Aguilar, C.; J. M. Barea: «Interactions Between Mycorrhizal Fungi and Other Rhizosphere Microorganisms», *Mycorrhizal Functioning. An integrative Plant-Fungal Process*, Routledge, Chapman & Hall, Nueva York, 1992, pp.163-198.

Brundrett, M. C.: «Coevolution of Roots and Mycorrhizas of Land Plants», *New Phytol.* 154: 275-304, Inglaterra, 2002.

Campagnac, E.; A. Lounès-Hadj; D. Debiane; J. Fontaine; F. Laruelle; G. Garçon; A. Verdin; R. Durand; P. Shiral; A. Grandmougin-Ferjani: «Arbuscular Mycorrhiza Partially Protect Chicory Roots Against Oxidative Stress Induced by Two Fungicides, Fenpropimorph and Fenhexamid», *Mycorrhiza* 20: 167-178, Inglaterra, 2010.

Convenio sobre la Diversidad Biológica: «Consideración de la diversidad biológica agrícola en el marco del convenio sobre la diversidad biológica», Tema 9.1 del programa provisional. Conferencia de las partes en el convenio sobre la diversidad biológica, Tercera Reunión, Buenos Aires, 1996.

FAO: «World Reference Base for Soil Resources», ISSS-ISRIC-FAO, Roma, 1998.

Gerdemann, J. W.; T. H. Nicolson: «Spores of Mycorrhizal Endogone Species Extracted from Soil by Wet-Sieving and Decanting», *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244, Inglaterra, 1963.

Giovannetti, M.; B. Mosse: «An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots», *New Phytol.* 84: 489-500, Inglaterra, 1980.

González-Guerrero, M.; K. Benabdellah; A. Valderas; C. Azcón-Aguilar; N. Ferrol: «*GintABC1* Encodes a Putative ABC Transporter of the MRP Subfamily Induced by Cu, Cd, and Oxidative Stress in *Glomus intraradices*», *Mycorrhiza* 20 (2): 137-146, Inglaterra, 2010.

Goslin P.; A. Hodge; G. Goodlass; G. D. Bending: «Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Organic Farming», *Agriculture, Ecosystem and Environment* 113 (1-4): 17-35, Inglaterra, 2006.

Helgason T.; T. J. Daniell; R. Husband; A. H. Fitter; J. P. W Young: «Ploughing up the Wood-Wide Web?», *Nature*, Inglaterra, 1998, pp. 394-431.

Hernández-Dorrego, A.; J. Mestre: «Evaluation of Some Fungicides on Mycorrhizal Symbiosis Between Two *Glomus* Species from Commercial Inocula and *Allium porrum* L. Seedlings», *Spanish Journal of Agricultural Research* 8 (1): 43-50, España, 2010.

Herrera, R. A.; E. Furrázola; R. L. Ferrer; R. Fernández; Y. Torres: «Functional Strategies of Root Hairs and Arbuscular Mycorrhizae in an Evergreen Tropical Forest, Sierra del Rosario, Cuba», revista *CENIC Ciencias Biológicas* 35 (3): 113-123, La Habana, 2004.

Hwang, S. F.; P. Chakravarty; D. Prevost: «Effects of Rhizobia, Metalaxyl, and VA Mycorrhizal Fungi on Growth, Nitrogen-Fixation, and Development of Pythium Root-Rot of Sainfoin», *Plant Dis.* 77: 1093-1098, Inglaterra, 1993.

INVAM.com: «Colección internacional de micorizas arbusculares», <http://invam.caf.wvu.edu/taxonomy> (consultado: sept. de 2010).

Leitner, M.; R. Kaiser; B. Hause; W. Boland; Axel Mithöfer: «Does Mycorrhization Influence Herbivore-Induced Volatile Emission in *Medicago truncatula*?», *Mycorrhiza* 20: 89-101, Inglaterra, 2010.

- Mujica, M. T.; S. Fracchia; J. A. Ocampo; A. Godeas: «Influence of the Herbicides Chlorsulfuron and Glyphosate on Mycorrhizal Soybean Intercropped with the Weeds *Brassica campestris* or *Sorghum halepensis*», *Symbiosis* 27: 73-81, Inglaterra, 1999.
- Pérez, E.: «Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para la bioprotección de patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum Lycopersicum* L.)», tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, La Habana, 2010.
- Phillips, J. M.; D. S. Hayman: «Improved Procedures? for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection», *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161, Inglaterra, 1970.
- Powell, J. R.; R. G. Campbell; K. E. Dunfield; R. H. Gulden; M. M. Hart; D. J. Levy-Booth; J. N. Klironomos; K. P. Pauls; C. J. Swanton; J. T. Trevors; P. M. Antunes: «Effect of glyphosate on the tripartite symbiosis formed by *Glomus intraradices*, *Bradyrhizobium japonicum* and genetically modified soybean» *Applied Soil Ecology* 41: 128-138. Inglaterra. 2009.
- Redecker, D.; R. Kodner; L. E. Graham: «Glomalean Fungi from the Ordovician», *Science* 289: 1920-1921, EE. UU., 2000.
- Smith, S. E.; D. J. Read: *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. Cambridge, MA, EE. UU., 1997.
- SPSS Inc.: SPSS vers.16, Chicago, Illinois, 2007.
- Vigo, C.; J. R. Norman; J. E. Hooker: «Biocontrol of the Pathogen *Phytophthora parasitica* by Arbuscular Mycorrhizal Fungi Is a Consequence of Effects on Infection Loci», *Plant Pathol.* 49: 509-514, Inglaterra, 2000.
- Wan, M. T.; J. E. Rahe; R. G. Watts: «A New Technique for Determining the Sublethal Toxicity of Pesticides to the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices*», *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1421-1428, Inglaterra, 1998.

EFICACIA DEL BENOMYL Y EL FLUDIOXONIL PARA EL CONTROL DE *VERTICILLIUM ALBO-ATRUM* REINKE & BERTHOLD Y *V. DAHLIAE* KLEBAHN EN SEMILLAS DE VEGETALES

Luis Pérez Vicente,¹ Jorge Abreu Fundora,² Michel Pérez Miranda,¹ Einar Martínez de la Parte² y María Pueyo Figueroa²

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, La Habana, C.P. 11600, lperezvicente@inisav.cu

² Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal. Ayuntamiento 231 e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución, La Habana

RESUMEN

Verticillium albo-atrum y *V. dahliae* causan marchitez en diferentes especies hortícolas, ornamentales y forestales, y presentan una distribución mundial. Entre 1987 y 2008 fueron la causa del rechazo en Cuba de 38 lotes de semillas vegetales importadas de nueve países de Asia, América y Europa. Se trataron semillas de remolacha y de espinaca infectadas con *Verticillium* spp. mediante inmersión por 1 min en suspensión de 5 y 10 g de benomyl/L de agua, tratamiento húmedo con 0,05 y 0,1 g de fludioxonil + 40 mL de agua/kg de semillas. Se incluyeron un control seco y un control húmedo, para lo cual las semillas fueron sumergidas en agua por 1 min. Se secaron a temperatura ambiente e incubaron 400 semillas/tratamiento en placas Petri estériles bajo luz fluorescente a 27 °C por doce días. Los tratamientos con 5 y 10 g de benomyl y 0,1 g de fludioxonil/L de agua inhibieron el desarrollo de *Verticillium* spp. en las semillas. En un ensayo a nivel comercial, se trataron semillas de pimiento y espinaca infectadas con *Verticillium* spp. (1 t de c/u) por inmersión durante 1 min en una suspensión de 10 g de benomyl/L de agua, y se incubaron según el procedimiento descrito. En ninguna de las semillas tratadas fueron detectados *Verticillium* spp. El benomyl 10 g/L (inmersión por 1 min) y el fludioxonil (húmedo) a 0,1 g + 40 mL de agua/kg de semillas pueden usarse para la desinfección de semillas de vegetales contra *Verticillium* spp.

Palabras claves: *Verticillium*, tratamiento de semillas, benomilo, fludioxonil

ABSTRACT

Verticillium dahliae and *V. albo-atrum* are causal agents of wilt in different vegetable, ornamental and forest plants, readily transmitted in seeds, worldwide distributed and the cause of rejection in Cuba of vegetable seed parcels imported from different countries. Detroit Dark Red beet seeds infected with *Verticillium* spp. were treated by a) dipping for 1 min in a suspension of 5 and 10 g of benomyl/L of water and b) slurry treatment using 0.05 and 0.1 g of fludioxonil + 40 mL of water/kg of seeds. Dry and humid controls were included, in the last one seeds were dipped by 1 min in water. After treatment, seeds were air dried overnight at room temperature and 400 seeds/treatment were placed in four sterile 20 cm diameter Petri plates, and incubated under fluorescent lamps at 27 °C for 12 days. Treatments with 5 and 10 g of benomyl and 0.1 g of fludioxonil/L of water completely inhibited the development of *Verticillium* spp., meanwhile slurry treatment using 0.05 g of fludioxonil + 40 mL of water/kg of seeds, and dry and humid controls had 0.2, 3.0 and 3.3 % of infected seeds, respectively. Sweet pepper (California Wonder) and spinach (Matador) seeds (1 t of each one), infected with *Verticillium* spp. were treated by dipping during 1 min in a suspension of 10 g of benomyl/L of water, sampled and followed afterward the same incubation procedure described above. In any of the treated seeds were detected *Verticillium* spp. Benomyl at 10 g/L (dipping 1 min) and fludioxonil at 0.1 g + 40 mL water/kg of seeds (slurry) were effective in the disinfection of vegetable seeds against *Verticillium* spp.

Keywords: *Verticillium*, seed treatment, benomyl, fludioxonil

INTRODUCCIÓN

Verticillium dahliae Kleb. y *V. albo-atrum* Reinke & Berthold son en la actualidad dos de las especies ampliamente aceptadas en la sección Nigrescentia del género *Verticillium*, e importantes fitopatógenos que in-

ducen marchitez en un amplio rango de hospedantes [Barbara y Cleves, 2003].

V. albo-atrum es favorecido por temperaturas medias e inhibido por las altas, lo que determina una más alta

distribución geográfica en países con climas templados [Carder y Bárbara., 1991]. *V. dahliae* se encuentra más distribuido en suelos con temperaturas superiores a 25 °C [Rowe, 1985; Powelson y Rowe, 1993], y posee un amplio rango de hospedantes, entre ellas más de trescientas especies de plantas dicotiledóneas, frutales, maderables, hortalizas y vegetales [Heale, 1997].

En Cuba existe un amplio grupo de cultivos económicamente importantes que constituyen hospedantes potenciales de estos microorganismos, entre los que se encuentran *Allium sativum*, *Beta vulgaris*, *Brassica oleracea*, *Capsicum annuum*, *Cucumis* sp., *Chrysanthemum* spp., *Glycine max*, *Helianthus annuum*, *Lycopersicon esculentum*, *Manguifera indica*, *Manihot esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Persea indica*, *Raphanus sativus*, *Solanum tuberosum*, *Spinacia oleracea*, *Theobroma cacao* y un número importante de especies ornamentales de flores y hojas. Existen además malezas hospedantes de *V. dahliae* que sirven para perpetuar el inóculo y que abundan en los campos, tales como *Abutilon* sp., *Amaranthus* sp., *Calendula* sp., *Chenopodium album*, *Datura* spp. y *Solanum nigrum*, las cuales pueden desarrollar infecciones asintomáticas, lo que aumenta el riesgo de diseminación de la enfermedad.

En Estados Unidos se notifican pérdidas del 31 % en campos de papa infectados por *V. dahliae* [Hu *et al.*, 1993], entre 6,5-47,1 % en tomates [Bender y Shoemaker, 1984], y en Israel de hasta el 22 % en pimientos [Tsrer *et al.*, 1998]. En Europa y Estados Unidos es casi prohibitivo el cultivo de variedades de tomate que no posean resistencia a *Verticillium* spp.

Los microesclerocios que desarrolla *V. dahliae* quedan en el suelo y garantizan la diseminación y los nuevos ciclos de infección del patógeno, mientras que *V. albo-atrum* produce hifas melanizadas de descanso, que tienen una sobrevivencia menor en el suelo. Es por ello que se ha prestado mayor atención al manejo de estos patógenos en el suelo, y existen en general pocas informaciones sobre la distribución de especies de *Verticillium* en semillas botánicas. Pegg y Brady (2002) y Vallad *et al.* (2005) informaron que *V. dahliae* y *V. albo-atrum* se diseminan eficientemente en semillas botánicas, tanto en su interior [Klisiewicks, 1975] como en su superficie, desde donde coloniza las raíces de la planta [Spek, 1973]. Estos patógenos vasculares sistémicos se distribuyen también por material agámico, como en el caso de frutales de pepita, ornamentales maderables [Chen, 1994] y papas [Omer *et al.*, 2000; Pérez *et al.*,

2008]. Du Toit *et al.* (2005) informaron de infecciones en semillas de espinacas entre el 1,5 y el 54 %, y en el 68 % de los lotes diagnosticados en el noroeste de Estados Unidos.

Ambos patógenos se encuentran en la lista de plagas cuarentenarias y reguladas de Cuba. El Laboratorio Central de Cuarentena (LCCV) del Centro Nacional de Sanidad Vegetal de Cuba, en los peritajes de vigilancia cuarentenaria, ha detectado su presencia en lotes de semillas importadas de diferentes orígenes, y en especies de plantas, las cuales han sido objeto de decomisos y reexportaciones. En los últimos años también se ha informado su presencia en campos de papa en diferentes localidades del país [Pérez *et al.*, 2008].

Los factores como el estrés hídrico, la siembra de variedades susceptibles, el uso limitado de la rotación de cultivos, el establecimiento masivo de la producción hortícola en casas de cultivo, donde se plantan ciclos sucesivos de plantas hospedantes, y las limitaciones para la desinfección de los suelos, aumentan el riesgo del establecimiento del patógeno y facilitan su acumulación poliética en el suelo. Estos elementos tienen impacto en la agricultura y provocan disminución de los rendimientos. Por otro lado, la adopción de métodos orgánicos de producción de semillas de espinaca permite el movimiento del patógeno, y ha dejado a la semilla indefensa contra las infecciones del inóculo presente en los suelos [McMoran *et al.*, 2002].

Existen pocos estudios relacionados con los métodos de desinfección de semillas botánicas contra *V. dahliae* y *V. albo-atrum*, con vistas a disminuir y evitar el riesgo de transmisión a áreas libres de ambos patógenos. Se ha demostrado la eficacia del benomyl, thiabendazol y el metil tiofanato (inhibidores de la β tubulina) en el tratamiento de semillas contra *Verticillium* [Du Toit *et al.*, 2005].

El fludioxonil es un derivado de los fenilpirroles [Gehmann *et al.*, 1990], inhibidor de la proteína histidina kinasa PK III, involucrada en la ruta metabólica de la señal de transducción de la sensibilidad osmótica en la membrana citoplasmática [Gasztonyi y Lyr, 1995; Zhang *et al.*, 2002; Fujimura *et al.*, 2003], que ha mostrado eficacia en el control de patógenos fúngicos que afectan a las semillas de arroz [Pérez *et al.*, 2009], papa y granos naturalmente infectados [Acuña *et al.*, 2007].

Este trabajo tiene como objetivos detectar la presencia de *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum* en cargamentos

de semilla botánica de diferentes especies y orígenes geográficos durante el período 1998-2010, y determinar la eficacia de los fungicidas benomyl y fludioxinil en el control de estos patógenos mediante bioensayos en semillas de remolacha, espinaca y pimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección de *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum* en semillas botánicas importadas de especies hortícolas

Se analizaron 895 lotes de semillas botánicas importadas de acelga (*Beta vulgaris* var. cicla (L.) K. Koch), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.) y remolacha (*Beta vulgaris* L.) en el período 1997-2009, para lo cual se utilizaron 400 semillas por lote. Las semillas se desinfectaron superficialmente con NaOCl al 2 % durante 1 min, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se incubaron durante siete días en cámaras húmedas en placas de Petri de 15 cm bajo luz fluorescente y oscuridad alternante a 27 °C, hasta completar la germinación y desarrollo de las hojas cotiledonales y radículas. Se evaluó bajo el estereoscopio la presencia de conidióforos y esclerocios de *Verticillium* spp. Para determinar la especie involucrada se realizaron aislamiento de los crecimientos miceliales con conidióforos verticilados, y se utilizó el medio de cultivo papa-dextrosa-gar (PDA).

Bioensayos de evaluación *in vitro* de los fungicidas químicos

Se realizaron dos repeticiones del bioensayo *in vitro* con semillas botánicas de remolacha variedad Detroit Dark Red, y dos con semillas infectadas de espinaca variedad Matador. Para la desinfección de las semillas se utilizaron los fungicidas benomyl (Fundazol 50 % PH) y fludioxonil (Celest 2,5 FS). Las variantes experimentales establecidas fueron:

1. Testigo seco (100 g de semilla seca).
2. Testigo húmedo (100 g de semilla + 20 mL de agua destilada estéril).
3. Inmersión por 1 min en benomyl 0,05 % i.a. y dejadas secar al aire.
4. Inmersión por 1 min en benomyl a 0,1 % i.a. y dejadas secar al aire.
5. Fludioxonil tratamiento húmedo a 2,5 g i.a./100 kg de semillas y dejadas secar al aire.
6. Fludioxonil tratamiento húmedo a 5 g i.a./100 kg de semillas y dejadas secar al aire.

