

3

Actividad biológica de hongos endofitos presentes en dos plantas medicinales: Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui* J.F. Gmel) y Ñachag (*Bidens Andícola Kunth*)

Manuel Ernesto Delgado Fernández¹, Marinella Rodolfi, Santiago Cristóbal Vásquez Matute², Ximena Marisol Icaza Samaniego³

1. Introducción

El propósito de esta investigación fue el estudio de una especie de hongos denominados endófitos, aislados de dos plantas consideradas ancestralmente como medicinales, *Chuquiragua Jussieui* y *Bidens Andícola Kunth*, plantas nativas del Parque Nacional El Cajas, Cuenca, Ecuador.

Se pretende determinar la actividad biológica mediante análisis in vitro utilizando como técnica cultivos duales y establecer su interacción antagonista frente a hongos y bacterias fitopatógenas. Se estudian los hongos fitopatógenos: *Botrytis Cinerea*, *Phragmidium Disciflorum*, *Colletotrichum Gloesporoides*, *Oidium sp.* *Guignardia Citricarpa*, *Pestalotia sp.* *Plasmopara Vitícola*, *Pythium sp.* *Taphrina Deformans*, *Fumago sp.* *Monilia Roreri*, *Ceratocystis Fimbriata*, *Bremia Lactucae*. También las bac-

1 Licenciado en Química y Biología por la Universidad de Cuenca, Máster en Ciencias y tecnología, para la utilización sostenible de los recursos naturales no tradicionales por la Università degli studi di Pavia – Italia, docente de las carreras de Ingeniería Agropecuaria y Ambiental, de la Universidad Politécnica Salesiana; Laboratorio de Biotecnología Campus Juan Lunardi Cuenca - Ecuador.

2 Egresado de la carrera de Ingeniería Agropecuaria Universidad Politécnica Salesiana.

3 Egresada de la carrera de Ingeniería Agropecuaria Universidad Politécnica Salesiana.

terias de los géneros *Erwinia sp.*, *Agrobacterium Tumefacens*, *Pseudomonas sp.* y *Xanthomonas sp.*

Para entender la temática necesariamente debemos tener un concepto claro de lo que es un hongo endófito cuyo término, según Chanway (1996) se deriva del griego *endon* ('dentro') y *phyte* ('planta'). El primero en definir el término fue De Bary (1866); aunque, en 1971, se definió al endofitismo como el estado de un organismo que vive en el interior de otro, en contraposición a la condición de hepifitismo. Carrol (1986) definió los hongos endófitos como endosimbiontes y excluyó de este grupo los hongos patógenos y asociaciones de micorrizas. En 1994, Wennstrom no fue el único en polemizar sobre el uso de la palabra y propone una redefinición de endófito, y propone utilizar la definición original: un organismo que vive en el interno de otro. Otras informaciones recalcan que estos hongos viven asintómicamente en la planta la mayor parte de su ciclo vital, tienen esporulación limitada en breves periodos y, en algunos casos, pueden estimular el desarrollo y la fuerza competitiva del huésped.

Wilson (1995) revisa el significado del término y define los hongos endófitos como hongos que invaden los tejidos de plantas vivas. Pueden ser sistémicos, asistémicos o mutualísticos; otros, en cambio, se manifiestan como parásitos o algo similar, pudiendo vivir en la planta durante su ciclo vital o parte de él. Esto excluye las asociaciones de micorrizas a la vez que incluye hongos que son patógenos que no representan síntomas en el tejido. Según Dreyfuss, los hongos endófitos representan la más grande reserva de especie fungina pero recordemos que es un campo de investigación relativamente nuevo y que, seguramente, todos los estudios que se lleven a cabo contribuirán a una mayor comprensión a cerca del tema.

