

ACCION DE EXTRACTOS ALGALES ACUOSOS Y
ETEREOS DE *NOSTOC MUSCORUM* AG. (Nº 79a)
II—EFECTO SOBRE EL DESARROLLO DEL HONGO
CUNNINGHAMELLA BLAKESLEANA (—) EN EL MEDIO
MEHLICH.¹

POR MARIA CRISTINA Z. DE MULE², GLORIA Z. DE CAIRE², SUSANA
DOALLO³, DELIA R. DE HALPERIN⁴ y LEONARDO HALPERIN⁵.

SUMMARY

In a previous paper (Caire et al., 1976), biological activity of ether and aqueous algal extracts of *Nostoc muscorum* Ag (79a) on millet seedlings was detected. As an inhibitory effect was observed of the aqueous extracts on a "damping-off" attack, an experiment was planned to determine their action on the soil fungus *Cunninghamella blakesleana* (—), by 1) incorporating the algal extracts to the culture media and 2) by a previous treatment of fungus' spores.

The following results were obtained: a) no differences were observed between both treatments; b) algal aqueous extracts inhibited mycelium development, being the aqueous half diluted extract the most effective; c) aqueous extracts of *Nostoc muscorum* (79a) contain some substances with inhibitory action on *Cunninghamella blakesleana* (—).

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (Caire et al., 1976) se detectó la actividad antifúngica estadísticamente significativa de extractos acuosos diluídos de *Nostoc muscorum* Ag. (Nº 79a), sobre un hongo productor de

¹ Contribución Científica Nº 138 del Centro de Investigación de Biología Marina (CIBIMA), Libertad 1235, Bs. Aires, Argentina.

Trabajo presentado en las "XV Jornadas Argentinas de Botánica y XI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal", realizadas en Buenos Aires del 25 al 28 de Abril de 1976.

² Licenciadas en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

³ y ⁵ Licenciada en Ciencias Agrarias e Ing. Agrónomo, Centro de Investigaciones de Recursos Naturales, Unidad Edafología Agrícola (INTA).

⁴ Investigador del CIBIMA. Miembro de la Carrera del Investigador, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

"damping-off" en plántulas de mijo. Como en esa oportunidad el ataque fue controlado por dichos extractos, se consideró de interés comprobar si el efecto inhibitorio era extensivo a otros hongos del suelo. Con este objeto se estudió la acción de extractos acuosos y etéreos de *N. muscorum* sobre *Cunninghamella blakesleana* (-), hongo común del suelo.

Se realizaron paralelamente 2 series de ensayos: 1) Incorporando los extractos algales al medio de cultivo. 2) Haciendo actuar los extractos algales sobre las esporas, previamente a la siembra en el medio de cultivo.

En ambas series de experiencias se hicieron observaciones cualitativas sobre el desarrollo del hongo a los 4 días de la siembra; se midió el pH del filtrado al finalizar el ensayo y se determinó el peso seco del micelio producido.

MATERIAL Y METODOS

A) CEPAS UTILIZADAS:

1. *Nostoc muscorum* Ag. (Nº 79a), cuyo origen y condiciones de mantenimiento se indicaron en un trabajo anterior (Caire et al., l. c.).

2. *Cunninghamella blakesleana* (-): cultivo facilitado por la Dra. Nydia Spedalieri de Núñez (INTA), a quien agradecemos su gentileza. Se lo mantuvo en tubos de ensayo de 16x160 mm en medio Martin agarizado.

Como inóculo se utilizaron cultivos de 19 días en este mismo medio, en frascos chatos de 17 cm de altura y 4 cm de ancho, con una capa de medio nutritivo de 0,5 cm aproximadamente de espesor (50 ml de medio por cada frasco).

B) MEDIOS DE CULTIVOS:

1. *Medio Martin agarizado* (sin antibióticos), tomado de Johnson et al. p. 145, 1960: $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1 g; peptona 5g; dextrósa 10 g; agar 20 g; agua destilada 1.000 ml; Rosa de Bengala 1:30.000. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

2. *Medio Mehlich líquido* (1935): glucosa 25 g; $\text{NO}_3(\text{NH}_4)$ 2,5 g; peptona 0,5 g; solución stock 5 ml; agua destilada 1.000 ml.

Solución stock de sales inorgánicas: ClK 20 g; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g; $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; agua destilada 1.000 ml.