Después del tratamiento las semillas se dejaron secar al aire durante una noche y se incubaron en cámaras húmedas (Blotter test) bajo luz fluorescente a 25-27 °C por al menos diez días hasta completar el período de germinación de las semillas. Para todas las variantes se establecieron cuatro placas de Petri de 15 cm (réplicas) con 100 semillas cada una.

Se determinaron los porcentajes de germinación de las semillas, las frecuencias de incidencia de las especies de hongos que se desarrollaron en las diferentes variantes de tratamiento e incubación y la altura de 50 plántulas por tratamiento. Todos los datos de porcentaje fueron transformados a $\arcsen\sqrt{\%}$ para su normalización, y las medias comparadas mediante la dócima de Tukey al 5 %.

Bioensayos a gran escala en lotes comerciales de semillas de remolacha y pimiento infectados con *Verticillium* spp.

Se trataron cinco lotes comerciales de remolacha Detroit Dark Red con un volumen de 5 t de semilla y siete lotes de semilla de pimiento California Wonder que se mantenían retenidos por cuarentena en frigorífico, en los cuales habían sido detectados patógenos *V. dahliae* y *V. albo-atrum*. Se determinó previo a la desinfección de la semilla, mediante el procedimiento ya descrito, el porcentaje de semillas infectadas por *Verticillium* spp. en una muestra compuesta de los lotes de cada una de las dos especies de semillas.

Las semillas se trataron por inmersión durante 1 min con benomyl al 0,1 % de i.a. Se tomaron muestras de cada uno de los lotes tratados y se incubaron de acuerdo con la metodología descrita en el acápite anterior. Se determinó la incidencia en semillas tratadas y sin tratar de ambas especies de *Verticillium*, así como otras especies fúngicas que incidieron sobre estas semillas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum* en semillas botánicas importadas de especies hortícolas

La presencia de conidióforos verticilados sobre la superficie de las semillas y en ocasiones de microesclerocios de *V. dahliae* (Figs. 1 y 2) puso en evidencia la presencia de infecciones de *Verticillium* spp. Una vez transferidos a placas con PDA y desarrolladas las colonias, se pudieron visualizar los restos pigmentados de micelio de *V. albo-atrum* (Fig. 3) y los microesclerocios (Fig. 4).

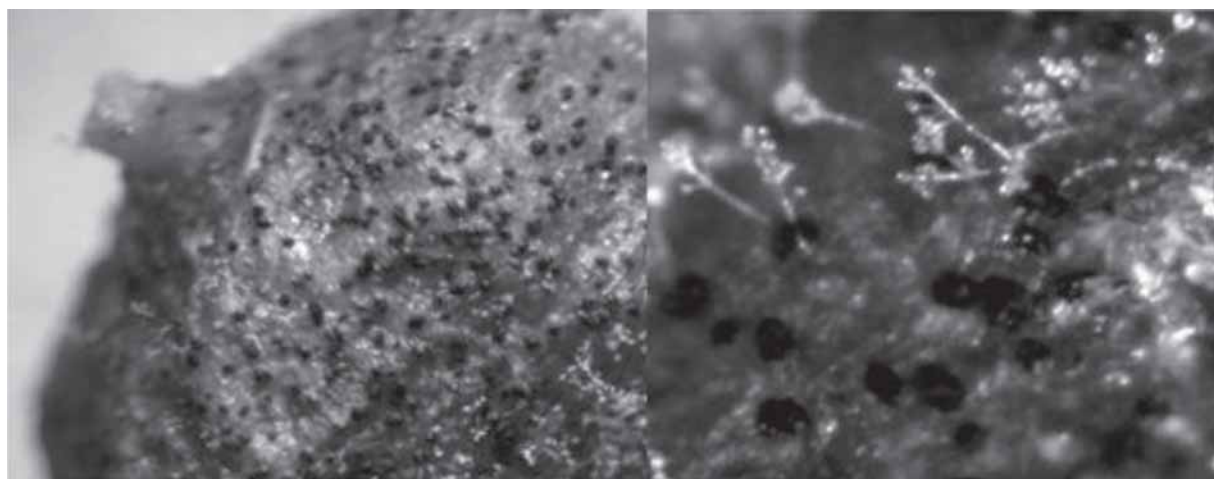


Figura 1. Conidióforos y microesclerocios de *V. dahliae* sobre semillas de espinaca (40x).

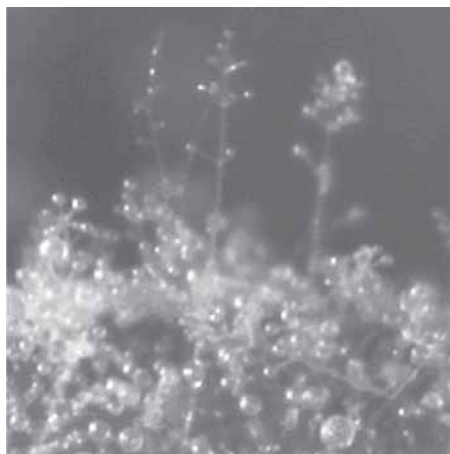


Figura 2. Conidióforos verticilados de *Verticillium* sp. (100x).



Figura 3. Hifas melanizadas típicas de *V. albo-atrum*

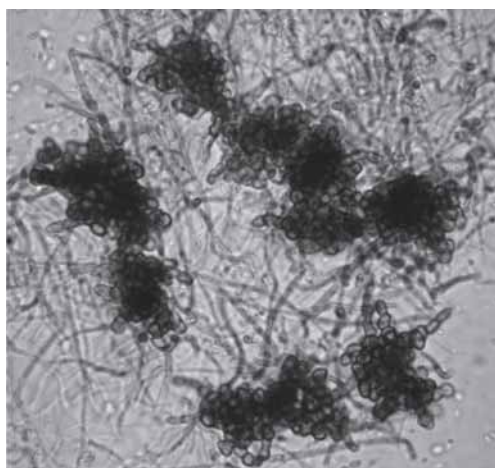


Figura 4. Microesclerocios de *V. dahliae*.

Durante el período 1997-2009 el LCCV realizó la intercepción de 62 lotes de semillas botánicas contaminadas con

V. albo-atrum y *V. dahliae* provenientes de nueve países (Tabla 1).

Tabla 1. Intercepciones de *V. albo-atrum* y *V. dahliae* realizadas por parte del LCCV en lotes de semillas botánicas importadas (período 1997-2009)

Especie hortícola	Intercepciones	Patógeno	Origen
Acelga	16	<i>V. albo-atrum</i>	Italia (12), Brasil (2), Serbia(2)
Culantro	1	<i>V. albo-atrum</i>	Italia
Espinacas	19	<i>V. dahliae</i> (12)	Holanda(3), Italia (6), EE. UU. (1), Japón (1)
(1)		<i>V. albo-atrum</i> (7)*	Italia (6) Japón (1)
Girasol	1	<i>V. dahlia</i>	Canadá
Hinojo	1	<i>V. albo-atrum</i>	Italia
Perejil	1	<i>V. albo-atrum</i>	Francia
Pimiento	5	<i>V. dahliae</i> (3)	España (2), Holanda(1)
		<i>V. albo-atrum</i> (2)	Francia, Italia
Remolacha	18	<i>V. dahliae</i> (2)	Italia (2)
		<i>V. albo-atrum</i> (16)	Italia (14), Serbia (2)
Flores	3	<i>V. albo-atrum</i>	Serbia

* En dos lotes, uno de Italia y otro de Japón, se detectaron ambos patógenos.

De los resultados de la tabla se puede apreciar que la transmisión de *V. albo-atrum* y *V. dahliae* es un evento relativamente frecuente en semillas botánicas en diferentes especies de plantas, y común en las semillas importadas a Cuba de diferentes países, como puede apreciarse en relación con las semillas de espinacas, remolacha, pimiento y acelga. Por esto las semillas botánicas importadas de áreas

donde los patógenos están presentes constituyen un elemento de riesgo de su introducción al país.

Bioensayos de evaluación *in vitro* de los fungicidas químicos

En la *Tabla 2* aparece el resultado de los tratamientos realizados a la semilla de remolacha del primer ensayo.

Tabla 2. Eficacia de diferentes tratamientos en la desinfección de semillas de remolacha de la variedad Detroit Dark Red. Porcentajes de infección después de trece días de incubación bajo luz fluorescente

No.	Variante de tratamiento	Ensayo en papel de filtro húmedo estándar ¹ (%)			
		Germinación	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium</i> spp.
1	Testigo seco (100 g de semilla seca)	90,5 b	3,3 b	0 ns	0 a
2	Testigo húmedo (100 g de semilla + 20 mL de agua destilada estéril)	86,3 ab	1,5 ab	7,0 ns	1,0 a
3	Inmersión por 1 min en benomyl 0,05 % i.a. y secadas al aire	76,0 a	0,2 a	1,0 ns	0 a
4	Inmersión por 1 min en benomyl 0,1% i.a. y secadas al aire	99,8 b	0 a	0 ns	0 a
5	Fludioxonil 0,025 g i.a./kg + 40 mL de agua/kg de semillas secadas al aire	96,0 b	0,2 a	0 ns	5,0 b
6	Fludioxonil 0,05 g i.a./kg + 40 mL de agua/kg de semillas y dejadas secar al aire	97,8 b	0 a	0 ns	2,0 b
	ESx	2,03	0,42	—	0.48

¹ Medias de cuatro repeticiones de 100 semillas cada una por tratamiento.

i.a.: Ingrediente activo.

ns: No significativo.

Letras no comunes indican diferencias significativas según test de Tukey al 5 %.

En los tratamientos con benomyl al 0,1 % i.a. y el fludioxonil a ambas dosis se produjo un incremento de la germinación de las semillas en relación con los testigos. Las variantes testigos húmedos y secos mostraron entre el 1,5 y 3,3 % de semillas infectadas con *Verticillium* spp.

Los tratamientos con benomyl al 0,05 % por inmersión durante 1 min, y fludioxonil a razón de 0,025 g i.a./ kg de semillas o 2,5 g i.a./100 kg de semillas, disminuyeron la incidencia de estas especies de hongos en la semilla, pero no inhibieron totalmente la aparición de *Verticillium* en los cotiledones y radículas.

El benomyl, a la concentración del 0,1 % de i.a., permitió una inhibición total de la aparición de *Verticillium* spp. Este tratamiento, sin embargo, no resultó efectivo para la inhibición de *A. alternata* en las semillas a la dosis más baja. Es conocido que el benomyl no controla eficientemente especies de *Alternaria*.

El fludioxonil no inhibió completamente el total de las especies de *Fusarium* que aparecieron en las semillas de remolacha.

Los mejores niveles de germinación de la semilla se obtuvieron con el tratamiento con benomyl por inmersión al 1 % i.a.

En la *Tabla 3* aparecen los datos de la segunda repetición del ensayo de desinfección de semillas de remolacha. El tratamiento con benomyl al 0,1 % y con fludioxonil 0,025 g i.a./kg de semilla mejoraron la germinación de la semilla con respecto a los testigos secos y húmedos.

En las variantes testigo húmedo y seco mostraron el 3 y el 4 % de infección de la semilla. Los tratamientos con benomyl al 0,05 y 1 % de i.a. y con el fludioxonil a ambas dosis inhibieron totalmente el desarrollo de *Verticillium* spp. Similarmente a como ocurrió con el primer ensayo, el benomyl no controló eficientemente *A. alternata*, ni el fludioxonil a las infecciones de *Fusarium* sp.

De forma general se observó que las semillas infectadas con *Verticillium* sp. pueden no germinar o morir durante las primeras etapas del proceso de desarrollo de las plantas. Esto puede conducir a una falsa estimación de la incidencia de la enfermedad en el campo debido a la muerte de las plántulas en germinación.

Tabla 3. Resultados del segundo ensayo de desinfección de semilla de remolacha variedad Detroit Dark Red

No.	Variante de tratamiento	Ensayo en papel de filtro húmedo estándar ¹ (%)				
		Germinación	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Phoma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
1	Testigo seco (100 g de semilla seca)	80,5 a	3,0 a	12,3 c	0	1,0 ab
2	Testigo semilla húmeda (100 g de semilla + 20 mL de agua destilada estéril)	75,3 a	4,0 a	6,5 b	0	2,3 b
3	Inmersión por 1 min en benomyl 0,05 % i.a. y dejadas secar al aire	68,5 a	0 b	3,8 ab	0	0 a
4	Inmersión por 1 min en benomyl 0,1 % i.a. y dejadas secar al aire	80,3 a	0 b	4,5 ab	0,25	0 a
5	Fludioxonil 0,025 g i.a./kg + 40 mL de agua/kg de semillas y dejadas secar al aire	82,3 a	0 b	0 a	0	0,5 ab
6	Fludioxonil 0,05 g i.a./kg + 40 mL de agua/kg de semillas y dejadas secar al aire	66,3 a	0 b	0 a	0	1,2 a
	Es X	3,11	0,38	0,83	ns	0,195

¹: Medias de cuatro repeticiones de 100 semillas cada una por tratamiento.

i.a.: Ingrediente activo.

ns: No significativo.

Letras no comunes indican diferencias significativas según test de Tukey al 5 %.

Desinfección de semillas de espinacas

En la *Tabla 4* aparecen los datos del ensayo de desinfección de semillas de espinaca variedad Matador de un lote infectado almacenado. La germinación de la espinaca fue baja en los testigos y los tratamientos. En estas semillas los índices de infección de *Verticillium* fueron altos y superiores a los encontrados en los lotes al ser detectados a la importación, lo que hace considerar que durante el almacenamiento prolongado ocurre transmisión, y los índices de infección por *Verticillium* spp. pueden aumentar.

El tratamiento con benomyl a ambas dosis permitió mejorar la germinación de la semilla de espinaca que se

duplicó e inhibió totalmente su desarrollo de *Verticillium*, así como las infecciones por *Fusarium* sp. y *Phoma* sp.

Al igual que con la remolacha, las infecciones por *A. alternata* no fueron eficientemente controladas por este tratamiento. El fludioxonil a ambas dosis, aunque disminuyó infección con *Verticillium* sp. de las semillas en relación con los testigos, permitió aún un alto porcentaje de semillas enfermas, lo que hace considerar que no es un tratamiento eficiente cuando el nivel de infección de las semillas es alto. Al igual que en los ensayos con remolacha, mostró un mejor control de *A. alternata* que el benomyl.

Tabla 4. Desinfección de semilla de espinaca Matador contra *Verticillium* spp.

No.	Variante de tratamiento	Ensayo en papel de filtro húmedo estándar ¹ (%)				
		Germinación	<i>Verticillium</i>	<i>A. alternata</i>	<i>Phoma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
1	Testigo seco (100 g de semilla seca)	33,3 abc	38,8 c	45,3 d	2,5 b	2,3 a
2	Testigo semilla húmeda (100 g de semilla + 20 mL de agua destilada estéril)	16,0 a	22,5 d	42,0 cd	5,0 c	1,8 a
3	Inmersión por 1 min en benomyl 0,05 % i.a. y dejadas secar al aire	64,8 c	0 a	25,5 bc	1,3 ab	0 a
4	Inmersión por 1 min en benomyl 0,1 % i.a. y dejadas secar al aire	68,3 bc	0 a	24,3 b	0,3 a	0 a
5	Fludioxonil 0,025 g i.a./kg + 40 mL de agua/kg de semillas y dejadas secar al aire	23,8 ab	15,0 bc	9,5 ab	0,5 a	8,0 b
6	Fludioxonil 0,05 g i.a./kg + 40 mL de agua/kg de semillas y dejadas secar al aire	24,3 ab	11,8 b	5,8 a	0,5 a	1,3 a
	ESx	4,94	2,91	3,38	0,37	0,67

¹: Medias de cuatro repeticiones de 100 semillas cada una por tratamiento.

i.a.: Ingrediente activo.

ns: No significativo.

Letras no comunes indican diferencias significativas según test de Tukey al 5 %.

Biensayos a gran escala en lotes comerciales de semillas de remolacha y pimiento infectados con *Verticillium* spp.

La muestra compuesta de los lotes de semilla de remolacha presentó, previo al tratamiento con los fungicidas, el 3,5 % de infección, mientras que la muestra compuesta de los lotes de semilla de pimiento presentó el

0,2 %. En la *Tabla 5* aparecen los resultados de las evaluaciones de la eficacia del tratamiento a gran escala de semillas de remolacha y pimientos con benomyl al 0,1 % por 1 min.