Sobre los hongos endofitos se han realizado muy pocos estudios, pero existen trabajos científicos en las zonas tropicales como los de Dreyfuss and Petrini (1984), Rodríguez and Samuels (1990), Rodríguez and Samuels (1992); por lo tanto, debido a la gran biodiversidad, hay un gran campo de investigaciones pendientes para esta zona ecológica. También se conocen trabajos que se llevan a cabo en plantas que viven en ambientes extremos, como los desiertos y la Antártica. El conocimiento

sobre los hongos endófitos permitirá aplicaciones de gran importancia, como el control biológico de plagas y enfermedades, que dependerán de la capacidad y el potencial para producir metabolitos secundarios utilizables en el campo médico, fitopatológico e industrial, cualquiera que sea el uso que se les pueda dar. Estas aplicaciones dependen de modelos de investigación que parten de la interacción huésped-parásito y la evolución del sistema natural.

Las gramináceas, igualmente, son objeto de intensos estudios para determinar la causa del impacto ecológico que tiene el huésped sobre la comunidad vegetal. Las primeras investigaciones en este sentido tuvieron lugar en 1941 y las realizó Neil, quien determinó la asociación entre la *Festuca Orundinaceae* y el hongo endófito *Epichloe typhina* y *Acremonium coenophialum*. Tales investigaciones fueron el punto de partida de futuros estudios en el área cuyo objetivo consiste en determinar la relación hongo-vegetal.

En la bibliografía analizada, no se encuentran datos acerca del análisis antagónico *in vitro* de hongos endófitos de dos plantas: la *Chuquiragua Jussii* y *Bidens Andicola Kunth*, frente a hongos fitopatógenos y hongos endófitos, frente a bacterias fitopatógenas. La presente investigación se fundamenta en la capacidad antagónica de éstos.

Al ser los hongos uno de los problemas más grandes de la patología vegetal, esta investigación se encamina a la aplicación de hongos endófitos en el control biológico de enfermedades fitopatógenas causadas por hongos. Las bacterias, también constituyen un problema fitopatológico, por ser consideradas al igual que los hongos los mayores degradadores de sustancia orgánica, aunque, las bacterias, tienen una ventaja por su capacidad de degradar sustratos sólidos y compactos.

La pregunta que guía la investigación es la siguiente: ¿Se podría considerar los hongos endófitos como antagonistas de hongos y bacterias fitopatógenas? El resultado general consiste en que, mediante cultivos *duales in vitro*, se logra establecer, en primer lugar, los porcentajes de inhibición de los hongos endófitos con respecto a hongos y bacterias comunes cau-

santes de enfermedades en diferentes cultivos; en segundo lugar, es posible determinar la actividad biológica de los hongos endófitos y estudiar su interacción antagonista frente a hongos fitopatógenos y bacterias. Todo ello con el propósito de indagar el uso de estos microorganismos para el control biológico de enfermedades fitopatológicas, la meta que justifica esta investigación.

2. Materiales y métodos

Respecto al área estudiada, los detalles son los siguientes: El parque Nacional El Cajas, se encuentra ubicado a sólo 33 km. al occidente de la ciudad de Cuenca, al sur del Ecuador en la provincia del Azuay. El parque nacional dispone de una biodiversidad única a lo largo y ancho de un área de 28.544 ha. Existen en el parque 235 lagunas las más importantes son Lagarto Cocha, Oso Huaico, Taitachugo, Toreadora, Ventanas, etc. En este parque Nacional se originan los ríos Tomebamba y Yanuncay, que, a su vez, atraviesan la ciudad de Cuenca.

El Cajas constituye el centro de abastecimiento de agua para la ciudad de Cuenca. La temperatura promedio anual es de 15,7 °C, y la precipitación media mensual es de 75,6 mm, con su máximo en los meses de febrero y marzo (INAMI 2006). El sector se encuentra dentro de las siguientes coordenadas: Longitud: 079°11,366 W hasta 079°11,893 W, Latitud: 03°57,966 S hasta 03°59,343 S. Altitud: 2.125 hasta 2.144 msnm.