Al medio Mehlich se agrega luego la fuente de fósforo que se desee; en nuestro caso se añadieron 7,5 p.p.m. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 7,5 p.p.m. de PO_4HK_2 . El pH del medio fue de 6,5 tomado con pH-metro. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

C) OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETÉREOS Y ACUOSOS A PARTIR DE LA MASA ALGAL:

La preparación de los mismos así como las diluciones utilizadas se indicaron en el trabajo anterior ya mencionado:

Extractos etéreos: Ex = original; $E\frac{1}{2}-x$ y $E\frac{1}{4}-x$.

Extractos acuosos: Ax = original; $A\frac{1}{2}-x$ v $A\frac{1}{10}-x$.

Se utilizaron 4 ml de cada uno de los extractos, a razón de 1 ml por cada repetición.

D) PREPARACIÓN DEL INÓCULO: a partir de un cultivo de *Cunninghamella blakesleana* (-) de 19 días en medio Martin agarizado, se preparó una suspensión de esporas en agua destilada estéril, de la cual 0,1 ml contenían 1463 esporas según recuento realizado con la cámara cuenta glóbulos de Thoma, previa homogeneización con agitador.

En el ensayo I las esporas inmersas en 4 ml de agua destilada estéril se mantuvieron 24 horas a 28°C. En el ensayo II las esporas se sumergieron en los extractos correspondientes durante 24 horas a 28°C. En el ensayo II las esporas se sumergieron en los extractos correspondientes durante 24 horas a 28°C, en tubos de ensayo estériles, cada uno de ellos con 4 ml de las distintas dosis de los extractos ensayados. Para el testigo, las esporas se sumergieron en agua destilada estéril.

E) METODOLOGÍA:

Para cada serie de ensayos (I y II), se emplearon 28 Erlenmeyers de 250 ml, con 100 ml de medio Mehlich.

Ensayo I: 24 Erlenmeyers se inocularon con los extractos correspondientes (6 tratamientos), a razón de 1 ml por cada repetición (4 repeticiones). Cada uno de dichos Erlenmeyers se sembró con 1463 esporas, inoculándose también 4 Erlenmeyers testigos.

Ensayo II: 24 Erlenmeyers se inocularon con la suspensión de esporas previamente sumergidas en los extractos correspondientes y mantenidas en estufa a 28°C durante 24 horas.

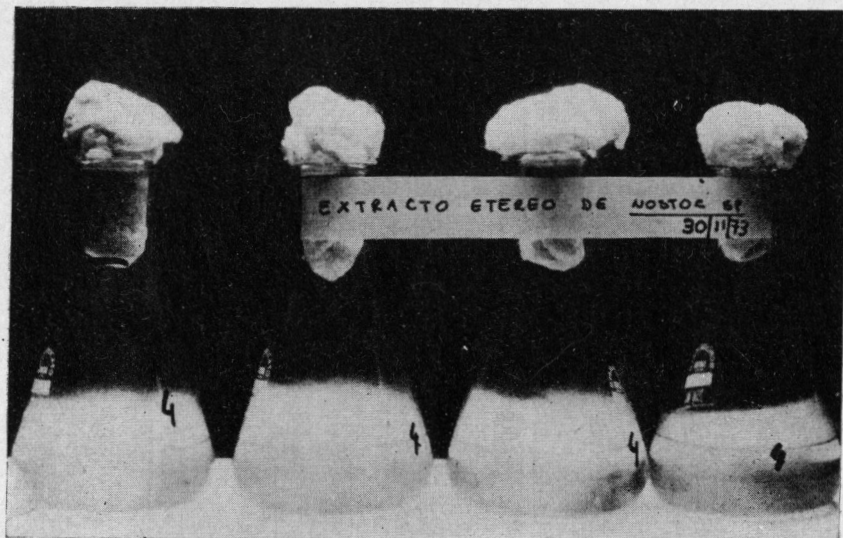
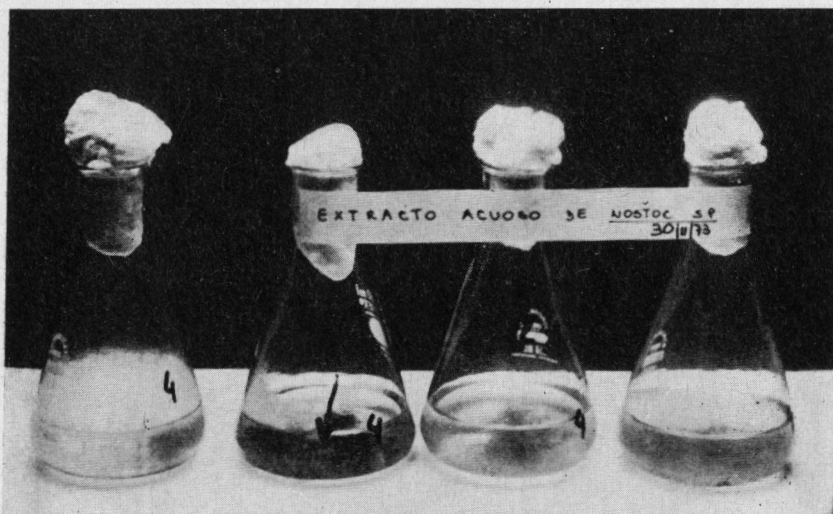
En ambas series (I y II) se hicieron por lo tanto 7 tratamientos con 4 repeticiones, formándose al azar 4 bloques de 7 tratamientos cada uno, a fin de aplicar el método estadístico de bloques al azar.