Tabla 5. Eficacia del tratamiento por inmersión en suspensión de benomyl al 0,1 % por 1 min de lotes de semillas de remolacha Detroit Dark Red y pimiento California Wonder infectadas con *V. dahliae* y *V. albo-atrum*

Lote	Semilla	Germinación (%)	Infección por <i>Verticillium</i> spp. (%)	Otros patógenos presentes en la muestra después del tratamiento
1	Remolacha	96,2	0	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Curvularia</i> sp.
2	Remolacha	97,1	0	<i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Graphium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Curvularia</i> sp., <i>A. alternata</i> , <i>Bipolaris</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
3	Remolacha	93,2	0	<i>A. alternata</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Curvularia</i> sp.
4	Remolacha	98,1	0	<i>Graphium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Curvularia</i> sp., <i>A. alternata</i> , <i>Penicillium</i> sp.
5	Remolacha	95,6	0	<i>R. stolonifer</i> , <i>Graphium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Curvularia</i> sp., <i>A. alternata</i> .
6	Pimiento	73,1	0	<i>A. alternata</i> , <i>Fusarium</i> spp.
7	Pimiento	88,9	0	<i>Stemphylium solani</i>
8	Pimiento	90,0	0	<i>S. solani</i> , <i>Curvularia lunata</i>
9	Pimiento	85,5	0	<i>Curvularia lunata</i> , <i>C. pallescens</i>
10	Pimiento	82,8	0	<i>Curvularia pallescens</i>
11	Pimiento	86,8	0	<i>S. solani</i>

En ninguno de los lotes de remolacha y pimiento tratados con benomyl se detectó *Verticillium* spp., lo que demuestra la eficacia de este ingrediente activo para el control de estos patógenos. Esto apoya los informes previos realizados por Du Toit *et al.* (2005).

El agente fungitóxico del benomyl y los demás ingredientes activos del grupo de los benzimidazoles y tiofanatos (thiabendazol, carbendazim y metil tiophanato) es el metil benzimidazol carbamato (MBC). El benomyl o cualquiera de los ingredientes activos del grupo pueden ser utilizados para el control de *Verticillium albo-atrum* y *V. dahliae* en semillas botánicas.

CONCLUSIONES

- El tratamiento con benomyl a la dosis del 1 % de ingrediente activo inhibió las infecciones de *Verticillium albo-atrum* y *V. dahliae* en los ensayos realizados, lo que demostró su eficiencia para el control de estos patógenos en semillas botánicas.
- El tratamiento por inmersión en fludioxonil a la dosis de 5 g i.a./100 kg de semillas redujo el nivel de infección de la semilla, pero no erradicó totalmente las infecciones por *Verticillium* spp.
- El tratamiento con benomyl permitió mejorar la germinación de la semilla a partir del control de

Verticillium spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* y *Phoma*; sin embargo, no controla las infecciones de *Alternaria alternata*.

REFERENCIAS

Acuña, I.; M. Vargas; M. Uribeal: «Tratamiento de semilla y/o surco de plantación sobre la incidencia de Rizoctonias (*Rhizoctonia solani*) en el cultivo de la papa», Proyecto Fondosag 24-10-100 INIA, Chile, 2007.

Barbara, D. J.; E. Clewes: «Plant Pathogenic *Verticillium* Species: How Many of Them Are There?», *Molecular Plant Pathology* 4 (4): 297-305, Inglaterra, 2003.

Bender, C. G.; P. B. Shoemaker: «Prevalence of *Verticillium* wilt of Tomato and Virulence of *Verticillium dahliae* Race 1 and Race 2 Isolates in Western North Carolina», *Plant Disease* 68 (4): 305-309, EE. UU., 1984.

Carder, J. H.; D. J. Barbara: «Molecular Variation and Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) Within and Between Six Species of *Verticillium*», *Mycol. Res.* 95: 935-942, Inglaterra, 1991.

Chen, W.: «Vegetative Compatibility Groups of *Verticillium dahliae* from Ornamental Woody Plants», *Phytopathology* 84: 214-219, EE. UU., 1994.

Fujimura, M.; N. Ochiai; M. Oshima; T. Motoyama; A. Ichiishi; R. Usami; K. Horikoshi; I. Yamaguchi: «Putative Homologs of SSK22 MAPKK Kinase and PBS2 MAPK Kinase of *Saccharomyces cerevisiae* Encoded by os-4 and os-5 Genes for Osmotic Sensitivity and Fungicide Resistance in *Neurospora crassa*», *Bioscience Biotechnol. Biochem.* 67: 186-191, Japón, 2003.

Gasztonyi, M.; H. Lyr: «Miscellaneous Fungicides», *Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanism of Action*, Chapter 19, 2nd ed., Gustav Fischer Verlag, Nueva York, EE. UU., 1995, pp. 389-414.

- Gehmann, K.; R. Nyfeler; A. J. Leadbeater; D. Nevill; D. Sozzi: «CGA173506: a New Phenylpyrrole Fungicide for Broad-Spectrum Disease Control», *Proc. Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis.* 2: 399-406, Inglaterra, 1990.
- Heale, J. B.: «Diversification and Speciation in *Verticillium*-an Overview», *Advances in Verticillium, Research and Disease Managment*, ASP Press, EE.UU., 1997.
- Hu, X.; R. N. Nazar; J. Robb: «Quantification of *Verticillium* Biomass in Wilt Disease Development», *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 23-26, EE. UU., 1993.
- Klisiewicz, J. M.: «Survival and Dissemination of *Verticillium* in Infected Safflower Seed», *Phytopathology* 65 (6): 696-698, EE. UU., 1975.
- Omer, M. A.; D. A. Johnson; R. C. Rowe: «Recovery of *Verticillium dahliae* from North American Certified Seeds Potatoes and Characterization of Strains by Vegetative Compatibility and Aggressiveness», *American Journal of Potato Research* 77 (5): 321-333, EE. UU., 2000.
- McMoran, D.; T. W. Miller; L. J. Du Toit: «Spinach Seed», Northwestern Washington Research & Extension Center, Washington State University, EE. UU., 2002.
- Pegg, G. F.; B. L. Brady: «*Verticillium* Wilts», Wallingford, CABI, Inglaterra, 2002.
- Pérez, L.; M. Pérez; J. Abreus; E. Martínez: «First Report of *Verticillium* Early Dying in Potato Fields in Cuba», *Fitosanidad* 12 (1): 61-62, La Habana, 2008.
- Pérez, L.; M. Pueyo; M. Pérez: «Eficacia del fludioxonil en la desinfección de semilla de arroz contra patógenos fungosos», *Centro Agrícola* 36 (4): 5-12, La Habana, 2009.
- Powelson, M. L.; R. C. Rowe: «Biology and Management of Early Dying of Potatoes», *Annual Review of Phytopathology* 31: 111-126, EE. UU., 1993.
- Rowe, R. C.: «Potato Early Dying-a Serious Threat to the Potato Industry», *American Potato Journal* 62 (4): 157-161, EE. UU., 1985.
- Spek, J. van der: «Seed Transmission of *Verticillium dahliae*», *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 38 (3): 1427-1434, Holanda, 1973.
- Toit, L. J. Du; M. L. Derie; P. Hernández: «*Verticillium* wilt in Spinach Seed Production», *Plant Dis.* 89: 4-11, EE. UU., 2005.
- Tsrar, L.; O. Erlich; S. Amitai; M. Hazanovsky: «*Verticillium* Wilt of Paprika Caused by a Highly Virulent Isolate of *Verticillium dahliae*», *Plant Disease* 82: 437-439, EE. UU., 1998.
- Vallad, G. E.; R. G. Bhat; S. T. Koike; E. J. Ryder; K. V. Subbarao: «Weedborne Reservoirs and Seed Transmission of *Verticillium dahliae* in Lettuce», *Plant Disease* 89: 317-324, EE.UU., 2005.
- Zhang, Y.; R. Lamm; C. Pillonel; S. Lam; J. R. Xu: «Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa* *os-2* Gene Encodes a *HOG1* Mitogen-Activated Protein Kinase Homologue», *Applied and Environmental Microbiology* 68: 532-538, EE. UU., 2002.

SELECCIÓN DE *BACILLUS* SPP. CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* CONTRA *MACROPHOMINA PHASEOLINA* (TASSI) GOID. EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Arturo Reyes Ramírez, Esaú Ruiz Sánchez, Carmen Yam Chimal y Mirza Dzul Chan

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Conkal. Km 16.3 Antigua Carretera Mérida-Motul, Conkal, Yucatán, México, C.P. 97345, arte_rey@hotmail.com

RESUMEN

Se aislaron bacterias del suelo pertenecientes al del género *Bacillus* y se evaluó la actividad antagónica *in vitro* contra el hongo *Macrophomina phaseolina* en diferentes medios de cultivo. Se emplearon los medios papa-dextrosa-agar (PDA), agar nutritivo (AN), agar-soya-tripticasa (TSA) y la mezcla de AN-PDA (2:1). El crecimiento radial de *M. phaseolina* fue de $34,7 \pm 2,5$ mm en PDA, $29,00 \pm 1,0$ mm en AN:PDA, $27,3 \pm 3,1$ mm en AN y $20,00 \pm 3,0$ mm en TSA. Se observó un crecimiento óptimo solo en el medio y mezcla que contenían PDA. Todas las cepas inhibieron el crecimiento micelial de *M. phaseolina* en los medios AN y TSA entre el 38 y el 65 %. Solo la cepa CBCK08 inhibió el crecimiento en todos los medios y mezcla utilizados. El empleo de medio AN y TSA en pruebas de antagonismo permite obtener mayores inhibiciones en el crecimiento de *M. phaseolina* en contraste con el uso de PDA que limitaba el crecimiento de las bacterias antagonicas.

Palabras claves: inhibición de crecimiento, biocontrol, antagonismo

ABSTRACT

Bacteria of genus *Bacillus* were isolated from soil and their antagonistic activity *in vitro* against the fungus *Macrophomina phaseolina* was evaluated in different culture media. The culture media tested were Potato-Dextrose-Agar (PDA), Nutrient Agar (NA), Trypticase-Soy-Agar (TSA) and the mixture NA-PDA (2:1). *M. phaseolina* radial growth was 34.7 ± 2.5 mm in PDA, 29.0 ± 1.0 mm in AN:PDA, 27.3 ± 3.1 mm in NA and 20.0 ± 3.0 mm in TSA. The fungus showed optimal growth in media or mixture containing PDA. All *Bacillus* isolates inhibited *M. phaseolina* micelial growth in media NA and TSA, with percentages in the range of 38 % to 65 %, respectively. Only the isolate CBCK08 inhibited the fungal growth in all media and mixture evaluated. The use of the media NA and TSA in the assays produces higher inhibitory effects on *M. phaseolina* growth, in contrast to the use of PDA where the growth of the antagonistic bacteria is limited.

Key words: growth inhibition, biocontrol, antagonism

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas, aerobias estrictas o aerobias facultativas. Una de las características importantes del género es la formación de endosporas. El género *Bacillus* contiene especies antagonistas de hongos fitopatógenos. Dentro de las especies de *Bacillus* que han mostrado actividad antifúngica *in vitro* sobresalen *Bacillus thuringiensis* contra *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* [Knaak et al., 2007]; *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Colletotrichum* [Kim y Chung, 2004]; *Bacillus subtilis* contra un amplio rango de hongos anamorfos, donde destacan *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y *Macrophomina phaseolina* [Melentev et al., 2006; Singh et al., 2008; Sun et al., 2011; Sosa et al., 2011] y *Bacillus licheniformis* contra *Curvularia lunata* y *Pyricularia grisea* [Tendulkar et al., 2007].

El hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid causa pudrición de raíz, tizón foliar y del tallo y *damping off* en cultivos como frijol, soya, sorgo y maíz [Su et al., 2001; Hernández et al., 2009].

En la selección *in vitro* de cepas antagonistas contra hongos fitopatógenos se realizan ensayos que permitan identificar los antagonistas potenciales. Para esto es necesario realizar pruebas rápidas, reproducibles y simples, que permitan evaluar cantidades elevadas de cepas aisladas. Por ejemplo, los ensayos duales entre *Bacillus* spp. y hongos fitopatógenos se han usado ampliamente con diferentes medios de cultivo de microorganismos, entre los que destacan medio Luria-Bertani (LB) [Huang *et al.*, 2005], agar nutritivo (AN) [Rodas *et al.*, 2009], agar papa dextrosa (PDA) [Kim y Chung, 2004] y mezcla de medios [Souto *et al.*, 2004]. El éxito del ensayo es que ambos microorganismos puedan crecer en el medio utilizado. El objetivo del trabajo fue evaluar tres medios de cultivos PDA, AN, TSA, y la mezcla de AN-PDA para determinar la actividad antifúngica *in vitro* de cepas nativas de *Bacillus* spp. contra el fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Para el aislamiento de cepas se colectaron aproximadamente 200 g de suelo en los primeros 10 cm de profundidad de diferentes cultivos en el municipio de Conkal, Yucatán, México. El material se colocó en bolsas de plástico y se almacenó inmediatamente a 4 °C hasta su procesamiento.

Aislamiento y caracterización de cepas

El aislamiento de cepas se realizó de acuerdo con el método informado por Ohba y Aizawa (1986). Se pesó 1 g de cada muestra de suelo y se suspendió en 9 mL de agua destilada estéril en un tubo de centrifuga de fondo cónico de 15 mL y se homogenizó vigorosamente en un vórtex durante 3-5 min. Posteriormente los tubos se colocaron a 80 °C por 15 min y se sembró 200 µL de una dilución final de 1:200 en una placa Petri de 100 x 15 mm con medio agar nutritivo (AN), y se incubó a 28 ± 2°C durante 24 h. Se seleccionaron colonias aisladas blanquecinas, opacas y aplanadas de bordes irregulares que se sembraron en forma individual en AN para determinar forma bacilar, la formación de endosporas, tinción de Gram positiva y prueba de catalasa positiva, características del género [Sneath, 1986]. Se seleccionaron cepas por sus características antes descritas y fueron catalogadas como integrantes del género *Bacillus*.

Evaluación de medios de cultivo en el crecimiento de *M. phaseolina*

Para determinar el efecto de la composición del medio en el crecimiento radial de *M. phaseolina* se sembró un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo fúngico de diez días de incubación en el centro de una placa Petri de 100 x 15 mm con diferentes medios como agar nutritivo (AN) pH 7.0, agar-papa-dextrosa (PDA) pH 5,8, mezcla de AN:PDA (relación 2:1) pH 6,0 y agar-soya-tripticosa (TSA) pH 7,0. Se midió el crecimiento radial de la colonia fúngica a través del tiempo.

Actividad antifúngica *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp.

Para los bioensayos de confrontación tipo dual se utilizaron los mismos medios y mezcla antes mencionados. Se inoculó cada cepa de *Bacillus* spp. a una distancia de 1,5 cm del borde de la placa Petri y el hongo fitopatógeno en el centro. Se colocaron de dos a cuatro cepas bacterianas por caja y se incubaron a 30 °C. La inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* se determinó por el crecimiento radial de la colonia fúngica por tres días en comparación con el testigo, que consistió en el crecimiento del hongo sin la presencia de antagonistas.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias de Tukey, con una confiabilidad de 0,05. Se usó un diseño completamente al azar. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico se calculó de acuerdo con la fórmula reportada por Lokesh y Benagi (2007).

$$I = \frac{C - T}{C} 100$$

donde:

I: Porcentaje de inhibición

C: Crecimiento en el testigo

T: Crecimientos en los tratamientos

Para su análisis los datos de porcentajes de inhibición se transformaron con la fórmula $\arcsin \sqrt{x}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de *M. phaseolina* en diferentes medios

El crecimiento radial de *Macrophomina phaseolina* en los diferentes medios fue entre 20 y 34,7 mm a las 48 h

de incubación (Tabla 1). No se observó diferencia significativa en el crecimiento de *M. phaseolina* en los dos medios que contienen PDA. Se observó diferencia significativa únicamente al utilizar solo PDA y AN. El crecimiento radial en medio TSA fue significativamente menor comparado con los otros medios utilizados. En todos los medios el crecimiento de *M. phaseolina* cubrió la superficie

del medio en la placa Petri a las 72 h, con excepción del crecimiento en TSA, donde no cubrió la totalidad de la superficie aun después de 144 h. Los resultados muestran que el crecimiento de *M. phaseolina* se observa en todos los medios de cultivos, pero solo en los que contienen PDA existió un desarrollo óptimo por la rapidez de crecimiento y coloración característica del hongo esporulado.

Tabla 1. Crecimiento radial de *M. phaseolina* a las 48 h de incubación a 30 °C en diferentes medios de cultivos

Medio de cultivo	pH del medio	Crecimiento radial (mm)
PDA	5,8	34,7 ± 2,5 a
AN:PDA	6,0	29,0 ± 1,0 ab
AN	7,0	2,3 ± 3,1 b
TSA	7,0	20,0 ± 3,0 c

PDA: Agar-papa-dextrosa.

AN: Agar nutritivo.

TSA: Agar-soya-tripticasa.

Medias con literales iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

Inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* en diferentes medios de cultivos por cepas de *Bacillus* spp.

La confrontación tipo dual se realizó en los medios PDA, AN, TSA y mezcla de AN: PDA. En el caso del medio PDA, solo la cepa CBCK08 inhibió el crecimiento micelial de *M. phaseolina*, y fue esta la única cepa que mostró inhibición del crecimiento en todas los medios y mezcla utilizados (Tabla 2). En el caso de las demás cepas evaluadas no se observó inhibición del crecimiento o formación de halo de inhibición en el medio PDA. El crecimiento de *M. phaseolina* alcanzó la totalidad de la placa a las 72 h. Debido a la velocidad de crecimiento del hongo y a la falta de actividad de los antagonistas, el hongo sobrecreció a las cepas bacterianas; sin embargo, en la mezcla AN:PDA (2:1) se observó que las cepas CBCK03, CBCK05, CBCK12, CBCK16, y CBCK19 inhibieron el crecimiento de *M. phaseolina*, debido probablemente a que la mezcla contenía una relación mayor de AN, lo que favoreció el crecimiento bacteriano.