Para la investigación, se consideran 3 zonas:

ZONA 1. Coordenadas UTM. 17 696532 E; 9692756 N; Altitud 3972 MSNM. Coordenadas LAT. LONG. 02° 46.701 S; 079° 13.9270 O; Altitud 3972 MSNM.

ZONA 2. Coordenadas UTM. 17 699313 E; 9691739 N; Altitud 3892 MSNM. Coordenadas LAT. LOG. 02°47.251 S; 079°12.424 O; Altitud 3892 MSNM.

ZONA 3. Coordenadas UTM. 17 700210 E; 9692189 N; Altitud 3691 MSNM. Coordenadas LAT. LONG. 02°47.005 S; 079°11.942 O; Altitud 3693 MSNM.

A continuación se detalla los pasos metodológicos y los respectivos procedimientos empleados en lo procesos de Insolamiento, taxonomía y valoración de la actividad antagónica de los hongos endófitos estudiados.

2.1 Insolamiento y taxonomía de hongos endófitos

Esterilización de la muestra

La esterilización de las muestras, de cualquier parte de la planta, comienza con el lavado en agua corriente; luego se procede a la esterilización superficial siguiendo métodos y recomendaciones establecidas (Rodríguez 1992-1994); se considera partes del vegetal, sanas y libres de enfermedades. Se realizaron inmersiones en etanol (C₂H₅OH) al 75% e hipoclorito de sodio (NaClO) con una concentración del 3,41% dependiendo del tipo de material vegetal. Con las muestras de *Chuquiragua jussii* J.F.Gmel, por disponer de hojas robustas, se realizó la esterilización con un tiempo de tres minutos en hipoclorito de sodio y un minuto en etanol. Con las muestras de *Bidens Andicola* Kunth, por disponer de hojas y flores sutiles, se tomó en cuenta un tiempo de treinta segundos para el hipoclorito de sodio y treinta segundos para el etanol.

Teniendo en cuenta condiciones estériles, se cortaron muestras del vegetal de 3 a 4 mm² tratando de ubicar el corte entre la nervadura central y el borde de la hoja, esto en el caso del vegetal *Chuquiragua Jussii*, con respecto a la *Bidens Andicola*, se tomaron muestras de los pétalos de la flor por ser la parte del vegetal considerada con propiedades medicinales. Los cortes de los vegetales, se inocularon en cajas Petri (100 x 15 mm) con Agar extracto de malta, (MEA; DIFCO) a razón de 5 muestras por caja. Luego, se insolaron en cajas Petri de igual tamaño con el objeto de obtener cultivos puros; y, finalmente, se desarrolló el mismo procedimiento en tubos de ensayo con PDA Difco a pico de clarín. Para evitar el desarrollo de bacterias se utilizó cloranfenicol 250 mg/l.

El desarrollo de la colonia fungina se controló diariamente con la ayuda de un estéreo microscopio. La identificación y morfometría se llevó a cabo a través de un microscopio, mediante la preparación de placas, utilizando como tinción lacto fenol de Amann o lacto fucsina ácida. El lacto fenol es incoloro y permite ver la coloración propia de los micromicetes. Al contrario, la fucsina ácida es un colorante que evidencia más intensamente las características estructurales funginas. La identificación de los hongos y su clasificación se hizo por medio de claves y referencias bibliográficas, con la colaboración del Dipartimento di Ecología del Territorio e degli Ambienti Terrestre, Università di Pavía-Italia. El diseño experimental usado es la prueba CHI cuadrado para determinar los niveles de infestación de hongos endófitos en las tres zonas consideradas.