Cada uno de los bloques se ubicó en un piso diferente de la estufa. Los Erlenmeyer se incubaron a 28°C durante 21 días.

Al finalizar la experiencia, el contenido de cada Erlenmeyer se filtró con papel de filtro previamente tarado y se llevó a estufa a 70°C hasta peso constante, obteniéndose así el peso seco en gramos correspondiente a cada tratamiento.

RESULTADOS

A) OBSERVACIONES CUALITATIVAS SOBRE EL DESARROLLO DEL HONGO A LOS 4 DÍAS DE LA SIEMBRA:



Ensayo I: con los extractos Ax y $A\frac{1}{10}x$ se observaron colonias compactas, casi totalmente sumergidas en el medio; con el $A\frac{1}{2}x$ colonias compactas totalmente sumergidas. En el caso de los extractos etéreos se observaron colonias de tipo algodonoso con desarrollo dentro y fuera del medio de cultivo. Cualitativamente, con los extractos acuosos el desarrollo fue menor que en el testigo, correspondiendo la máxima inhibición a $A\frac{1}{2}x$.

Ensayo II: los extractos acuosos produjeron colonias compactas sumergidas en el medio; los etéreos dieron, como en el ensayo I, colonias de tipo algodonoso con desarrollo dentro y fuera del medio de cultivo. Cualitativamente, con los extractos acuosos el desarrollo fue menor que en el testigo, siendo para los etéreos algo mayor.

B) PROMEDIOS DE PESO SECO DEL MICELIO Y pH DEL MEDIO A LOS 21 DÍAS.

Ensayo I:

Tratamientos:	Peso seco en g	Diferencia respecto al testigo %	Cv % de las repeticiones	pH
T	0,161	-	7,4	3,0
Ax	0,108	-33	24,7	3,0
$A\frac{1}{2}x$	0,088	-46	31,6	3,5
$A\frac{1}{10}x$	0,109	-32	9,1	3,2
Ex	0,164	+ 2	9,9	2,9
$E\frac{1}{2}x$	0,164	+ 2	6,7	3,0
$E\frac{1}{4}x$	0,147	- 8	18,4	2,9

Estos resultados indican que el extracto $A\frac{1}{2}x$ disminuyó el peso seco del micelio en un 46 % con respecto al testigo, valor estadísticamente significativo según el test de Tuckey $\Delta_{0,05} = 63,6$. Las disminuciones determinadas por los extractos Ax (-33 %) y $A\frac{1}{10}x$ (-32 %) con

respecto al testigo, no fueron estadísticamente significativas al mismo nivel.

Análisis de la variancia

<u>Fuentes de variación</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Cuadrados medios</u>	<u>F</u>
Repeticiones	1342,68	3	447,56	
Tratamientos	24436,86	6	4072,81	6,13
Error	11956,57	18	664,25	

Promedio: 134,18

Desviación standard: 25,77

Coefficiente de variabilidad(%): 19,20

Ensayo II:

<u>Tratamientos:</u>	<u>Peso seco en g</u>	<u>Diferencia respecto al testigo %</u>	<u>Cv % de las repeticiones</u>	<u>pH</u>
T	0,159	-	10,3	3,1
Ax	0,116	-27	18,8	2,9
$A\frac{1}{2}x$	0,087	-45	4,4	3,3
$A\frac{1}{10}x$	0,121	-24	25,4	3,0
Ex	0,152	-4	8,2	2,9
$E\frac{1}{2}x$	0,165	+4	8,6	3,0
$E\frac{1}{4}x$	0,157	-1	3,9	2,9