En el medio TSA todas las cepas inhibieron el crecimiento de *M. phaseolina* entre el 38,7 y el 59,9%. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de inhibición causado por las cepas bacterianas. Este medio presenta una composición y pH óptimos para el crecimiento bacteriano, y en menor medida para el crecimiento de *M. phaseolina*. En las evaluaciones del medio AN, to-

das las cepas bacterianas inhibieron el crecimiento micelial del hongo entre el 47,3 y el 65,9 %, y las cepas CBCK12, CBCK16 y CBK19 mostraron una inhibición del crecimiento significativamente igual a la cepa CBKC08. Se observó contacto entre las cepas bacterianas y el hongo entre las 48 y 72 h. En todas las cepas bacterianas de los ensayos en AN se observó crecimiento de la bacteria sobre *M. phaseolina* en diferentes medidas.

El efecto de la composición del medio en el crecimiento de *M. phaseolina* fue observado por Afouda *et al.* (2001), quienes al evaluar 21 bacterias antagónicas observaron actividad antagónica de todas ellas cuando utilizaron medio TSA; pero solo tres cepas mostraron actividad en cuanto usaron los medios TSA, PDA y King B. Por otra parte, cuando se evaluó la capacidad antagónica de *B. cereus* y *B. subtilis* en medio AN, El-Hamshary *et al.* (2008) encontraron que las cepas no inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum*; sin embargo, las mismas cepas mostraron efecto significativo en el crecimiento del hongo cuando se utilizó medio agar King completo.

Un mecanismo de antibiosis en la inhibición del crecimiento puede deberse a la producción de metabolitos difusibles en el medio, El ensayo dual permite observar la producción de compuestos difusibles, ya que se observa una inhibición del crecimiento radial del hongo sin un contacto entre las cepas. Esto puede deberse a la

producción de enzimas hidrolíticas, como quitinasas y β -1-3-glucanasas [Prapagdee *et al.*, 2008], y de compuestos antibióticos que pueden difundirse por el medio que favorece la inhibición del crecimiento radial del hongo [Leifert *et al.*, 1994]. La composición del medio puede afectar la producción de metabolitos. Kumar *et al.* (2009) observaron una máxima producción de compuestos antifúngicos de *B. subtilis* en medio de caldo de soya tripticasa y una pobre producción en caldo nutritivo. La cepa CBCK08 produce metabolitos en medio de PDA,

lo que permite la inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* en este medio de cultivo. Adicionalmente la cepa CBCK08 mostró tener actividad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Colletotrichum* sp. en porcentajes similares a los mostrados contra *M. phaseolina* en medio PDA (Tabla 3). La cepa inhibió a los fitopatógenos por competencia de espacio, así como por la producción de metabolitos difusibles en el medio, debido a la observación de halos de inhibición que no permitieron el contacto entre los microorganismos.

Tabla 2. Efecto de la composición del medio en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Macrophomina phaseolina* por cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	Porcentaje de inhibición (%)			
	PDA	AN:PDA	TSA	AN
CBCK03	–	47,6 $\pm$ 10,9 ab	45,6 $\pm$ 9,1 a	52,6 $\pm$ 2,4 b
CBCK04	–	–	38,7 $\pm$ 9,5 a	47,3 $\pm$ 3,4 b
CBCK05	–	40,9 $\pm$ 3,7 bc	57,6 $\pm$ 10,7 a	51,4 $\pm$ 1,3 b
CBCK08	41,1 $\pm$ 7,3	60,5 $\pm$ 4,3 a	59,9 $\pm$ 4,8 a	65,5 $\pm$ 10,1 a
CBCK09	–	–	44,8 $\pm$ 4,4 a	48,9 $\pm$ 1,9 b
CBCK12	–	25,8 $\pm$ 9,4 c	48,5 $\pm$ 8,0 a	57,9 $\pm$ 5,0 ab
CBCK16	–	45,9 $\pm$ 8,2 ab	58,3 $\pm$ 5,9a	64,6 $\pm$ 4,4 a
CBCK19	–	55,6 $\pm$ 6,0 ab	53,3 $\pm$ 4,6 a	65,9 $\pm$ 4,3 a

–: No existió inhibición. El crecimiento del hongo fue superior al crecimiento bacteriano. Medias que comparten literales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

Tabla 3. Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por la cepa *Bacillus* sp. CBCK 08 en medio PDA

Hongo	Días de incubación	Porcentaje de inhibición (%)	Medias de halo de inhibición (mm)
<i>M. phaseolina</i>	3	35,1 $\pm$ 1,8 a	4,3 $\pm$ 0,58 b
<i>Fusarium</i> sp.	8	33,6 $\pm$ 6,3 a	4,7 $\pm$ 0,58 ab
<i>Alternaria</i> sp.	11	32,4 $\pm$ 4,9 a	ND
<i>Colletotrichum</i> sp.	13	40,5 $\pm$ 3,5 a	6,5 $\pm$ 0,70 a

ND: No determinado. Medias con literales iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

CONCLUSIONES

- Se aislaron ocho cepas de *Bacillus* spp. con actividad antagonica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* en medio AN.
- Las cepas CBCK03, CBCK05, CBCK12, CBCK16, y CBCK19 muestran antagonismo en mezcla de medio de AN-PDA.

- Se seleccionó a la cepa CBCK08 con potencial antagonista por su actividad antagónica mostrada en todos los medios utilizados.

REFERENCIAS

- Afouda, L.; K. Wydra; D. Schulz; G. Wolf: «Studies on Biological Control of Charcoal Rot of Cowpea (*Vigna unguiculata*), Caused by *Macrophomina phaseolina*, with Bacterial Antagonists. Tri-Trophic Interactions in the Rhizosphere», *IOBC/wprs Bulletin* 24 (1): 1-4, Francia, 2001.
- El-Hamshary, O. I. M.; S. EM. Abo-Aba; N. Awad; A. M. Gomaa: «Genetic Profile of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* Indigenous Isolates and Their Performance As Bio-Control Agent Against the Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*», *Research Journal of Cell and Molecular Biology* 2 (2): 30-38, Turquía, 2008.
- Hernández, S.; M. H. Reyes; R. Rosales; N. Mayek: «Molecular Markers Associated with Resistenceto *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in Common Bean», *Journal of Plant Pathology* 91 (1): 163-170, Italia, 2009.
- Huang, C. J.; T. K. Wang; S. C. Chung; C. Y. Chen: «Identification of An Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9», *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38 (1): 82-88, Corea, 2005.
- Kim, P. I.; K. C. Chung: «Production of an Antifungal Protein for Control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908», *FEMS Microbiology Letters* 234: 177-183, Inglaterra, 2004.
- Knaak, N.; A. A. Rohr; L. M. Fiuza: «*In vitro* Effect of *Bacillus thuringiensis* Strains and Cry Proteins in Phytopathogenic Fungi of Paddy Rice-Field», *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 526-530, Brasil, 2007.
- Kumar, A.; P. Saini; J. N. Shrivastava: «Production of Peptide Antifungal Antibiotic and Biocontrol Activity of *Bacillus subtilis*», *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 57-62, India, 2009.
- Leifert, C.; E. C. Morris; M. Waites Will: «Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue and Field Grown Plant: Reasons for Contaminations Problems *in vitro*», *Critical Reviews in Plant Sciences* 13 (2): 139-183, EE. UU., 1994.
- Lokesha, N. M.; V. L. Benagi: «Biocontrol Management of Pigeonpea Dry Root Caused by *Macrophomina phaseolina*. Karnataka», *Journal of Agricultural Sciences* 20: (1): 54-56, Inglaterra, 2007.
- Melentev, A. I.; P. Helisto; L. Y. Kuzmina; N. F. Galimzyanova; G. E. Aktuganov; T. Korpela: «Use of Antagonistic Bacilli for Biocontrol of Fungi Degrading Fresh Wood», *Applied Biochemistry and Microbiology* 42 (1): 70-75, EE. UU., 2006.
- Ohba, M.; K. Aizawa: «Insect Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soils in Japan», *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 12-20, Holanda, 1986.
- Prapagdee, B.; C. Kuekulvong; S. Mongkolsuk: «Antifungal Potential of Extracellular Metabolite Produced by *Streptomyces hygroscopicus* Against Phytopathogenic Fungi», *International Journal of Biological Sciences* 4 (5): 330-337, Canadá, 2008.
- Rodas, B. A.; H. F. Magana; J. M. Tun; A. Reyes: «Antifungal Activity *in vitro* of Native *Bacillus* sp. Strains Against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid», *Research Journal of biological Sciences* 4 (9): 985-989, Pakistán, 2009.
- Singh, N.; P. Pandey; R. C. Dubey; D. K. Maheswari: «Biological Control of Root Rot Fungus *Macrophomina phaseolina* and Growth Enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by Rhizosphere Competent *Bacillus subtilis* BN1», *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (9): 1669-1679, EE. UU., 2008.
- Sneath, P. H. A.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, EE. UU., 1986, pp. 1104-1207.
- Sosa, L. A. I.; R. V. P. Álvarez; G. B. Borges; G. M. González; G. E. Ponce: «Evaluación del método de conservación en papel de filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* Cohn, mediante la actividad antagónica frente a *Rhizoctonia solani* Kühn», *Fitosanidad* 15 (1): 45-49, La Habana, 2011.
- Souto, G. I.; O. S. Correa; M. S. Montecchia; N. L. Kerber; N. L. Pucheu; M. Bachur; A. F. García: Genetic and Functional Characterization of a *Bacillus* sp. Strain Excreting Surfactin and Antifungal Metabolites Partially Identified As Iturin-Like Compounds», *Journal of Applied Microbiology* 97: 1247-1256, Inglaterra, 2004.
- Su, G.; S. O. Suh; R. W. Schneider; J. S. Russin: «Host Specialization in the Charcoal Rot Fungus *Macrophomina phaseolina*», *Phytopathology* 91: 120-126, EE. UU., 2001.
- Sun, J. B.; M. Peng; Y. G. Wang; P. J. Zhao; Q. Y. Xia: «Isolation and Characterization of Antagonistic Bacteria Against *Fusarium* Wilt and Induction of Defense Related Enzymes in Banana 0187», *African Journal of Microbiology Research* 5 (5): 509-515, Nigeria, 2011.
- Tendulkar, S. R.; Y. K. Saikumari; V. Patel; S. Raghotama; T. K. Munshi; P. Balaram; B. B. Chattoo: «Isolation, Purification and Characterization of an Antifungal Molecule Produced by *Bacillus licheniformis* BC98 and Its Effect on Phytopathogen *Magnaporthe grisea*», *Journal of applied microbiology* 103: 2331-2339, Inglaterra, 2007.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE *NAVISPORUS FLOCCOSUS* Y *GANODERMA* SP. CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS

Jorge R. Palacios Atencio,¹ Carlos R. Romeu Carballo,¹ Rebeca Ramírez Ochoa,¹ Vivian Leliebre Lara² y Jorge L. Ortiz Medina³

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, La Habana, C.P. 11600, jpalacios@inisav.cu

² Facultad de Química, Laboratorio de Productos Naturales, Universidad de La Habana. Calle Zapata s/n e/ Mazón y G, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, C.P. 10400

³ Instituto de Ecología y Sistemática. Carretera de Varona Km 3½, Capdevila, Boyeros, A.P. 8029, La Habana, C.P. 10800

RESUMEN

Los hongos basidiomicetos son productores de algunos metabolitos que presentan actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticancerígena, etc. Su uso en medicina y la agricultura muestra resultados alentadores en las últimas décadas. En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de extractos obtenidos a partir de la fermentación en estado líquido de los hongos basidiomicetos *Navisporus floccosus* (Bres), *Ryvarden* y *Ganoderma* sp. frente a los hongos fitopatógenos *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan y *Curvularia clavata* B. L. Jain. Los basidiomicetos fueron inoculados en medio líquido YMPG y la fermentación se realizó a 100 r.p.m. de agitación por veintidós días a 28 °C. El cultivo se filtró, la biomasa se extrajo con metanol y el filtrado con acetato de etilo. Los extractos se concentraron hasta sequedad, y en los residuos se evaluó la actividad antifúngica. Los crudos obtenidos a partir del filtrado a una concentración de 5 mg × mL⁻¹ inhibieron el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos y la germinación conidial de *C. clavata* con valores similares a los controles positivos tebuconazol y dimetomorf preparados a 0,05 mg × mL⁻¹.

Palabras claves: plaguicidas microbianos, hongos entomopatógenos, extractos

ABSTRACT

Basidiomycete fungi produce some bioactive compounds with antibacterial, antiviral and antifungal activities. This capacity has facilitated their use in agriculture and medicine, recently. Antifungal activity evaluation of *Navisporus floccosus* (Bres), *Ryvarden* and *Ganoderma* sp. extracts against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan and *Curvularia clavata* B. L. Jain was the purpose of this work. *Basidiomycete fungi* were grown on YMPG liquid media and were shaken to 100 rpm at 28 °C for 21 days. The culture was separated filtration, biomass was extracted with methanol and filtrate was extracted with ethyl acetate. Both extracts were concentrated to dry and the antifungal activity was evaluated in residuals. Filtrated extracts at 5 mg × mL⁻¹ inhibited the mycelial growth of phytopathogenic fungi and conidial germination of *C. clavata* with similar values of positive control tebuconazole and dimethomorph at 0.05 mg × mL⁻¹.

Key words: microbial pesticides, entomogenous fungi, extracts

INTRODUCCIÓN

Debido al aumento demográfico mundial, se ha elevado la demanda de producción de alimentos. El hombre, en su afán de obtener, proteger y asegurar sus producciones agrícolas ha optado por el uso indiscriminado, y muchas veces inconsciente de los plaguicidas químicos. Esto ha provocado consecuencias negativas directas e indirectas sobre los suelos, aguas y los mismos seres humanos. Es por eso que han surgido programas como

el manejo integrado de plagas que promueven el uso y aplicación de alternativas que le permitan al hombre subsanar su necesidad de producción de alimentos y protección de sus cultivos, pero desde un enfoque más amigable con el ambiente [Fuentes, 2011].

Los productos naturales como una alternativa para el control de plagas normalmente son biodegradables, es-

pecíficos en cuanto a su radio de acción, y provocan menos impacto en la salud humana y el ecosistema que los plaguicidas convencionales. Es por eso que pueden incorporarse a programas de manejo integrado de plagas y servir de base para el desarrollo de nuevas clases de plaguicidas [Isman *et al.*, 2011].

Existen hongos cuyos metabolismos son capaces de desarrollar sustancias que pueden usarse en el control de hongos fitopatógenos. Compuestos aromáticos aislados de *Periconia atropurpurea*, hongo endofítico aislado de hojas de *Xylopiia aromatica*, han mostrado actividad antifúngica comparada con la nistatina contra *Cladosporium sphaerospermum* y *C. cladosporioides* [Teles *et al.*, 2006]. Sordaricin, un metabolito aislado del hongo *Xylaria* sp. presenta actividad antifúngica moderada contra *Candida albicans* [Liu *et al.*, 2008]. Naftoquinonas espiroquetales aisladas de *Edenia gomezpompae*, hongo aislado de hojas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), mostraron actividad significativa contra *Phytophthora capsici*, *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum* [Macías-Rubalcava *et al.*, 2008]. Estrobirulinas A y B, sustancias extraídas del micelio *Strobirulus tenecellus* (Pers.) Singer ejercen un efecto antifúngico contra hongos *Oomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, anamorfos y levaduras [Anke y Oberwinkler, 1977].

Diversos grupos de aproximadamente cuatrocientos compuestos químicos, tales como triterpenos, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, nucleósidos, esteroides, alcaloides, ácidos grasos y enzimas se han aislado de especies de hongos basidiomicetos *Ganoderma* [Wasser y Weis, 1999; Wasser *et al.*, 2002], y se ha demostrado que los constituyentes más importantes desde el punto de vista farmacológico son triterpenos y polisacáridos [Boh *et al.*, 2004].

En cuanto al género *Navisporus*, perteneciente a la familia *Polyporaceae*, no se le conoce efecto antifúngico, aunque Sheenna *et al.* (2003) reportaron la actividad antibacteriana de *N. floccosa* contra *Escherichia coli* (Migula), *Pseudomonas aeuroginosa* (Schroeter) Migula, *Staphylococcus aureus* (Ogston), *Salmonella typhimurium* (Loeffter) y *Bacillus subtilis* (Mendelson).

En el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica de los extractos obtenidos a partir del filtrado líquido y biomasa de *N. floccosus* y *Ganoderma* sp. contra los hongos fitopatógenos *Phytophthora nicotianae* y *Curvularia clavata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

N. floccosus (NavP) fue aislado de tronco seco de jagüey (*Ficus benjamina* L.) y *Ganoderma* sp. (GanP) fue aislado de ocuje (*Calophyllum antillanum* (Britt.)). Ambas colecciones se realizaron en el municipio de Playa, La Habana. Las identificaciones taxonómicas de los hongos se realizaron de acuerdo con la clave descrita por Decock y Herrera (2000). Los hongos se aislaron según lo recomendado por Stamets y Chilton (1983), y se conservaron por el método de Burdsall y Dorworth (1994). Posteriormente los aislados se inocularon en medio agar papa dextrosa (PDA) para los estudios de actividad biológica.