2.2 Insolamiento y taxonomía de hongos fitopatógenos

La caracterización de hongos fitopatógenos, de mayor incidencia en la zona del austro, así como de la región Costa, se considera un objetivo de la investigación, además, del Insolamiento y caracterización de bacterias, consideradas patógenas, y asociadas al cultivo del babaco (*Carica pentagona*). La caracterización morfológica se basó principalmente en la estructura y composición (conidios, conidióforos, etc.) a partir de la información de Barnett y Hunter (1998). Para el aislamiento del patógeno y la caracterización se tomaron muestras del vegetal; luego se lavaron con agua destilada y se cortaron muestras del vegetal afectado por la enfermedad. Las muestras se tomaron del borde de la hoja; en la cámara de flujo laminar se procedió a desinfectar las mismas, con hipoclorito de sodio al 4% y con etanol al 75% por un tiempo variable. Luego se colocaron en un medio de cultivo para hongos para cuyo caso se utilizó PDA (DIFCO) en cajas Petri de (100 x 15 mm) en las que se colocó 5 muestras en cada una. Posteriormente, se hizo el control del desarrollo (esporificación), siguiendo el procedimiento detallado anteriormente, con el objetivo de obtener cultivos puros, en este caso de hongos fitopatógenos, que posteriormente serán identificados y clasificados taxonómicamente mediante el uso de un microscopio y la elaboración de placas. Para la clasificación taxonómica se aplicaron claves, referencias bibliográficas y manuales de identificación

específicos para los géneros en estudio. En el caso de las bacterias, se tomaron muestras de vegetal afectado (*Carica pentagona*) El aislamiento de las bacterias consistió en cortar muestras del vegetal, en segmentos, que fueron desinfectados superficialmente con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 0,05% durante un minuto cada uno y enjuagados con agua destilada estéril. Los segmentos se transfirieron a un cristal de reloj estéril donde se maceró el tejido con la ayuda de una espátula de metal. Del macerado resultante se tomó una azada, (aza de platino para cultivo de bacterias) la cual fue estriada, en zing-zag en medio TSA (agar de soya y tripti-casa). La caracterización, se basó en manuales y descripción de los géneros, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium* y *Erwinia carotovora*.

2.3 Valoración *in vitro* de la actividad de antagonismo cultivo dual hongo endófito-hongo fitopatógeno

Para el empleo del test, se parte de cultivos monospóricos según el método de cultivos duales, con puntales estériles; se toman fragmentos de micelio de 4 a 5 mm de diámetro y tomados de los cultivos monospóricos en desarrollo, en un terreno PDA, e inoculados en una cámara de flujo laminar, en cajas Petri de (100 x 15 mm) que contienen el mismo terreno. Los dos micelios a antagonizar son inoculados a 4 cm de distancia (2,5 cm de distancia del borde de la caja). En cada prueba se lleva una caja de control obtenida del mismo cultivo madre (monospórico) e inoculado sobre PDA a la distancia de 2,5 cm del borde de la caja Petri. Todos los test se llevan a cabo en duplicado, en este caso los cultivos. Se ha tenido especial cuidado en mantner la temperatura ambiente y se realizaron mediciones diarias del radio dirigido hacia el centro de la caja. La inibición de los hongos fitopatógenos opuestos a los hongos endófitos se expresa como porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio según la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \times (R - r) / R$$

Donde R y r respectivamente, son el radio dirigido hacia el centro de la caja en el control y en el cultivo dual según Watanabe (1980) y otros autores (Dalla Valle and Zechini D· Aurelio, 1989; Pearce, 1990; Varese and

Luppi-Mosca, 1991). Los tipos de interacción observados, se establecen en las siguientes categorías:

- A. Inhibición recíproca de contacto (la colonia tiene igual o diversa vellosidad de desarrollo);
- B. Inhibición a distancia (las dos colonias se inhiben recíprocamente sin entrar en contacto);
- C. Inhibición unilateral con contacto de la especie opuesta (la especie opuesta inhibida crece al tener contacto con el endófito cuyo desarrollo es inalterado);
- D. Inhibición unilateral a la distancia (la especie opuesta es fuertemente inhibida de parte del endófito y su desarrollo es inalterado);
- E. Inhibición unilateral con fuga de la especie opuesta.