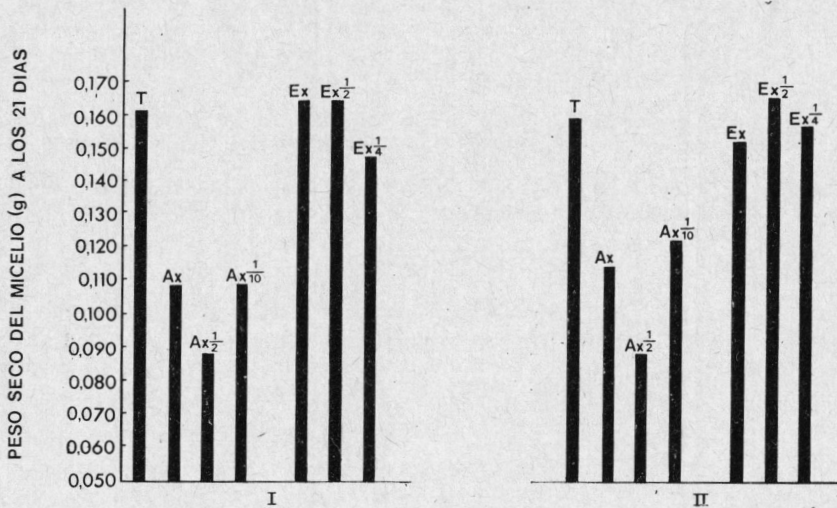
También en esta serie de ensayos, el extracto $A\frac{1}{2}x$ disminuyó el peso seco del micelio en un 45 % con respecto al testigo, valor estadísticamente significativo según el test de Tuckey $\Delta_{0,05} = 44,7$. Las disminuciones producidas por los extractos Ax (-27 %) y $A\frac{1}{10}x$ (-24 %) con respecto al testigo, no fueron estadísticamente significativas al mismo nivel.

Análisis de la variancia

<u>Fuentes de variación</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Cuadrados medios</u>	<u>F</u>
Repeticiones	986,43	3	328,81	
Tratamientos	20288,00	6	3381,33	8,39
Error	7252,57	18	402,92	

Promedio: 136,50
 Desviación standard: 20,07
 Coeficiente de variabilidad(%): 14,70

En ambas series de ensayos, no se observó correlación entre el pH y el peso seco del micelio.



En el gráfico puede verse que no se observaron diferencias entre los ensayos I y II, destacándose además el efecto inhibitorio de los extractos acuosos, en particular del $A-\frac{1}{2}x$. En las fotografías correspondientes a los crecimientos miceliales obtenidos con el tratamiento previo de las esporas (Serie II), puede apreciarse también la acción inhibitoria de dichos extractos acuosos.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se infieren las siguientes conclusiones:
 1ª No se observaron diferencias entre ambas series de ensayos,

dado que los resultados fueron similares incorporando los extractos al medio de cultivo o haciéndolos actuar previamente sobre las esporas.

2ª Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los del anterior (Caire et al., 1976), cabe señalar que los extractos acuosos que frenaron el ataque de "damping-off" también fueron los de mayor actividad inhibitoria sobre el desarrollo del micelio de *Cunninghamella blakesleana* (-). El extracto A $\frac{1}{2}$ -x resultó el más activo en ambos casos.

3ª Los extractos acuosos de *Nostoc muscorum* Ag. (79a) contienen alguna substancia con actividad biológica inhibitoria para el desarrollo de ciertos hongos del suelo.

BIBLIOGRAFIA

- GAIRE, G. Z. DE; MULÉ, M. C. Z. DE; DOALLO, S.; HALPERIN, D.-R. DE; HALPERIN, L. 1976. Acción de extractos algales acuosos y etéreos de *Nostoc muscorum* Ag. (Nº 79a). I-Efecto sobre plántulas de mijo (*Panicum miliaceum* L.) mediante tratamiento de sus semillas. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 17 (3-4): 289-300.
- JOHNSON, L. F.; CURL, E. A.; BOND, J. H.; FRIBOURG, H. A. 1960. *Methods for studying soil microflora-plant disease relationships*. Burgess Publ. Co., U.S.A. 178p.
- MEHLICH, A.; FRED, E. B.; TRUOG, E. 1935. The *Cunninghamella* plaque method of mesuring available phosphorous in soil. *Trans. 3rd. Int. Congr. Soil Sci.* 1: 168-171.

Agradecemos a la Srta. Delia Garrone Presedo (CIBIMA) por la confección del gráfico y al Sr. Miguel Contestáble (INTA) por las fotografías tomadas.