Para tales estudios se prepararon, por cada aislado, cuatro erlenmeyers de 200 mL de capacidad con 50 mL de medio YMPG (extracto de levadura al 0,3 %, extracto de malta al 0,3 %, peptona al 0,5 % y glucosa al 0,1 % con un pH = 5,5). El medio se esterilizó a 121 °C con 1,5 atm de presión.

A los siete días de crecimiento de los basidiomicetos en medio PDA, se tomaron cinco porciones de 5 mm de diámetro del borde del micelio y se inocularon asépticamente en el medio YMPG, para comenzar una fermentación líquida con 28 ± 2 °C de incubación y 100 r.p.m. de agitación por veintiún días.

Concluida la fermentación se separaron las biomásas de los filtrados líquidos. Se procedió según la metodología propuesta por Rosa *et al.* (2003), la biomasa se secó a 40 °C durante 36 h, se maceró en metanol por espacio de 72 h, y la extracción del filtrado líquido se realizó con acetato de etilo. Ambos extractos se concentraron a presión reducida y se redisolviéron en metanol a una concentración de 5 mg × mL⁻¹.

Como fitopatógenos diana se seleccionó una cepa de *C. clavata*, hongo anamorfo asociado a un complejo de hongos fitopatógenos que causan el oscurecimiento y manchado del grano en el arroz [Neninger *et al.*, 2003], y una cepa de *P. nicotianae*, oomiceto causante de la pata prieta en el tabaco, una de las enfermedades de mayor repercusión económica en la producción tabacalera nacional por las cuantiosas pérdidas que puede ocasionar, tanto en semillero como en las plantaciones [Espino, 1996]. Las cepas se sembraron en placas Petri de 9 cm de diámetro con PDA, y se incubaron a 28 ± 2 °C durante siete días.

Para la germinación de conidios de *C. clavata* se colocan de dos a tres porciones del micelio de 5 mm de diámetro sobre hojas de Don Carlos (*Sorghum halepense* L. Pers.) previamente colocadas en agar-agua. Después de 72 h ocurre el crecimiento fúngico sobre las

hojas y se pueden observar los conidios al estereoscopio. Luego se toman las hojas cebo y se transfieren a un elermeyer de 50 mL de medio líquido papa dextrosa que se agita manualmente para liberar las esporas.

La evaluación del efecto sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos por los extractos bioactivos se realizó por el método en pocillos de Hur *et al.* (2003). En placa Petri de 9 cm con PDA se abrió en el centro una cavidad de 8 mm de diámetro, donde se colocó un papel de filtro de iguales dimensiones. Posteriormente los pocillos se llenaron con 200 μL de los extractos a $5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$, se dejó evaporar el disolvente, luego se sembró una porción de 5 mm de diámetro del hongo fitopatógeno sobre el papel de filtro y se incubó a 28°C durante siete días. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (% IC) según la fórmula de Abbott modificada por Imtiaj y Lee (2007), donde:

$$\% \text{IC} = \frac{\text{DCC} - \text{DCT}}{\text{DDC}} 100$$

DCC: Diámetro de la colonia control

DCT: Diámetro de la colonia tratada

Se utilizaron cuatro réplicas por tratamiento. Como control positivo se tomaron los fungicidas químicos tebuconazol, del grupo de los triazoles, efectivo contra hongos anamorfos, y dimetomorf, del grupo de las amidas, efectivo contra oomicetos, a una concentración de $0,05 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ y PDA como control negativo.

A los datos obtenidos de las evaluaciones de la efectividad de los extractos contra cada patógeno de forma individual se les realizó un análisis de varianza de clasificación simple por el programa estadístico Stadgraphics

5.0, con comparación de medias por la prueba de Duncan para $p \leq 0,05$.

Para la evaluación del efecto sobre la germinación de esporas de *C. clavata* se empleó el método de placa delgada descrito por Philip *et al.* (1984) con la variante de la utilización de papa dextrosa como medio de cultivo. En una placa cromatográfica de $25 \times 25 \text{ cm}$, cubierta de gel de sílice ($0,5 \text{ mm}$ de espesor) se aplicaron 10, 20, 40 y $100 \mu\text{L}$ equivalentes a 50, 100, 200 y $500 \mu\text{g}$ de la mezcla de metabolitos extraídos. Después de evaporado el solvente se asperjaron 10 mL de suspensión de esporas del hongo fitopatógeno *C. clavata*. La placa se incubó por espacio de cuatro días a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ en cámara húmeda ($\text{Hr} > 95\%$) y oscuridad. En otra placa se utilizó tebuconazol a $0,05 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ como control positivo. Esto se realizó para evitar interferencias que provoquen falsos positivos del efecto del fungicida químico con los extractos. Se evaluó cualitativamente la inhibición de la germinación de esporas según el halo de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* se listan los resultados del efecto de los extractos fúngicos sobre el crecimiento micelial de los patógenos. Todos los extractos presentaron un notable efecto sobre el desarrollo de los patógenos diana. Los obtenidos a partir de la biomasa inhibieron el crecimiento micelial de los patógenos estudiados, aunque su efectividad con respecto a los otros crudos y los estándares químicos resultó poco significativa, mientras que los extractos del filtrado líquido resultaron ser los más activos, con una significativa actividad fungistática sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos. Las *Figs. 1 y 2* muestran la toxicidad de los extractos de ambos basidiomicetos contra los patógenos en estudio.

Tabla I. Efecto de inhibición de crecimiento micelial de *C. clavata* y *P. nicotianae* por extractos de *N. floccosus* y *Ganoderma* sp. Método en pocillos

Extractos en metanol ($5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$)	Inhibición (%)	
	<i>C. clavata</i>	<i>P. nicotianae</i>
<i>N. floccosus</i> (biomasa)	27,7 c	32,6 b
<i>Ganoderma</i> sp. (biomasa)	10,9 b	27,4 b
<i>N. floccosus</i> (filtrado líquido)	83,3 e	100 d
<i>Ganoderma</i> sp. (filtrado líquido)	48,8 d	53,3 c
Dimetomorph ($50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$)	–	100 d
Tebuconazol ($50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$)	57,4 d	–
PDA	0 a	0 a

– No evaluado.

Letras diferentes indican diferencias significativas para la prueba de Duncan con $p \leq 0,05$.

El extracto obtenido a partir del filtrado de *Ganoderma* sp. registró el 53,3 % de toxicidad sobre el crecimiento de *P. nicotianae*, mientras que con *C. clavata* la inhibición fue del 48,8 %, valor cercano al del estándar positivo tebuconazol con 57,4 %.

El extracto obtenido a partir del filtrado líquido de *N. floccosus* registró un significativo efecto de inhibición de crecimiento micelial de *P. nicotianae* con el 100 %, valor similar al del estándar positivo dimetomorf. Otro de los resultados interesantes de este filtrado para este estudio fue el 83,3 % de toxicidad sobre el crecimiento de *C. clavata*, valor superior al 57,4 % alcanzado por el tebuconazol, fungicida utilizado como control positivo. Los estudios del efecto antifúngico de estos extractos a

partir de esta especie en Cuba constituyen los primeros de su tipo, por lo que sería interesante realizar estudios posteriores sobre los compuestos activos que la conforman para comprobar su toxicidad, no solo sobre estos patógenos, sino también contra otros de importancia en el sector agrícola.

Aunque existe escasa literatura acerca de estudios sobre la efectividad de los extractos de hongos basidiomicetos contra hongos fitopatógenos, sí se han encontrado resultados similares a los obtenidos con *P. nicotianae* por Hur *et al.* (2003) con extractos de líquenes *Heterodermia* sp. con actividad antifúngica, frente a *Oomycetes* como *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. graminicola* Subrayan, *P. ultimum* var. *ultimum* Trow y *Pythium* sp.

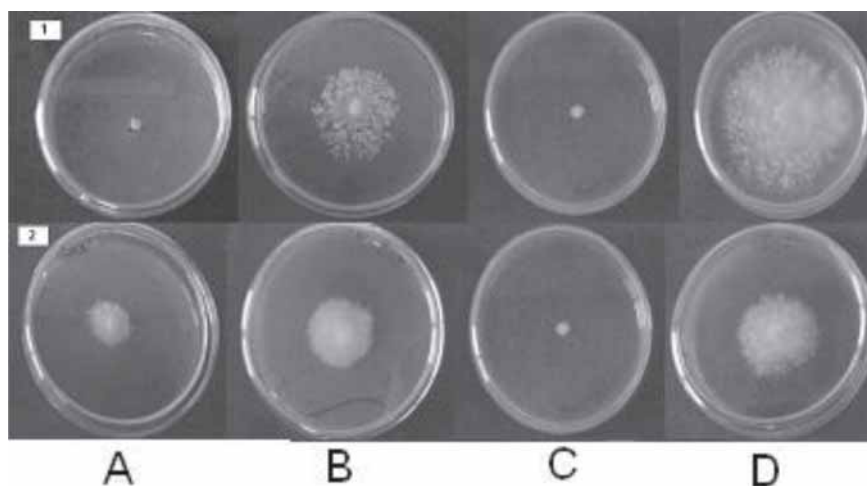


Figura 1. Inhibición de crecimiento micelial de *P. nicotianae* por extractos de *N. floccosus* (1) y *Ganoderma* sp. (2). Método en pocillos. A: filtrado líquido, B: biomasa, C: dimetomorf, D: PDA.

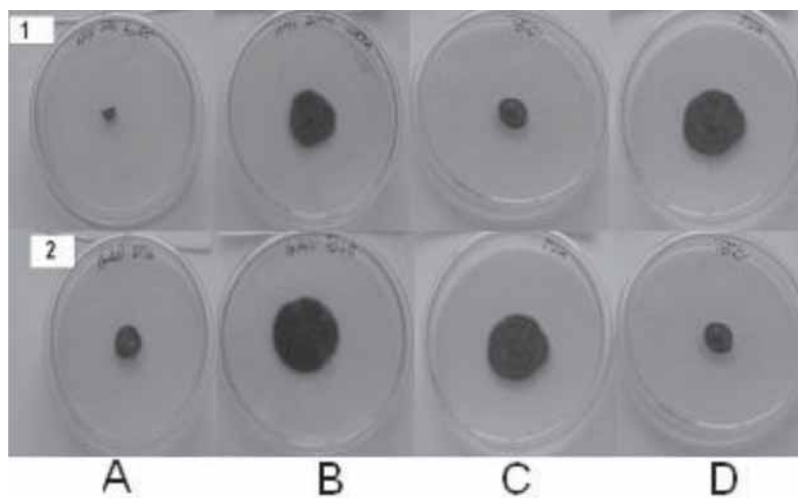


Figura 2. Inhibición de crecimiento micelial de *C. clavata* por extractos de *N. floccosus* (1) y *Ganoderma* sp. (2). Método en pocillos. A: filtrado líquido, B: biomasa, C: tebuconazol, D: PDA.

Los crudos del filtrado líquido de ambos basidiomicetos inhibieron la germinación de *C. clavata* a bajas concentraciones (Tabla 2), mientras que los extractos a partir de las biomasa no ejercieron efecto alguno. El efecto antifúngico de *Ganoderma* sp. se mostró hasta 40 μ L equivalentes a 200 μ g del crudo. Por su parte, *N. floccosus* produjo inhibición en todas las concentraciones utilizadas, resultado interesante si se tiene en cuenta que el

efecto se debe a un crudo que presenta una mezcla de metabolitos y no a un compuesto puro. En este tipo de extracto la actividad biológica puede deberse a uno o a varios de los metabolitos presentes, cuya proporción en el crudo puede variar desde el 10 % hasta valores inferiores al 0,1 % [Itokawa *et al.*, 1993; Mesa *et al.*, 2004]. En la Fig. 3 se muestra el efecto de los extractos de ambos basidiomicetos sobre la germinación conidial de *C. clavata*.

Tabla 2. Inhibición de la germinación de conidios de *C. clavata* por los extractos del filtrado líquido. Método en placa delgada

Volumen aplicado (μ L)	<i>N. floccosus</i> (5μ g $\times \mu$ L ⁻¹) Filtrado líquido	<i>N. floccosus</i> (5μ g $\times \mu$ L ⁻¹) Biomasa	<i>Ganoderma</i> sp. (5μ g $\times \mu$ L ⁻¹) Biomasa	<i>Ganoderma</i> sp. (5μ g $\times \mu$ L ⁻¹) Filtrado líquido	Metanol ($0,05 \mu$ g $\times \mu$ L ⁻¹)	Tebuconazol ($0,05 \mu$ g $\times \mu$ L ⁻¹)
100	+	–	–	+	–	x
40	+	–	–	+	–	+
20	+	–	–	–	–	+
10	+	–	–	–	–	+

+: Inhibió germinación. –: No inhibió germinación. x: No evaluado.

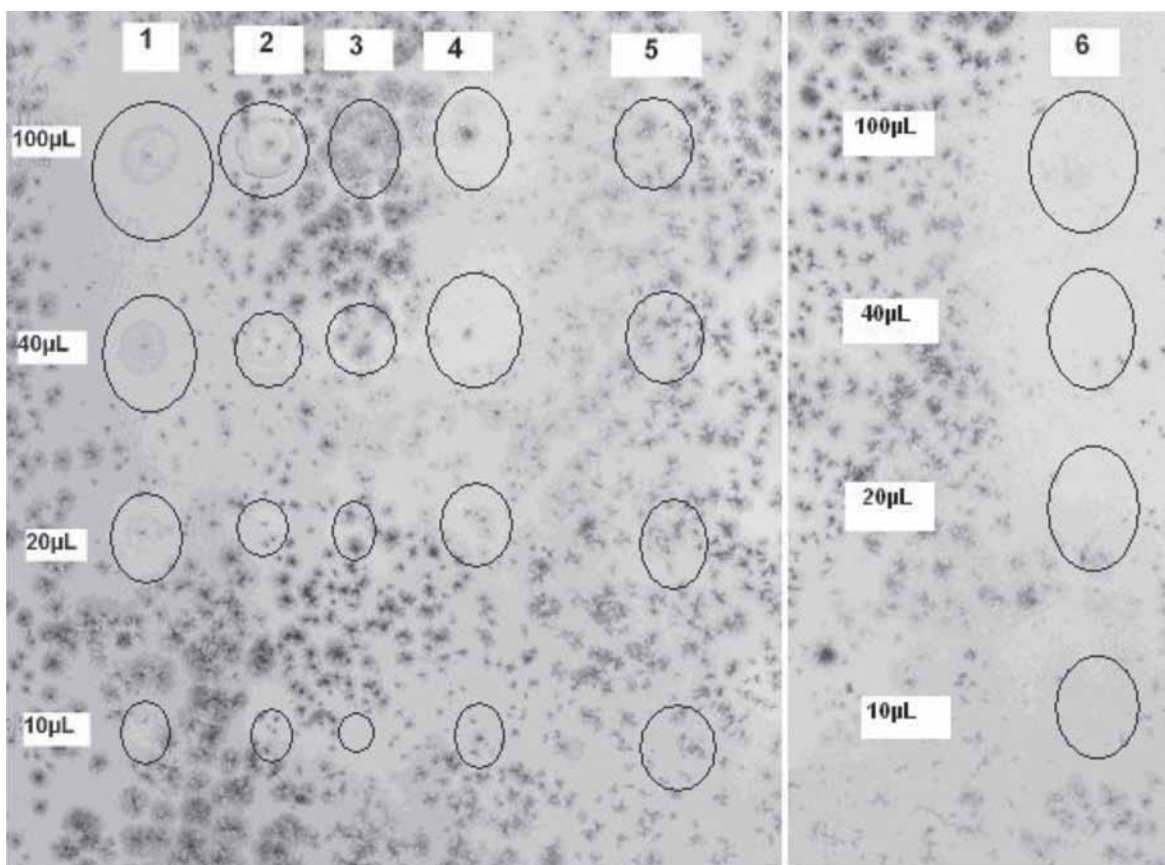


Figura 3. Inhibición de la germinación de conidios de *C. clavata* por los extractos de *N. floccosus* y *Ganoderma* sp. Método en placa delgada. 1 y 4: Extractos del filtrado líquido, 2 y 3: Extractos de la biomasa, 5: Metanol, 6: Tebuconazol.

CONCLUSIONES

- Los extractos a partir del filtrado líquido de *Ganoderma* sp. y *N. floccosus* presentan potencial como agentes antifúngicos al inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *C. clavata* y *P. nicotianae*.
- *N. floccosus* exhibió una inhibición superior a *Ganoderma* sp. y al control químico.
- Los extractos de biomasa de *Ganoderma* sp. y *N. floccosus* también mostraron efecto inhibitorio, aunque en bajos niveles.