Los resultados se expresan mediante un índice de inhibición (ii) calculado como la sumatoria del porcentaje de inhibición, mostrado por la especie opuesta respecto al total del test (N), tal como se evidencia en la siguiente fórmula:

$$ii = \sum \text{Inhibición (\%)} \text{ de la especie opuesta}/N$$

2.4 Cultivo dual hongo-bacteria

La metodología es muy parecida, de tal manera que del margen de colonias funginas en crecimiento sobre terreno PDA, se cortan y retiran, con puntales estériles, discos de micelio de 4 mm de diámetro. Luego son inoculados en cajas de 9 cm de diámetro que contienen 20 cc del mismo terreno, a una distancia de 2,6 cm del margen de la caja, mientras que a una distancia de 3,7 cm se inocula una suspensión bacterica de 0,5 ml (1 McFarland).

2.5. Análisis microscópico

Las pruebas duales se completan con el análisis microscópico de fragmentos de micelio de las colonias en contacto, y de las áreas marginales, para determinar las posibles alteraciones morfológicas de los microorganismos. (Girlanda & Luppi – Mosca, 1992; Prasun & Kanthadai, 1997).

3. Conclusión

Se ha logrado clasificar taxonómicamente los hongos endófitos de los géneros: “*Chuquiragua jussieui*” *Cladosporium* spp, *Coelomycetes*, *Fusarium* spp, *Nigrospora* sp, *Alternaria like*; *Phoma* spp. “ÑACHAG” *Bidens andicola kunth*, se identifica 5 géneros de hongos diferentes: *Alternaria* spp; *Cladosporium* spp; *Coelomycetes*, *Fusarium* spp; *Nigrospora* sp.

Esta investigación sobre la presencia de endófitos fúngicos en las plantas chuquiragua (*Chuquiragua Jussieui*) y Ñachag (*Bidens Andicola Kunth*), consideradas medicinales en la farmacopea homeopática nacional, demostró que varias especies de hongos y especialmente los micelios estériles aislados podrían constituir un óptimo y quizás inocuo material biológico para investigaciones futuras, en particular por la marcada actividad antagónica con hongos y bacterias fitopatógenas, considerando las perspectivas del uso de estos microorganismos para la elaboración y formulación de productos para el control biológico de enfermedades fitopatógenas causadas por hongos y bacterias. El porcentaje más elevado de antagonismo se da con el hongo AX (micelios estériles) con un porcentaje del 89,1% frente a *Colletotrichum gloeosporoides*, agente causal de la antracnosis en el tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*)

En cuanto a las bacterias fitopatógenas, se consideran los cuatro géneros (*Agrobacterium* sp.; *Erwinia* sp; *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp.) agentes causales de enfermedades y de mayor incidencia en vegetales. Los resultados de cultivos duales *in vitro*, de igual manera, son muy satisfactorios.

4. Discusión

Considero muy importante la investigación, por los resultados obtenidos, ya que no se han llevado a cabo trabajos de investigación referidos al uso de hongos endófitos como agentes antagonistas de microorganismos fitopatógenos. Esta investigación representa una base para trabajos de investigación futuros relacionados con el control biológico de enfermedades fitopatológicas

En la actualidad, quizá el problema más grave para los agricultores que se dedican al cultivo de tomate (*Cyphomandra betaceae*) en el austro es la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporoides*. La presente investigación recomienda el uso de microorganismos antagonistas (hongos endófitos) para la formulación de productos biológicos para el control de dicha enfermedad.