REFERENCIAS

- Anke, T.; F. Oberwinkler: «The Strobirulins New Antifungal Antibiotics from the Basidiomycetes *Strobirulus tenacellus*», *J. Antibiot.* 30: 806-810, EE. UU., 1977.
- Boh, B.; M. Berovic; B. Wraber; D. Hodzar; J. Habijanec; F. Pohleven; I. Zore: «*Ganoderma lucidum* and *Ganoderma applanatum* from Slovenian Habitats: Cultivation, Isolation, and Testing of Active Compounds», *Int. J. Med. Mushrooms* 6: 15-32, Ljubljana, Slovenia, 2004.
- Burdsall, H. Jr.; E. B. Dorworth: «Preserving Cultures of Wood-Decaying Basidiomycotina Using Sterile Distilled Water», *Mycologia* 6: 275-280, EE. UU., 1994.
- Decock, C.; S. Herrera: «Studies in *Perenniporia*. *Navisporus ortizii*, a Synonym of *Perenniporia martius*, and a Note on *Navisporus* and *Perrenporia* in Cuba», *Cryptog. Mycol.* 21 (3): 153-162, 2000.
- Espino, M. E.: *Cuban.s Cigar Tobacco*, TFH Publication, EE. UU., 1996.
- Fuentes, J. D.: Propuesta: «Extracto botánico acuoso de *Artemisia vulgaris* L. (Altamisa) ¿alternativa agroecológica para el control de plagas de cultivos?», 27/3/2011, <http://www.yarugyver.blogspot.com/2011/03/alternativa-agroecologica-para-el.html> (consultado: 10/5/2011).
- Hur, J. S.; J. H. Kim; K. M. Lim; Y. J. Koh: «Isolation, Cultivation and Antifungal Activity of a Lichen-Forming Fungus», *Plant Pathol. J.* 19 (2): 75-78 Suncheon National University, Corea, 2003.
- Imtiaj, A.; T. S. Lee: «Screening of Antimicrobial and Antifungal Activity from Korean Wild Mushrooms», *World Journals of Agricultural Sciences* 3 (3): 316-321, Corea, 2007.
- Isman, M. B.; Miresmaili, S.; Machial, C.: «Comercial Opportunities for Pesticides Based on Plants Essential Oils in Agriculture, Industry and Consumer Products», *Phytochemistry Reviews*. 10(2):197-204(8), Canada, 2011.
- Itokawa, H.; O. Shirota; H. Morita; K. Takeya; Y. Litaka: «Isolation, Structural Elucidation and Conformational Analysis of Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus ebenifolia* Reiss. X-Ray Molecular Structure of Ebenifoline W-I», *J. Chem. Soc. Perkin Trans* 11: 1247-1254, Japón, 1993.
- Liu, X.; M. Dong; X. Chen; M. Jiang; X. Liv; J. Zhou: «Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin» *Appl. Microbiol. Biotechnol* 78 (2): 241-7. EE. UU. 2008.
- Macías, M. L.; B. E. Hernández; M. Jiménez; M. C. González; A. E. Glenn; R. T. Hanlin; S. Hernández; A. Saucedo; J. M. Muria; A. L. Anaya: «*Naphthoquinone spiroketal* with Allelochemical Activity from the Newly Discovered Endophytic Fungus *Edenia gomezpompae*», *Phytochemistry* 69 (5): 1185-1196, EE. UU., 2008.
- Mesa, A.; J. G. Bueno; L. A. Betancur: «Productos naturales con actividad antimicótica», *Rev. Esp. Quimioterap.* 17 (4): 325-331, Colombia, 2004.
- Neninger, L. H.; E. I. Hidalgo; L. M. Barrios; M. Pueyo: «Hongos presentes en las semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) en Cuba», *Fitosanidad* 7 (3): 7-11, La Habana, 2003.
- Philip, H. E.; W. S. Bowers; E. J. Funk: «Identification on Fungicidal and Nematicidal Components in the Leaves of *Piper bettle* (Piperaceae)», *J. Agric. Food Chem.* 32: 1254-1256, EE. UU., 1984.
- Rosa, L. H.; K. M. Gomes; C. C. Jacob; M. Capelari; C. A. Rosa; C. L. Zani: «Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity», *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98 (7): 7-19, Brasil, 2003.
- Sheena, N.; T. A. Ajith; T. Mathew; K. K. Janardhanan: «Antibacterial Activity of Three Macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* occurring in South India», *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)* 41: 564-567, India, 2003.
- Stamets, P.; J. S. Chilton: «The Mushroom Cultivator. A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home», *Agarikon Press*, Olympia, WA, EE. UU., 1983.
- Teles, H. L.; R. Sordi; G. H. Silva; I. Castro-Gamboa; V. S. Bolzani; L. H. Pfennig; L. M. de Abreu; C. M. Costa; M. C. Young; A. R. Araújo: «Aromatic Compounds Produced by *Periconia atropurpurea*, an Endophytic Fungus Associated with *Xylopia aromatica*», *Phytochemistry* 67 (24): 2686-2690, EE. UU., 2006.
- Wasser, S. P.; A. L. Weis: «Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective», *Crit. Rev. Immunol.* 19: 65-96, University of Haifa, Israel, 1999.
- Wasser, S. P.; K. M. Sytnik; A. S. Buchalo; E. F. Solomko: «Medicinal Mushrooms: Past, Present and Future», *Ukrains'kii Botanichnii Zhurnal* 59: 499-524, 2002.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
CONSULTA DE DOCUMENTOS

PAGINA SIN DIGITALIZAR

Basidiomycetes Mushroom Biotechnology for the Development of Functional Products: The Effect of Drying Processes on Biological Activity

Diego F. Rojas Vahos^{1,2}, Paola A. Zapata Ocampo^{1,2,*}, Ana M. Palacio Barrera^{1,2}, Sandra P. Ospina Alvarez^{1,2} and Lucía Atehortúa^{1,2}

¹Biotechnology Research Group, University Research Center (SIU) - Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21. Medellín, Colombia

²Biology Institute, Natural Sciences Faculty - Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín (Antioquia)-Colombia

Abstract: *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* and *Agaricus blazei* mushrooms were cultured in a 14 L bioreactor using low-cost, non-conventional culture media. To produce useful raw material for the development of functional products, the biomass produced in the bioreactors was subjected to the following drying processes: convection, infrared radiation, spray drying and freeze-drying. The highest antioxidant activity (ORAC values) and HMGC_oA reductase inhibitory capacity were obtained with *G. lucidum*, (ORAC value of 10,594±128.1 and HMGC_oA reductase inhibitory capacity of 78.22±0.01), followed by *G. frondosa* (ORAC value of 6,919±231.6 and HMGC_oA reductase inhibitory capacity of 71.45±1.48) when the biomass was processed via freeze-drying.

Keywords: Antioxidant capacity, biomass, forced convection, freeze-drying, HMGC_oA Reductase, infrared radiation, spray drying.

INTRODUCTION

Several basidiomycete mushrooms have been used for decades in traditional oriental medicine, and their consumption is widespread in many Asian countries, Europe and the United States [1, 2]. Many of these mushrooms are considered to be medicinal because they contain a rich content of bioactive compounds [3-5]. *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* and *Agaricus blazei* are mushroom species that are widely recognized throughout the world due to their medicinal properties, which stem from the presence of compounds including polysaccharide-protein complexes, intra and exopolysaccharides (IPS and EPS), phenolic compounds, proteins (fungal immunomodulating proteins (FIPs), lectins, glycoproteins, non-glycosylated proteins and peptides), lipid components (ergosterol), fatty acids and terpenoids. These compounds promote a wide range of biological activities such as antitumor/anticancer, antimicrobial and antifungal, immunomodulatory, antiatherogenic, antioxidant capacity and hypocholesterolemic effects [3, 4, 6].

The possible mechanisms underlying the antioxidant activity of edible mushroom extracts include the scavenging of free radicals generated during lipid peroxidation (e.g., by peroxy radicals through their hydrogen-donating capacity, which is generally correlated with higher amounts of total phenolics) [7]. Ergothioneine, a specific antioxidant, has

been identified and quantified in various species, including *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *G. frondosa* and *A. blazei*, and this metabolite is a cellular protector against oxidative damage [8]. The ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) unit, also known as the ORAC value, is a method of measuring the antioxidant capacity of different foods and supplements. The ORAC value was developed by scientists at the National Institutes of Health. Despite the fact that the exact relationship between the ORAC value of a food and its health benefit has not been established, it is believed that foods with higher ORAC values are more effective at neutralizing free radicals. According to the free-radical theory of aging, neutralizing free radicals will slow the oxidative processes and inhibit free radical damage that may contribute to age-related degeneration and disease (USDA National Nutrient Database for Standard Reference) [9-11].

In addition, mushrooms have several compounds that are capable of inhibiting the key enzymes involved in cholesterol metabolism. One such example is lovastatin, a compound that lowers cholesterol levels by inhibiting 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase (HMGC_oAR) [8-10]. Additionally, research on *P. ostreatus* and *L. edodes* has suggested that their inhibitory activity might be due to proteoglycans and demonstrated that HMGC_oAR inhibitory capacity was dependent on the commercial variety, the cultivation parameters and the developmental stage of the mushrooms [8-10].

Traditionally, mushroom culture has emphasized fruiting body production. The basidiocarps are dried by conventional processes [forced convection] and processed by grinding and

*Address correspondence to this author at the Biotechnology Research Group, University Research Center (SIU) - Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21. Medellín, Colombia; Tel: (5 74) 2196493; Fax: (5 74) 2196565; E-mail: paozapata@gmail.com

pulverizing the dry biomass to obtain final the product [11]. However, in recent years, special attention has been directed toward finding the optimal conditions for submerged culture to enable the efficient production of mycelial biomass and bioactive compounds using both flasks and bioreactors [12-16].

Technological advances in the food and biotechnology fields, specifically in the area of submerged culture conditions, have facilitated new developments aimed at designing products and transforming existing products, minimizing production costs and giving the final product a greater added value with regard to both nutrition and health [3, 11, 17, 18]. However, it is necessary to evaluate the entire production process, especially for edible and medicinal mushrooms, and the cultivation process must not only ensure the uniform production of biomass and its active metabolites under standardized processes but also guarantee the stability and quality of the obtained biomass. The latter consideration is indispensable to evaluate changes that occur in the biomass after drying by different systems, and it is critical to determine how the drying process directly affects biological activity. This consideration is important because it is common to observe changes in the organoleptic characteristics of biomass, such as odor, taste and texture that are completely different under different processing methods. Color can also vary depending on the drying method.

The purpose of this work was to evaluate the biological activity, in terms of antioxidant capability [ORAC values] and HMGC_oAR inhibitory capacity, of the biomass of *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* and *Agaricus blazei* produced in a 14 L bioreactor after different drying processes: forced convection, infrared radiation, spray drying and freeze-drying. The goal of this study was to determine the most appropriate system for the maintenance of functional properties of the biomass and one that could be used for different products in the near future. Thus, this report addresses the issue of how the different drying processes affect the bioactivity of the functional raw material obtained from mushroom species.

MATERIALS AND METHODS

Strain Maintenance and Preinoculum Preparation

G. lucidum (GL), *G. frondosa* (GF) and *A. blazei* (AB) strains were provided by the Plant Biotechnology Research Group of the Universidad de Antioquia. The strains were maintained in a solid medium containing MGL1 with the following components (g L⁻¹): Barley flour, 30; yeast extract, 3; saccharose, 5.3; and agar, 8; with a pH of 5.5±0.1. The strains were incubated at 24°C in darkness and stored at 4°C [19]. Mycelial agar disks 1 cm in diameter were removed from the margin of an actively growing colony, and six pieces were inoculated in 1000 mL flasks containing 450 mL of MGL1 liquid media consisting of the following components [g L⁻¹]: Barley flour - 50, NaNO₃ - 0.08, MgSO₄·7H₂O - 0.02, KCl - 0.01 and KH₂PO₄ - 0.03; pH 5.5±0.1. Cultures were maintained at 100 rpm, 24±1°C and 40 micromoles m⁻²s⁻¹ for nine days [19].

14 L Bioreactor Culture

The fermentation process for the three species was carried out in a 14 L bioreactor with 9 L of working volume

in MGL1 liquid modified culture medium (with 20 g L⁻¹ of barley flour and 0.1% (v/v) olive oil as anti-foam agents). The culture medium was inoculated with 900 mL of preinoculum through a peristaltic bomb. The culture conditions were as follows: 150 rpm of agitation, aeration rate of 6 vvm, temperature of 30°C and a pH of 5.5±0.1. These conditions were maintained for a period of 3, 4 and 15 days for *G. lucidum*, *G. frondosa* and *A. blazei*, respectively.

Drying Methods

After cultivation, the biomass of each fungus was homogenized in an ULTRA-TURRAX disperser (IKA® T18 Basic) at 25000 rpm for 10 min and subjected to four different drying treatments.

Infrared (ID) and Convection Drying (CD)

One liter of homogenized biomass was separated by centrifugation at 9000 rpm for 10 min, and the different samples were dried at 70°C in an infrared or convection oven until a constant weight was obtained. The dry biomass from both processes was grounded using a friction grinder, packed in plastic bags, sealed and stored at 25±2°C for subsequent trials.

Spray Drying (SD)

One liter of homogenized product was diluted in distilled water to a final concentration of 50% (p/v) to decrease the amount of suspended solids and to avoid injector blockage. The drying agent used was maltodextrin (6.25%), and the biomass feeding solution was carried to a spray dryer (Buchi® B-290) at an inlet temperature of 150°C, outlet temperature of 70-90°C, 100% aspiration rate, 35-45% pump, two-nozzle cleaner and 50 L/h air flow rate.

Freeze-drying (FD)

One liter of homogenized product was frozen in a cooling bath at -20°C. Then, the biomass was carried to the freeze-dryer (Eyela® 1100) with a temperature of -50°C and 10 Pa of pressure.

Extraction and Quantification of IPS

For IPS extraction, 1 g of dried mycelial biomass from each drying method was collected. The polysaccharides were extracted in boiling water for 20 min, and the hot solution was filtered with Ø 125 mm filter paper (Whatman®). Then, the IPS precipitate was made by the addition of four volumes of 96% ethanol at 4°C for 1 h followed by centrifugation at 4000 rpm for 20 min. The supernatant was discarded, and the pellet was diluted in 5 mL of distilled water [20]. For quantification, we used the colorimetric method of phenol-sulfuric acid, as described by Dubois *et al.* (1956) and modified by Masuko *et al.* (2005) using a glucose standard curve. The samples were measured in a microplate format [21-25].

BIOLOGICAL ACTIVITY

Oxygen-radical Absorbance Capacity Assay (ORAC_{FL})

The antioxidant activity of the biomass from each mushroom was measured using the ORAC assay [9-11]. Dry biomass obtained from each of the different drying methods was diluted in a 10 mM phosphate buffer at pH 7.4 to obtain

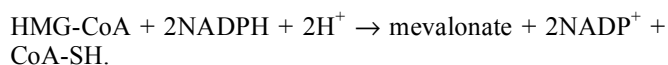
Table 1. Biomass and IPS Under 14 L Bioreactor Conditions after Freeze-Drying

Species	Biomass (g/L)	Productivity (g biomass /day)	IPS (mg/mL)	Productivity (g IPS/day)
<i>G. lucidum</i>	19.72±1.06	6.57	13.29±2.29	4.43
<i>G. frondosa</i>	24.49±0.44	8.16	12.28±1.87	4.09
<i>A. blazei</i>	23.48±1.31	1.56	42.56±3.46	2.84

a final concentration of 1 µg/mL. Trolox (0–200 µM) was used as the standard. A mixture of the fluorescent probe, FL (150 µL of a 1 µM solution), and sample solution (25 µL of a 1/10 dilution) was preincubated for 30 min at 37°C. Then, 25 µL of 250 mM AAPH solution in phosphate buffer was added. Fluorescence intensity was measured every 2 min for 120 min with excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. The results are reported as micromoles of Trolox equivalents per 100 g of biomass (µmol TE/100 g of biomass) [9-11].

Determination of HMGC_oA Inhibitor Activity

Mushroom powders from each drying method (3 g) were mixed with 20 mL of 96% ethanol. Samples were subjected to ultrasound for 2 h at 30% amplitude and 20 kHz of operating frequency (Misonix® S4000-010), and the cycle was repeated. Subsequently, the samples were shaken in a vortex for 30 s and filtered with Ø 125 mm filter paper (Whatman®). Extracts were subsequently concentrated by evaporation under partial vacuum, and the residue was resuspended in PBS buffer (pH 7.4) to obtain a final concentration of 3 µg/µL. These solutions were used as the source of HMGC_oAR inhibitors. HMGC_oAR activity was measured using the commercial HMG-CoA Reductase Assay (Sigma® CS1090) according to the user's manual. This assay is based on the spectrophotometric measurement of the decrease in absorbance at 340 nm at 37°C, which represents the oxidation of NADPH by the catalytic subunit of HMGC_oAR in the presence of HMG-CoA according to the following reaction:



Mushroom solutions (1 µL) were applied into a 96-well plate, and the absorbance change was read every 20 s for up to 10 min using a microplate reader (BioTek Powerwave 340®). Pravastatin was used as a positive control for inhibition. This control was considered as exhibiting 100% inhibitory activity, and tested samples were measured for their percentage of activity inhibition. All assays were performed in triplicate.

RESULTS

14 L Bioreactor Culture and IPS Content

This work aimed to study the performance of each of the mushroom when cultured in a stirred tank reactor. To obtain optimal cell growth, the concentration of the carbon source was lowered from 50 g/L in the flask culture [23-27] to 20 g/L in the bioreactor because we found that an important remnant of the cereal flour was not used by the fungus at the

end of the culture time, indicating that the carbon source was added in excessive amounts. Additionally, when the cultures were maintained in flasks and/or the bioreactor, they required between 5 and 20 days for cultivation, depending on the species [14, 26-28]. However, in our bioreactor operating conditions and the culture medium established, *G. lucidum* and *G. frondosa* reached their maximum biomass and IPS production at 3 days, whereas *A. blazei* reached its maximum value at 15 days. The biomass and IPS were obtained by freeze-drying because there was no loss during the drying process, as discussed below (Table 1).

Biological Activities

Oxygen-radical Absorbance Capacity Assay (ORAC_{FL})

The effect of the drying method on biomass antioxidant activity was evaluated using ORAC_{FL}. ANOVA revealed that each of the factors evaluated and their interactions significantly affected antioxidant activity ($p < 0.05$).

G. lucidum (10,594±128.1) had the highest ORAC values among the mushrooms tested, followed by *G. frondosa* (6,919±231.6) and *A. blazei* (4,101±150.5) (Table 2). These results were compared with reference values from the USDA National Nutrient Database for Standard Reference, which is a comprehensive database of foods and their antioxidant levels expressed as ORAC values.

Determination of HMGC_oA Inhibition

Next, we tested the influence of each drying process on HMGC_oAR inhibitory activity. ANOVA revealed that each of the factors evaluated and their interactions significantly affected the inhibitory activity of the extracts ($p < 0.05$) (Table 3). All of the mushroom extracts displayed the highest HMGC_oAR inhibitory activity under the freeze-drying process, with percentages of inhibition of 78.22%±0.01% and 71.45%±1.48% for *G. lucidum* and *G. frondosa*, respectively.

DISCUSSION

Currently, there are several established techniques for drying raw materials in the fields of cosmeceuticals and pharmaceutical products, especially in the food sectors. The drying and dewatering processes are of great interest due to increasing quality standards, especially in the production of natural ingredients and additives for different formulations [29].

It is important to note that the culture medium and operating conditions of the bioreactor used in this study are suitable for obtaining biomass and IPS for the three fungi studied. Comparing these values with previous reports, we

Table 2. Antioxidant Activity ORAC of Biomass Obtained by Different Dry Methods Compared with USDA National Nutrient Database for Standard Reference (<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>, <http://www.oracvalues.com/>)

Sample	ORAC ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g sample}$)	ORAC Values Reference
GLSD	2,279 $\pm$ 38.2	2,294 Cereals ready-to-eat, granola, low-fat, with raisins 2,252 Asparagus, raw
GLFD	10,594$\pm$128.1	13,541 Nuts, walnuts, English 10,460 Juice, black raspberry
GLCD	6,224 $\pm$ 128.6	6,257 Baby food, fruit, peaches 6,100 Plums, raw
GLID	7,718 $\pm$ 20.58	7,957 Currants, European black, raw 7,675 Nuts, pistachio nuts, raw
GFSD	480.4 $\pm$ 15.13	481 Spices, poppy seed 438 Lettuce, iceberg [includes crisphead types], raw
GFFD	6,919$\pm$231.6	7,282 Lentils, raw 6,681 Apples, dried to 40% moisture [purchased in Italy]
GFCD	5,413 $\pm$ 27.2	5,708 Garlic, raw 5,409 Soybeans, mature seeds, raw
GFID	5,497 $\pm$ 135.4	5,708 Garlic, raw 5,409 Soybeans, mature seeds, raw
ABSD	1,328 $\pm$ 80.5	1,346 Lemons, raw, without peel 1,326 Potatoes, red, flesh and skin, baked
ABFD	4,101$\pm$150.5	4,123 Baby food, fruit, applesauce, strained 3,898 Apples, Granny Smith, raw, with skin
ABCD	2,496 $\pm$ 19.25	2,496 Cabbage, red, raw
ABID	946.8 $\pm$ 4.43	951 Mushrooms, brown, Italian or Crimini, raw 943 Pineapple, raw, extra-sweet variety

Table 3. HMGC_oAR Inhibitory Activity of Mushroom Extracts Obtained with Different Drying Processes

Drying Process	<i>G. lucidum</i> activity inhibition of HMGC _o AR (%)	<i>G. frondosa</i> activity inhibition of HMGC _o AR (%)	<i>A. blazei</i> activity inhibition of HMGC _o AR (%)
Spray drying	60.23 $\pm$ 0.03	55.31 $\pm$ 0.01	40.59 $\pm$ 0.55
Freeze-drying	78.22 $\pm$ 0.01	71.45 $\pm$ 1.48	60.90 $\pm$ 0.23
Forced Convection	43.32 $\pm$ 0.01	53.27 $\pm$ 0.06	43.61 $\pm$ 0.13
Infrared Radiation	38.64 $\pm$ 0.32	59.89 $\pm$ 0.25	40.74 $\pm$ 0.03

Table 4. Biomass and IPS Productivity (P) Under 14 L Bioreactor Conditions Using the Freeze-Drying Method Compared with the Maximum P Values Reported by other Authors

Species	P for Biomass	P Reported	Reference	P for IPS	P Reported	Reference
<i>G. lucidum</i>	6.57	1.37	[28]	6.57	0.395	[28]
<i>G. frondosa</i>	8.16	6.20	[33]	8.16	0.325	[32]
<i>A. blazei</i>	1.56	1.54	[19]	1.56	0.12	[34]

achieved higher productivity biomass and IPS for *G. lucidum* and *G. frondosa* in fewer days (three days) [26, 30, 31]. The biomass of *A. blazei* was similar to previous reports, but its IPS value was higher [15, 32] (Table 4). Additionally, the culture media used in our work significantly reduced the cost compared with those reported by other authors [19, 28, 32-35].

Regarding antioxidant activity, our results were consistent with previous reports demonstrating that freeze-drying is generally the best drying method to preserve the nutrient quality and antioxidant activity. This characteristic is likely due to the constant conditions of this process and the fact that the low temperature of the process prevents damage related to the chemical degradation of substances; the damage reported with the other methods is likely caused when the sample is submitted to high temperatures with different exposure times. The samples are subjected to spray drying for just a few seconds, and the process takes 48 h for convection and infrared radiation. These findings suggest that the substances to which antioxidant activity can be attributed are thermo-sensitive. However, the reduction observed with convection and infrared processes was not as marked compared to spray drying, in which the lowest ORAC values were obtained for *G. lucidum* and *G. frondosa* and the second lowest value for *A. blazei*. During the spray-drying process, it is necessary to add a drying agent that increases the final yield value by increasing the weight and volume of the final product. Therefore, it is possible that the amount of the metabolite of interest is at a lower concentration and is masked by the presence of maltodextrin [29].

With regard to HMGCAR activity inhibition, the best results for the three mushrooms were achieved with the freeze-dried biomass, and lower values were obtained using both convection and infrared radiation. Thus, prolonged exposure times have a greater effect on bioactivity, which decreased the yield by 39.58% for *G. lucidum*, 18.18% for *G. frondosa* and 20% for *A. blazei*.

Taken together, these results suggest that freeze-drying is the best drying method because it protects flavor and aroma compounds as well as biologically active compounds. These results were confirmed by Shofian *et al.* [36] and Yang *et al.* [37], who showed that the amounts of phenolic compounds, β -carotene and ascorbic acid were better preserved after freeze-drying compared to other drying processes. The drying process caused dramatic changes in both activities, the antioxidant activity and HMGCAR Reductase inhibitory capacity, which is in agreement with the results obtained by Yang *et al.*, who demonstrated that the lowest activity was observed in hot-air-dried samples. During freeze-drying, ice sublimation causes significant changes in the shape and volume, but the active compounds are preserved [33].

The most popular method of mushroom dehydration is convective drying. However, this method takes a long time at a high temperature, which decreases the quality of the dried product and directly affects its bioactivity. Therefore, it is necessary to optimize the drying process of the raw material and verify its biological activities prior to the development of products that promise health benefits [29, 34].

CONCLUSIONS

The drying of mushroom products can substantially change their biological activities. The highest antioxidant activity (ORAC values) and HMGCAR inhibition values were obtained when applying the freeze-drying method; however, for different industrial purposes, further studies should be conducted to minimize alterations in the chemical composition and/or bioactivity of the samples.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank PREMEX S.A. and PCA Productora y Comercializadora de Alimentos S.A., as well as the governmental entity COLCIENCIAS, for funding the project (1115-489-25308, Contract 629-2009). We are also grateful to the Universidad de Antioquia and the Division of Sustainability of the Committee for Research Development of the Universidad de Antioquia - CODI (Estrategia de Sostenibilidad 2013-2014).

REFERENCES

- [1] Wong, J.H.; Ng, T.B.; Cheung, R.C.F.; Ye, X.J.; Wang, H.X.; Lam, S.K.; Lin, P.; Chan, Y.S.; Fang, E.F.; Ngai, P.H.K.; Xia, L.X.; Ye, X.Y.; Jiang, Y.; Liu, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, *87*, 1221-35.
- [2] Zhang, M.; Cui, S.W.; Cheung, P.C.K.; Wang, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci. Tech.*, **2007**, *18*, 4-19.
- [3] Moro, C.; Palacios, I.; Lozano, M.; D'Arrigo, M.; Guillaumon, E.; Villares, A.; Martinez, J.A.; Garcia-Lafuente, A. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem.*, **2012**, *130*, 350-5.
- [4] Cheung, Y.-C.; Siu, K.-C.; Liu, Y.-S.; Wu, J.-Y. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide-protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction. *Process. Biochem.*, **2012**, *47*, 892-5.
- [5] Lindequist, U.; Niedermeyer, T.H.J.; Jülich, W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. *J. Evid. Based Complement Altern. Med.*, **2005**, *2*, 285-99.
- [6] Lin, Z. Critical review cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *Science*, **2005**, *153*, 144-53.
- [7] Cheung, L.M.; Cheung, P.C.K.; Ooi, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.*, **2003**, *81*, 249-55.
- [8] Dubost, N.; Ou, B.; Beelman, R. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.*, **2007**, *105*, 727-35.
- [9] Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 4619-26.
- [10] Álvarez, R.; Carvalho, C.P.; Sierra, J.; Lara, O.; Cardona, D.; Londoño-Londoño, J. Citrus juice extraction systems: effect on chemical composition and antioxidant activity of clementine juice. *Agric. Food Chem.*, **2012**, *60*, 774-81.
- [11] Cao, G.; Alessio, H.; Cutler, R. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, **1993**, *14*, 303-11.
- [12] Chen, S.-Y.; Ho, K.-J.; Hsieh, Y.-J.; Wang, L.-T.; Mau, J.-L. Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in

- mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2012**, *47*, 274-8.
- [13] Gil-Ramírez, A.; Clavijo, C.; Palanisamy, M.; Ruiz-Rodríguez, A.; Navarro-Rubio, M.; Pérez, M.; Marín, F. R.; Reglero, G.; Soler-Rivas, C. Screening of edible mushrooms and extraction by pressurized water [PWE] of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase inhibitors. *J. Funct. Foods*, **2013**, *5*, 244-50.
- [14] Gunde-Cinerman, N.; Friedrich, J.; Cinerman, A.; Benicki, N. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1993**, *111*, 203-6.
- [15] Chang, S.; Buswell, J.A. Safety, quality control and regulatory aspects relating to mushroom nutraceuticals. In *Proceedings of the Six International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*; Lelley, J.; Buswell, J.A., Eds.; WSMBMP-GAMU: Bonn, Germany, **2008**; pp. 188-97.
- [16] Singh, M.; Vijay, B.; Kamal, S.; Wakchaure, G. *Mushrooms: cultivation, marketing and consumption*; Singh, M.; Vijay, B.; Kamal, S.; Wakchaure, G., Eds.; First ed.; Directorate of Mushroom Research [ICAR]: Solan, India, **2011**; pp. 11-3.
- [17] Fox, E.M.; Howlett, B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2008**, *11*, 481-7.
- [18] Cui, F.J.; Li, Y.; Xu, Z.H.; Xu, H.Y.; Sun, K.; Tao, W.Y. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, **2006**, *97*, 1209-16.
- [19] Liu, G.-Q.; Wang, X.-L. Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, *74*, 78-83.
- [20] Chang, M.; Tsai, G.; Hwang, J. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enz. Microb. Technol.*, **2006**, *38*, 407-14.
- [21] Wasser, P.; Nevo, E.; Sokolov, D.; Reshetnikov, S.; Timor-Tismenetsky, M. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. *Int. J. Med. Mushrooms*, **2000**, *2*, 1-19.
- [22] Lange, L. The importance of fungi for a more sustainable future on our planet. *Fungal Biol. Rev.*, **2010**, *24*, 90-2.
- [23] Zapata, P.; Rojas, D.; Atehortua, L. Production of biomass, polysaccharides and ganoderic acid using non-conventional carbon sources under submerged culture of the *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Med. Mushrooms*, **2012**, *In press*.
- [24] Tang, Y.; Zhong, J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enz. Microb. Technol.*, **2002**, *31*, 20-8.
- [25] DuBois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **1956**, *28*, 350-6.
- [26] Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S.-I.; Lee, Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.*, **2005**, *339*, 69-72.
- [27] Zapata, P.; Rojas, D.; Ramirez, D.; Fernandez, C.; Atehortua, L. Effect of Different Light-Emitting Diodes on Mycelial Biomass Production of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* [W. Curt.: Fr.] P. Karst. [Aphyllphoromycetidae]. *Int. J. Med. Mushrooms*, **2009**, *11*, 93-9.
- [28] Tang, Y.-J.; Zhang, W.; Liu, R.-S.; Zhu, L.-W.; Zhong, J.-J. Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. *Process Biochem.*, **2011**, *46*, 404-8.
- [29] Zou, X. Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochem.*, **2006**, *41*, 970-4.
- [30] Lee, B.C.; Bae, J.T.; Pyo, H.B.; Choe, T.B.; Kim, S.W.; Hwang, H.J.; Yun, J.W. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enz. Microb. Technol.*, **2003**, *32*, 574-81.
- [31] Wang, Y.; Kho, K.; Cheow, W.S.; Hadinoto, K.A. comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **2012**, *424*, 98-106.
- [32] Cao, X.-H.; Yang, Q.-W.; Lu, M.-F.; Hou, L.-H.; Jin, Y.-Y.; Yuan, J.; Wang, C.-L. Preparation and anticoagulation activity of a chemically sulfated polysaccharide [S-Gfb] obtained from *Grifola frondosa*. *J. Food Biochem.*, **2010**, *34*, 1049-60.
- [33] Kim, S.W.; Hwang, H.J.; Lee, B.C.; Yun, J.W. Submerged production and characterization of *Grifola frondosa* Polysaccharides - a new application to cosmeceuticals. *Food Technol. Biotech.*, **2007**, *45*, 295-305.
- [34] Liu, G.; Wang, X. Selection of a culture Medium for reducing costs and enhancing biomass and intracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei* AB2003. *Food Technol. Biotech.*, **2009**, *47*, 210-4.
- [35] Zapata, P.; Rojas, D.; Atehortua, L. Production of biomass, polysaccharides, and ganoderic acid using non-conventional carbon sources under submerged culture of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *ganoderma lucidum* [W.Curt.:Fr.] P. Karst. [Higher Basidiomycetes]. *Int. J. Med. Mushrooms*, **2012**, *12*, 197-203.
- [36] Shofian, N.M.; Hamid, A.A.; Osman, A.; Saari, N.; Anwar, F.; Dek, M.S.P.; Hairuddin, M.R. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, *12*, 4678-92.
- [37] Yang, J.; Chen, J.; Zhao, Y.; Mao, L. Effects of drying processes on the antioxidant properties in sweet potatoes. *Agric. Sci. China*, **2010**, *9*, 1522-9.

Received: July 25, 2013

Revised: October 08, 2013

Accepted: October 10, 2013

© Rojas Vahos et al.; Licensee Bentham Open.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DOS ESTEROLES Y UN TRITERPENOIDE DEL CUERPO FRUCTÍFERO DE *Ganoderma lucidum* CULTIVADO EN COLOMBIA

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO STEROLS AND A TRITERPENE FROM
DRY FRUITING BODIES OF *Ganoderma lucidum* CULTIVATED IN COLOMBIA

ARTÍCULO CORTO

Henry MORENO P.^{1*}, Alejandro MARTÍNEZ M.¹, Yoshinori FUJIMOTO²

Recibido: Enero 25 de 2010 Aceptado: Octubre 19 de 2010

RESUMEN

Ganoderma lucidum es un hongo medicinal que pertenece a la familia *Ganodermataceae*, conocido hace mucho tiempo en Japón como “reishi”, y usado ampliamente en la medicina tradicional china. Los metabolitos que se han reportado en él son principalmente polisacáridos y triterpenoides con diferentes actividades biológicas. En el presente artículo se describe el aislamiento y la identificación efectuados de los compuestos ergosterol, 5,6-dihidroergosterol y lucidumol-B, a partir del extracto metanólico del cuerpo fructífero seco del *Ganoderma lucidum* cultivado en Colombia.

Palabras clave: reishi, ergosterol, 5,6-dihidroergosterol, lucidumol-B.