Bibliografía

- AINSWORTH, G.C.
1971 Dictionary of the fungi. VI ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 616 pp. Cambridge.
- ALDOUS, D.E., Isaacs, S. and Mebalds, M.I.
1999 *Endophytes in the genus Neotyphodium are not found in Australian native grasses*. Australasian Plant Pathol. 28(3), 183-186.
- ANDREWS, J.H.
1984 "Life history strategies of plant parasites". In Ingram, D.S. and Williams P.H. (eds.), *Advances in Plant Pathology* – Vol. 2. Academic Press, London, 303 pp.
- ANDREWS, J.H.
1992 "Fungal life history strategies". In Carrol, G.C. and Wicklow, D.T. (eds.), *the fungal community: its organization and role in ecosystem*. 2nd Ed. Dekker, New York, pp. 119-146.
- ANDREWS, J.H. and Rouse, D.I.
1982 *Plant pathogens and the theory of r- and K- selection*. American Nat. 120, 283-296.
- BACON, C.W. and Williamson, J.W.
1992 Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. *Mycopath.* 117, 65-71.
- BACON, C.W., Lyons, P.C., Porter, J.K. and Robbins, J.D.
1986 *Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review*. Agron. J. 78, 106-116.
- BACON, C.W. and Siegel, M.R.
1988 *Endophyte parasitism of tall fescue*. J. Product. Agricult. 1, 45-55.
- BARKLUND, P. and Unestam, T.
1988 *Infection experiments with Gremmenella abietina on seedlings of Norway spruce and scots pine*. Eur. J. For. Pathol. 18, 409-420.
- BARRET, J.A.
1983 *Plant-fungus symbioses*. In Futuyma, D.J. and Slatkin, M. (eds.), *Coevolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, pp. 137-160.
- BARRET, J.A.
1986 "Host-parasite interactions and systematic". In Stone, A.R. and Hawksworth, D.L. (eds.), *Coevolution and Systematic*. Clarendon Press, Oxford, pp. 1-17.

- CARROL, G.C.
1991 *Beyond pest deterrence – Alternative strategies and hidden costs of endophytic mutualisms in vascular plants*. In Andrews, J.H. and Hirano, S.S. (eds.), *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New-York, pp. 358-375.
- CARROL, F.E., MÜLLER, E. and SUTTON, B.C.
1977 *Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers*. *Sydowia* 29, 87-103.
- CARROL, G.C. and CARROL, F.E.
1978 *Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest*. *Can. J. Bot.* 56, 3034-3043.
- CURTIS, Elena, BARNES, N. Sue, Schenek Adriana, Flores Graciela,
2000 *Biología*, México, Editorial Médica Panamericana, Sexta edición,
- CLAY, K.
1988 *Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi*. *Ecology* 69, 10-16.
- CLAY, K.
1995 *Correlates of pathogen species richness in the grass family*. *Can. J. Bot.* 73(1), 42-49.
- DE BARY, A.
1879 *Die Erscheinung der Symbiose*. Trübner, Strasbourg.
- DREYFUSS, M. and Petrini, O.
1984 *Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants*. *Botanica Helvetica* 94, 33-40.
- DREYFUSS, M.
1989 *Microbial diversity. Microbial Metabolites as sources for new drugs*. Princeton Drug Research Symposia, Princeton, 213 pp.
- ESPOLA, M.
2005 *Catastro de hongos endófitos miceliales en *ThrinaxMorrisii* h. wendl. en el bosque estatal de susúa, sabana grande, Puerto Rico*. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.
- FERNÁNDEZ, Valiela
1975 *Introducción a la fitopatología vegetal*, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Buenos Aires, Argentina.
- FISHER, P.J. and Petrini, O.
1992 *Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.)*. *New Phytol.* 120(1), 137-143.
- LEYRONAS, C. and Raynal, G.
2001 *Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses*. *Ann. Appl. Biol.* 139(1), 119-127.
- PETRINI, O.
1981 *Fungal endophytes of tree leaves*. In: Andrews J.H., Hirano S.S. (Eds.) *microbial ecology of leaves*. Springer- Verlag, New York, pp.179-197.

PICCO, A. M. & Rodolfi, M.

2004 *Endophytism in grasses with reference to an experience in Northern Italy*. In: Ragazzi A - Italy.

RAMÍREZ, R. Jorge Yandry, Ernesto DELGADO FERNÁNDEZ, Marinella RODOLFI, Tosi SOLVEIG

2005 *Actividad antagonica de hongos endofitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas*; Boletín Micológico Universidad Valparaíso - Chile.