ABSTRACT

Ganoderma lucidum is a medicinal mushroom belonging to *Ganodermataceae* family. It is known as “reishi” in Japan and is widely used in traditional Chinese medicine. Reported metabolites include polysaccharides and triterpenoids with different biological activities. In this paper isolation and identification of ergosterol, 5,6-dihydroergosterol and lucidumol-B, are described. These compounds were isolated from methanolic extract of fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* cultivated in Colombia.

Keywords: Reishi, ergosterol, 5,6-dihydroergosterol, lucidumol-B.

¹ Grupo de Investigación Productos Naturales Marinos. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

² Departamento de Química y Ciencia de los Materiales. Instituto Tecnológico de Tokio Ookayama 2-12-1, Meguro, Tokio 152-8551, Japón
Tel / Fax +81-3-5734-2241

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: hmoreno@farmacia.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

El hongo *Ganoderma lucidum* (Fam. *Ganodermataceae*) ha sido utilizado en Japón, China y otros países desde hace cientos de años como alimento y como materia prima para el desarrollo de productos nutraceuticos que preservan la vitalidad y promueven la longevidad. En dichos países se conoce con nombres triviales como “lingzhi”, “reishi” y “youngzhi” (1). Es un hongo frágil, cuyo color varía del blanco al negro, pasando por tonalidades amarillas, doradas, azules y violáceas, y crece en todas las latitudes cálidas, en el tronco de los árboles dañados o muertos. Entre sus componentes químicos más estudiados están los triterpenoides, que desarrollan actividades biológicas que los hacen potencialmente útiles para la prevención y el tratamiento de enfermedades como: hipertensión, diabetes, cáncer, hepatitis, artritis, hipercolesterolemia, bronquitis, asma, gastritis, VIH-1(2-4). En el caso particular del cáncer, se ha demostrado que nueve especies del género *Ganoderma*, incluido *G. lucidum*, pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer de pulmón (SCLC), particularmente en las terapias con mezclas de medicamentos, cuando se desarrolla resistencia que hace ineficaz el tratamiento (5). Otros posibles usos suyos están en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (6) y en el envejecimiento asociado a enfermedades neurodegenerativas (7).

En el caso de los compuestos identificados en especies del género *Ganoderma*, se ha informado el aislamiento de más de 130 compuestos triterpenoides, entre ellos el lucidumol-B, que han recibido una considerable atención por sus actividades biológicas, entre las cuales se destacan la acción anti VIH-1 (4) y antitumoral (8).

En Colombia se han efectuado estudios similares a partir de los cuerpos fructíferos frescos de *G. lucidum* recolectado en el departamento del Valle del Cauca, del cual se aislaron e identificaron cinco triterpenoides tipo lanostano, dos de ellos nuevos, el lucidiol y el lucidal, además de seis compuestos esteroideos (9).

En este trabajo se describe el aislamiento y la identificación de tres compuestos: dos esteroides: ergosterol y 5,6-dihidroergosterol, y un triterpenoide: lucidumol-B, a partir de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* cultivado en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos y condiciones de análisis

Los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973N. Se utilizó una columna Zebron ZB-35 (0,25 mm x 30 m x 0,25 μ m), con la siguiente programación del horno: se inició con una temperatura de 150°C (1 min) – 200°C (5°C/min - 3 min) – 250°C (3°C/min - 4 min) – 300°C (5°C/min - 5,33 min). Retardo: 5 minutos. La temperatura del inyector fue de 250°C, la fuente de ionización se mantuvo a 70 eV. El gas de arrastre usado fue helio, a un flujo de 1 mL/min. El rango de masas utilizado fue de 30 uma – 600 uma. Los análisis por espectroscopia UV-Visible se efectuaron en un espectrofotómetro SPECTRONIC Genesys® 2PC, usando metanol grado reactivo como solvente.

Al triterpenoide aislado se le determinaron los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C (CDCl₃+CD₃OD) en un espectrómetro JEOL® 500 MHz.

Preparación de la muestra

La muestra de *Ganoderma lucidum* se cultivó en el sector de San Javier, en la ciudad de Medellín (Departamento de Antioquia, Colombia) y la facilitó la empresa Hongos y Nutraceuticos S. A.

Los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* se secaron y trituraron en un molino de cuchillas. De la muestra molida se pesaron 100 g y se extrajeron con 1,6 litros de metanol grado reactivo, con agitación continua, en ausencia de luz, durante 12 horas. Luego se hizo un reflujo abierto con calentamiento suave durante 30 minutos. El extracto se filtró y el residuo se extrajo 2 veces más, con porciones de 800 y 200 mL de metanol, durante 12 horas. Todos los extractos se juntaron y llevaron a sequedad en un rotaevaporador a una temperatura menor a 45°C, a presión reducida y agitación constante. Posteriormente se hizo una partición líquido-líquido con cloroformo/agua (3:2), por duplicado. La fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad obteniéndose un residuo de 1,75 g.

Fraccionamiento cromatográfico

El residuo clorofórmico se fraccionó por cromatografía en columna, usando sílica gel 40

como fase estacionaria y n-hexano/acetato de etilo (3:7 v/v) como fase móvil. Las fracciones obtenidas se sometieron a fraccionamientos repetidos por cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), con sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®), eluyendo las menos polares con la mezcla n-hexano/acetato de etilo 7:3 (v/v), y las más polares con n-hexano/acetato de etilo 3:7 (v/v). Al eluir con la mezcla n-hexano/acetato de etilo 7:3 (v/v) se obtuvieron 6,8 mg del compuesto A ($R_f = 0,5$), 16,3 mg del compuesto B ($R_f = 0,29$). Al eluir otras fracciones más polares con la mezcla n-hexano/acetato de etilo 3:7 (v/v), se obtuvieron 27 mg del compuesto C ($R_f = 0,7$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro de masas de impacto electrónico del compuesto aislado A muestra el ión molecular m/z 396, que corresponde a la fórmula molecu-

lar $C_{28}H_{44}O$. Los fragmentos generales en m/z : 381($M^+ - CH_3$, 1.26), 378($M^+ - H_2O$, 0.9) y 363[$M^+ - (CH_3 + H_2O$, 38.3)], son característicos de un estero. Además, están presentes los fragmentos intensos a m/z : 337($M^+ - 59$, 15.6), 271(M^+ -Cadena lateral, 35.9), 253(M^+ -Cadena lateral- H_2O , 14.6), 229(Fisión del anillo D, 7.2), 211(Fisión del anillo D- H_2O , 14.2), 158($M^+ - H_2O$ y fisión del anillo C, 7.3), 143($M^+ - H_2O$ -fisión del anillo C- CH_3 , 25.8) y 128($M^+ - H_2O$ -fisión del anillo C- $2CH_3$, 13.5), que indican que el núcleo esteroidal está insaturado en los carbonos C_5 y C_7 (núcleo $\Delta^{5,7}$ -3-hidroxiandrosteno) (10). Estos datos coinciden con los reportados en la literatura (11-13) y son consistentes con la estructura del ergosterol mostrada en la figura 1, un estero característico de los hongos y que a juicio de algunos autores puede utilizarse para el control de calidad de productos a base de *G. lucidum* (14).

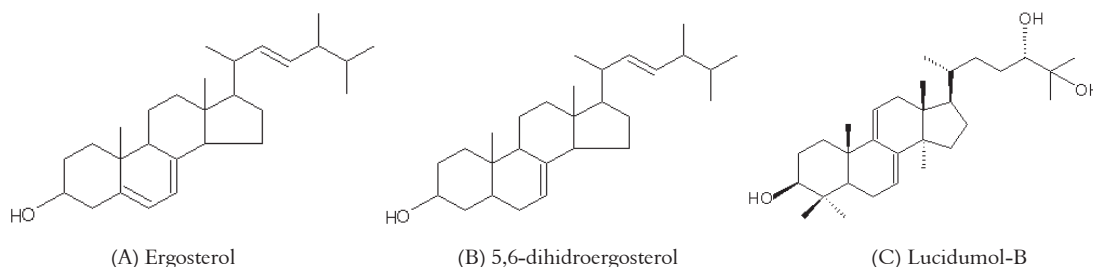


Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos aislados.

El espectro de masas de impacto electrónico del compuesto aislado B muestra el ión molecular m/z 398, correspondiente a la fórmula molecular $C_{28}H_{46}O$. Algunos fragmentos característicos son: 398(M^+ , 6.0), 383(M^+ -Metilo, 4.4), 273(M^+ -Cadena lateral, 7.6), 271(M^+ -Cadena lateral- $2H$, 28.3), 255(M^+ -Cadena lateral- H_2O , 11.7), 246(Fisión anillo D, 5.9), 213(Fisión anillo D- H_2O , 5.9) y 43(M^+ -Isopropilo, 100). Por medio este análisis y los datos reportados en la literatura se pudo establecer que el espectro corresponde al del estero: 5,6-dihidroergosterol (13,15), cuya estructura se muestra en la figura 1. Este compuesto reportado en la especie *G. aplannatum*, es activo contra bacterias Gram-positivas (16) y presenta una actividad potente contra el virus del herpes simple (17). Algunos compuestos análogos de este estero han mostrado diversas propiedades biológicas, entre las que se incluyen, una actividad inhibidora *in vitro* potente

contra líneas celulares de cáncer PLC/PRF/5 y KB (18), e inhibición del ciclo celular (19).

El espectro de masas de impacto electrónico del compuesto aislado C muestra el ión molecular m/z 458, correspondiente con la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_3$. El espectro muestra el fragmento m/z 311, el cual ha sido reportado para varios triterpenoides tipo lanostano insaturados en 7 y 9 (20). El espectro ultravioleta en metanol muestra máximos de absorción en 237, 245 y 254 nm. Estos datos son consistentes con los mostrados por triterpenoides tipo lanostano con insaturación $\Delta^{7,9(11)}$, como los reportados previamente en otros compuestos aislados de *G. lucidum* y especies relacionadas (21). El espectro RMN- ^1H muestra señales particulares de un compuesto triterpenoide: δ 5,31 (d, $J = 6.1$ Hz) y δ 5,48 (d, $J = 5.8$), característicos de un triterpenoide tipo lanostano con insaturación $\Delta^{7,9}$. Lo anterior confirma lo observado en el espectro

UV. El análisis del espectro de RMN-¹³C muestra 30 señales: δ 116,19 (C-11), 120,21 (C-7), 142,60 (C-8) y 145,90 (C-9). Este análisis y la comparación de los datos obtenidos de los espectros RMN-¹H y RMN-¹³C, muestran muy buena correlación con los datos reportados para el compuesto lucidumol-B, aislado de *G. lucidum* (22), cuya estructura se muestra en la figura 1.

Este compuesto ha sido reportado previamente en muestras de *G. lucidum* cultivadas en China, Vietnam y Japón, y ha mostrado significativa actividad inhibitoria contra la proteasa del virus VIH-1 (22).

Varios trabajos de investigación demuestran que la composición química del hongo *G. lucidum* presenta gran variabilidad, dependiendo de factores como: origen geográfico, las condiciones climáticas y las condiciones ambientales, lo cual dificulta el control de calidad de esta materia prima y de los productos terminados elaborados a partir de ella (23-25). Lo anterior ha llevado a que se desarrollen métodos de análisis cada vez más confiables (24). Adicionalmente, estos autores han demostrado que a pesar de la complejidad y variabilidad de la composición química de las fracciones provenientes de *G. lucidum*, es posible establecer una huella dactilar o perfil cromatográfico de referencia, con el cual se pueden comparar las muestras de diferentes orígenes e identificar su procedencia. Aunque se puede establecer un perfil cromatográfico representativo para el análisis de estos productos naturales, seguramente se requerirá modificarlo a través de la obtención de nuevas evidencias (23).

La presencia de una sustancia, de distribución restringida, como el lucidumol-B en la muestra analizada de *G. lucidum*, permite sugerir que este compuesto puede servir como marcador para el control de calidad de los productos que se elaboren a partir de los cuerpos fructíferos del hongo cultivado en la ciudad de Medellín, y para diferenciarlo de los obtenidos en otras localizaciones geográficas.

CONCLUSIONES

A partir del extracto metanólico de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* cultivado en Colombia se aislaron e identificaron dos esteroides, ergosterol y 5,6-dihidroergosterol, y un triterpenoide tipo lanostano: lucidumol-B.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Hongos y Nutracéuticos S. A. y la señora María Elena Arango, por proporcionar las muestras de hongo. Al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia, por la financiación del proyecto de sostenibilidad 2007-2008. A las estudiantes Diana M. Zuluaga y Marleny Puerta, del programa de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Huie CM, Di X. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *J Chromatogr B*. 2004 Dec; 812 (1-2): 241-257.
2. Arisawa M, Fujita A, Saga M, Fukumura H, Hayasi T, Shimizu M, et al. Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. *J Nat Prod*. 1986; 49 (4): 621-625.
3. Paterson RRM. *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*. 2006 Sep; 67 (18): 1985-2001.
4. El-Mekkawy S, Meselhy M, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, et al. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 1998; 49 (6): 1651-1657.
5. Sadava D, Still D, Mudry R, Kane S. Effect of *Ganoderma* on drug-sensitive and multidrug-resistant small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2009 May; 277 (2): 182-189.
6. Seto SW, Lam TY, Tam HL, Au ALS, Chan SW, Wu JH, et al. Novel hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* water-extract in obese/diabetic (+db/+db) mice. *Phytomedicine*. 2009 May; 16 (5): 426-436.
7. Ajith TA, Sudheesh NP, Roshny D, Abishek G, Janardhanan KK. Effect of *Ganoderma lucidum* on the activities of mitochondrial dehydrogenases and complex I and II of electron transport chain in the brain of aged rats. *Exp Geront*. 2009 Mar; 44 (3): 219-223.
8. Min B-S, Gao J-J, Nakamura N, Hattori M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells. *Chem Pharm Bull*. 2000 Jul; 48 (7): 1026-1033.
9. González AG, León F, Rivera A, Muñoz CM, Bermejo J. Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *J Nat Prod*. 1999 Dec; 62 (12): 1700-1701.
10. Galli G, Maroni S. Mass spectrometric investigations of some unsaturated sterols biosynthetically related to cholesterol. *Steroids*. 1967 Sep; 10 (3): 189-197.
11. León JF. Química y síntesis de los principios activos aislados de hongos superiores. Sus posibles aplicaciones farmacológicas. [Tesis doctoral]. [Tenerife, España]: Universidad de la Laguna: 2005. 325 p.
12. Seo HW, Hung TM, Na M, Jung HJ, Kim JC, Choi JS, et al. Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. *Arch Pharm Res*. 2009; 32 (11): 1573-1579.
13. Kac D, Barbieri G, Falco MR, Seldes AM, Gros EG. The major sterols from three species of polyporaceae. *Phytochemistry*. 1984; 23 (11): 2686-2687.
14. Yuan JP, Wang JH, Liu X, Kuang HC, Huang XN. Determination of ergosterol in *Ganoderma* spore lipid from the germinating spores of *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2006 Aug 23; 54 (17): 6172-6176.

15. Martínez A. Esteroles. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia; 2002. 37 p.
16. Zjawiony JK. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. *J Nat Prod.* 2004 Feb; 67 (2): 300-310.
17. Niedermeyer THJ, Lindequist U, Mentel R, Gördes D, Schmidt E, Thurow K, *et al.* Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *J Nat Prod.* 2005 Dic; 68 (12): 1728-1731.
18. Lin CN, Tome WP, Won SJ. Novel cytotoxic principles of Formosan *Ganoderma lucidum*. *J Nat Prod.* 1991 Jul; 54 (4): 998-1002.
19. Gan K-H, Fan Y-F, Hsu S-H, Kuo K-W, Lin C-N. Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *J Nat Prod.* 1998 Apr; 61 (4): 485-487.
20. Lin L-J, Shiao M-S, Yeh S-F. Seven New Triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *J Nat Prod.* 1988 Sep; 51 (5): 918-924.
21. de Silva ED, Van der Sar SA, Santha L, Wijesundera RLC, Cole ALJ, Blunt JW, *et al.* Lanostane triterpenoids from the Sri Lankan Basidiomycete *Ganoderma applanatum*. *J Nat Prod.* 2006 Aug; 69 (8): 1245-1248.
22. Min BS, Nakamura N, Miyashiro H, Bac KW, Hattori M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem Pharm Bull.* 1998 Oct; 46 (10): 1607-1612.
23. Chen Y, Yan Y, Xie M-Y, Nie S-P, Liu W, Gong X-F, *et al.* Development of a chromatographic fingerprint for the chloroform extracts of *Ganoderma lucidum* by HPLC and LC-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Jul; 47 (3): 469-477.
24. Chen Y, Xie M-Y, Yan Y, Zhu S-B, Nie S-P, Li S, *et al.* Discrimination of *Ganoderma lucidum* according to geographical origin with near infrared diffuse reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. *Anal Chim Acta.* 2008 Jun; 618 (2): 121-130.
25. Chen Y, Zhu S-B, Xie M-Y, Nie S-P, Li W, Li C, *et al.* Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. *Anal Chim Acta.* 2008 Aug; 623 (2): 146-156.

WHAT'S NEW IN Vitae ?

REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

The Scientific and Editorial Board is delighted to announce you that Vitae has been accepted for addition in Scopus.

Scopus is the largest abstract and citation database of research literature and quality web sources covering nearly 18,000 titles from more than 5,000 publishers!



SINCE 1991:



We've improved and expanded in the last two years:

