

MICOPARASITISMO BIOTRÓFICO DE *Fusarium oxysporum* SOBRE *Cunninghamella* sp.

(*Biotrophic mycoparasitism of Fusarium oxysporum on Cunninghamella sp.*)

Aida A. van Gelderen

Cátedra Micología, Instituto de Microbiología «Luis C. Verna»,
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán,
Ayacucho 491, (4000) San Miguel de Tucumán, R. Argentina.
E-mail: micologia@fbqf.unt.edu.ar

Palabras clave: Micoparasitismo biotrófico, *Fusarium oxysporum*, *Cunninghamella* sp.

Key words: Biotrophic mycoparasitism, *Fusarium oxysporum*, *Cunninghamella* sp.

RESUMEN

Se describe un caso de micoparasitismo biotrófico de ocurrencia natural en el suelo, entre las hifas de una cepa de *Fusarium oxysporum* complex y *Cunninghamella* sp. Las hifas de *F. oxysporum* se desarrollaron sobre las células vivas del hospedador, mostrando 2 tipos de efectos parasíticos: uno de enrollamiento y otro de contacto con penetración de las hifas, sin la aparente eliminación del hospedador. Esta situación poco común en la literatura, demuestra las capacidades adaptativas de esta especie al micoparasitismo en grupos filogenéticamente distantes.

INTRODUCCION

El micoparasitismo se define como el parasitismo de un hongo por otro hongo (el micoparásito) y es uno de los mecanismos por los cuales un hongo ejerce su acción sobre otro. Es un ataque directo con destrucción de algunas estructuras del hospedero y con aprovechamiento de sus componentes como nutrientes. El micoparásito puede penetrar por acción mecánica o por actividad enzimática. También se considera como simbiosis antagónica entre organismos (Manocha, 1991; Herrera Estrella *et al.*, 1998).

El micoparasitismo es un fenómeno común, observado «*in vivo*» e «*in vitro*» tanto en hongos inferiores como en los superiores (Herrera Estrella *et al.*, 1998). Pueden ser micoparasitados los hongos acuáticos, los saprófitos del suelo y los parásitos de plantas y de animales (Manocha, 1991). Barnett (1963), señaló que pocos problemas de la biología plantean preguntas más intrigantes que

Recibido: 26 Agosto 2009

Aceptado: 27 Noviembre 2009

ABSTRACT

This paper describes a case of mycoparasitism naturally occurring, where *Fusarium oxysporum* parasitizes hyphae of *Cunninghamella* sp, to show mycoparasitism between the two fungi. This is a case of biotrophic mycoparasitism by contact. The hyphae of *F. oxysporum* developed closely along the living cells of the host showing mycoparasitic effect, some for a loop, and other contact with penetration of the hyphae. This situation is rare in the literature, demonstrates the adaptive capacities of this species to mycoparasitism in phylogenetically distant groups.

la relación hospedero-parásito. Manocha (1991), considera que los estudios sobre micoparasitismo son escasos, comparados con los que determinan la relación hospedero vegetal-patógeno y los mecanismos de interacciones entre ellos, tales como, la especificidad y la resistencia.

Teniendo en cuenta la base nutricional de la relación parásito-hospedero, el micoparasitismo fue clasificado en dos grupos principales: necrotrófico y biotrófico (Manocha, 1991; Barnett *et al.*, 1973). Los micoparásitos necrotróficos o destructivos, matan a las células del hospedero, a menudo antes del contacto y de la penetración, y absorben los nutrientes, mientras que los biotróficos o balanceados tienen un contacto persistente con ocupación de las células vivas.

El micoparasitismo fue más estudiado en hongos usados como agentes de control biológico, que interfieren con la supervivencia de un patógeno o con sus mecanismos para provocar la enfermedad (micoparásitos necrotróficos). Estos, no son especializados y tienen un amplio rango de hospederos. Los más usados para control de fitopatógenos son *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. virens* y especies de *Phytium*, *Fusarium*, *Gliocladium*,

Ampelomyces, *Coniothyrium*, *T. alaromyces* y otros antagonistas. Su actividad como antagonista puede deberse a la inactivación de los sistemas de ataque del fitopatógeno por antibiosis, por competición de nutrientes y del espacio, y pueden ser influidos por factores ambientales en forma secuencial o combinada (Herrera Estrella *et al.*, 1998; Benhamouet *et al.*, 1993; Bélange *et al.*, 1995). También es importante la acción enzimática sobre la pared del hospedero, generalmente por enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, α -1-3 glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos, donde las últimas podrían ser responsables de la muerte del hospedador (Inbar *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1983; Elad *et al.*, 1987).

Se ha determinado que la invasión puede deberse a la formación de aglutininas, como fue observado en filtrados de *Rhizoctonia solani* y *T. harzianum* y en otros hongos; tal aglutinación, ocurre sobre iones calcio y magnesio, participando la galactosa de la pared celular de *T. harzianum*. Esto sugiere que una lectina presente en las hifas de *R. solani* se une a residuos de galactosa de la pared celular de *Trichoderma* (Manocha, 1991; Herrera Estrella *et al.*, 1998; Baker, 1987; Inbar *et al.*, 1997).

Antes del contacto, tiene lugar una secuencia de procesos bioquímicos y un estímulo direccional hacia el hospedero mediante sustancias difusibles. Las lectinas están involucradas en el reconocimiento y especificidad del ataque al hospedero por parte del antagonista (Baker, 1987; Elad *et al.*, 1983). Luego del reconocimiento, que incluye la localización y el crecimiento quimiotrópico, sigue el ataque (enrollamiento), lisis (por la excreción de enzimas) y la degradación celular del hospedero (Bruce *et al.*, 1995).

Los micoparásitos biotróficos son considerados más difíciles de definir, se alimentan de células vivas del hospedero, al cual invaden sin causarle la muerte. Tienen un rango restringido de hospedadores y producen estructuras especializadas para absorber sus nutrientes (Manocha, 1991; Herrera Estrella *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 1973), y muy pocas especies de este grupo son usadas como control biológico (Manocha, 1991; Inbar *et al.*, 1997).

De acuerdo a su morfología, fisiología y modo de nutrición, se reconocen tres tipos de micoparásitos biotróficos: I) los intracelulares o internos; II) los de contacto, que no penetran en las células del hospedero, pero desarrollan ramificaciones absorptivas especializadas o células que entran en contacto con el hospedero y III) los haustoriales que forman haustorio entre las células del hospedero para absorber nutrientes (Barnett *et al.*, 1973).

Se conocen especies que pueden actuar como micoparásitos biotróficos incluyendo el tipo de micoparasitismo que producen y en algunos casos los

hospederos sobre los que actúan. Así, **Chytridiales**, **Blastocladales**, **Plasmodiophorales** y **Lagenidiales**, son considerados micoparásitos intracelulares, mientras que los llamados deuteromycetes pueden ser micoparásitos de contacto para otros hospederos del mismo grupo y Ascomycetes relacionados. Los micoparásitos haustoriales pertenecen al taxon de los **Mucorales** meroesporangíferos (*Piptocephalis* y *Syncephalis*) y géneros de otros órdenes (*Dispira* y *Dirmargaris*) (Barnett *et al.*, 1973; Curtis *et al.*, 1978). En 2008, Jeffries aporta datos sobre los **Zygomycetes** al señalar que incluyen géneros de micoparásitos que difieren de su estrategia de parasitismo: biotróficos típicos como integrantes de los géneros *Piptocephalis*, *Dispira*, *Dicranophora*, *Spinellus* y *Sylgiles*, los cuales pueden formar asociaciones necrotróficas con características de necrotróficos y biotróficos, tales como *Chaetocladium* y *Syncephalis* (Jeffries, 2008; Jeffries *et al.*, 1994).

El presente trabajo describe un caso de micoparasitismo biotrófico donde *Cunninghamella* sp. es parasitada por *Fusarium oxysporum* complex.

MATERIALES Y METODOS

Procedencia

Las cepas fueron aisladas de muestras de suelo de Anfama, localidad aislada, de difícil acceso, con muy baja densidad de población, ubicada al NO de la provincia de Tucumán a 1.600 - 4000 m.s.n.m., al pie de imponentes cumbres (Cumbres Calchaquíes). Es una zona virgen, perteneciente a la biogeografía de Las Yungas, constituida por bosques montanos y pastizales de altura.

Técnica de aislamiento.

Se usó la Técnica de Vanbreuseghem para aislamiento de hongos queratinofílicos, usando pelos de niños como anzuelos de queratina a 28°C durante 30 días. A partir del desarrollo fúngico alrededor del pelo, se realizaron cultivos en agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y agar papa glucosada.

Para intentar la separación de ambos hongos, se practicaron aislamientos y siembras por extensión y agotamiento en superficie por diluciones sucesivas en medio Sabouraud al 10% a 45°C, aptos para el desarrollo de *C. bertholletiae* (especie termotolerante).

Identificación de las cepas.

Se identificaron por estudios macro y micromorfológicos, por análisis del micelio reproductivo (Rippon, 1988; de Hoog *et al.*, 2000). Se incluyó el estudio de la capacidad para crecer a 45°C para diferenciar especies de *Cunninghamella* con caracteres morfológicos semejantes

(*C.bertholletiae* de *C.elegans*).

Identificación de efectos micoparasíticos.

Se determinó la presencia de: crecimiento quimiotrópico, ataque por enrollamiento, alteraciones de las hifas y de estructuras vegetativas y reproductivas (lisis y degradación celular del hospedero), penetración del parásito en las hifas de este y formación de haustorios. Fueron observados en cultivos en medio de agar Sabouraud y agar papa glucosado de 30 días de desarrollo a 28°C.

Microscopía Electrónica.

Se realizaron estudios por microscopía electrónica de barrido, usando microscopio Zeiss Supra SSVP MEB, los que fueron realizados en el Centro Integral de Microscopía Electrónica del Centro Científico Tecnológico CONICET-Tucumán (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional de Tucumán), con sede en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

RESULTADOS

Los cultivos primarios y sus sucesivos trasposos, a 28 y 37 °C, estaban integrados por el desarrollo de dos hongos (*Cunninghamella* sp. y *Fusarium oxysporum* complex). Fueron de crecimiento rápido, con colonias blancas, algodonosas, tornándose ligeramente grisáceas con el tiempo y de reverso pálido. Los cultivos a diferentes temperaturas y mediante técnicas de aislamiento no permitieron la separación de ambas especies. Las cepas de *Cunninghamella* mantuvieron siempre al micoparásito en su interior en los cultivos a 28° y 37 °C, mientras a 45°C no hubo desarrollo de ninguno de los dos hongos.

En el estudio microscópico, se observaron hifas anchas no tabicadas, con reproducción asexual característica del género *Cunninghamella* e hifas tabicadas, ramificadas, hialinas, delgadas con reproducción asexual de *Fusarium*.

La cepa de *Cunninghamella* formó esporangios erectos, terminados en su ápice en vesículas globosas, de hasta 40 μm de diámetro, sobre las cuales se asentaban esporangios unicelulares, hialinos, de forma globosa a ovoideos y con pared celular ligeramente equinulada de hasta 11-12 μm de diámetro. No se observaron formaciones del estado teleomórfico ni zigosporas. Estos caracteres macro y micromorfológicos son compatibles con los de *C.bertholletiae* y *C.elegans*. La imposibilidad de separar *Cunninghamella* de *F.oxysporum* no permitió la aplicación de pruebas fisiológicas para identificar la cepa de *Cunninghamella* a nivel de especie.

F.oxysporum complex, presentó micelio aéreo blanco, con conidióforos cortos, simples, con células conidiógenas monofalídicas cortas, densamente ramificadas con el tiempo, dispuestas en racimos. La cepa formó abundantes microconidios en falsas cabezas, no dispuestos en cadena, generalmente no septados, elipsoidales a cilíndricos y abundantes macroconidios fusiformes, ligeramente curvados, la mayoría con 3 y hasta 5 septos (Figura 1 A).

Se identificaron dos tipos de interacción de hifas: I) Efecto micoparasítico por contacto con penetración de las hifas y II) Efecto micoparasítico por enrollamiento. Algunas hifas de *F.oxysporum* complex crecieron sobre las hifas del hospedador, durante los recorridos, sin penetrar en sus células, en contacto íntimo, y más raramente, desarrollando ramificaciones que penetraron en el hospedero, compatibles con hifas de naturaleza absorptivas (Figuras 1. B, C, D). En las condiciones de trabajo no fue posible observar en el lugar de contacto la presencia de septos que delimiten tubos germinativos, ni de poros, para el pasaje de nutrientes.

Las Figuras 1. B y C, muestran numerosos efectos de enrollamiento de hifas del micoparásito, alrededor de las hifas del hospedero (*Cunninghamella*). No se observaron otras alteraciones de las hifas ni de estructuras vegetativas y reproductivas del hospedero. Los sucesivos trasposos, mostraron ligera disminución del micelio reproductivo de *Cunninghamella* sp.

Las Figuras 2A, B, muestran imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del contacto íntimo de *F.oxysporum* complex, sobre hifas de *Cunninghamella* sp.

DISCUSION

La interacción de las hifas con numerosos efectos micoparasíticos de ataque (enrollamiento) de *F.oxysporum* sobre *Cunninghamella* sp. y la ausencia de alteración en el hospedador muestra el presente caso como micoparasitismo biotrófico y, de acuerdo a Barnett *et al.*, (1973), corresponde al tipo biotrófico de contacto.

Las especies de *Cunninghamella* son principalmente hongos del suelo de zonas mediterráneas y subtropicales y menos frecuentes en regiones templadas. Solo una especie puede causar enfermedad en el hombre y en los animales: *C.bertholletiae*, que puede producir zygomicosis rinocerebral, pulmonar, cutáneoarticular y diseminada, por inhalación de sus esporas o por inoculación traumática del hongo a través de la piel. Es una enfermedad rara que tiene como principales factores de riesgo a los traumas, diabetes mellitus e inmunosupresión por enfermedades hematológicas malignas,

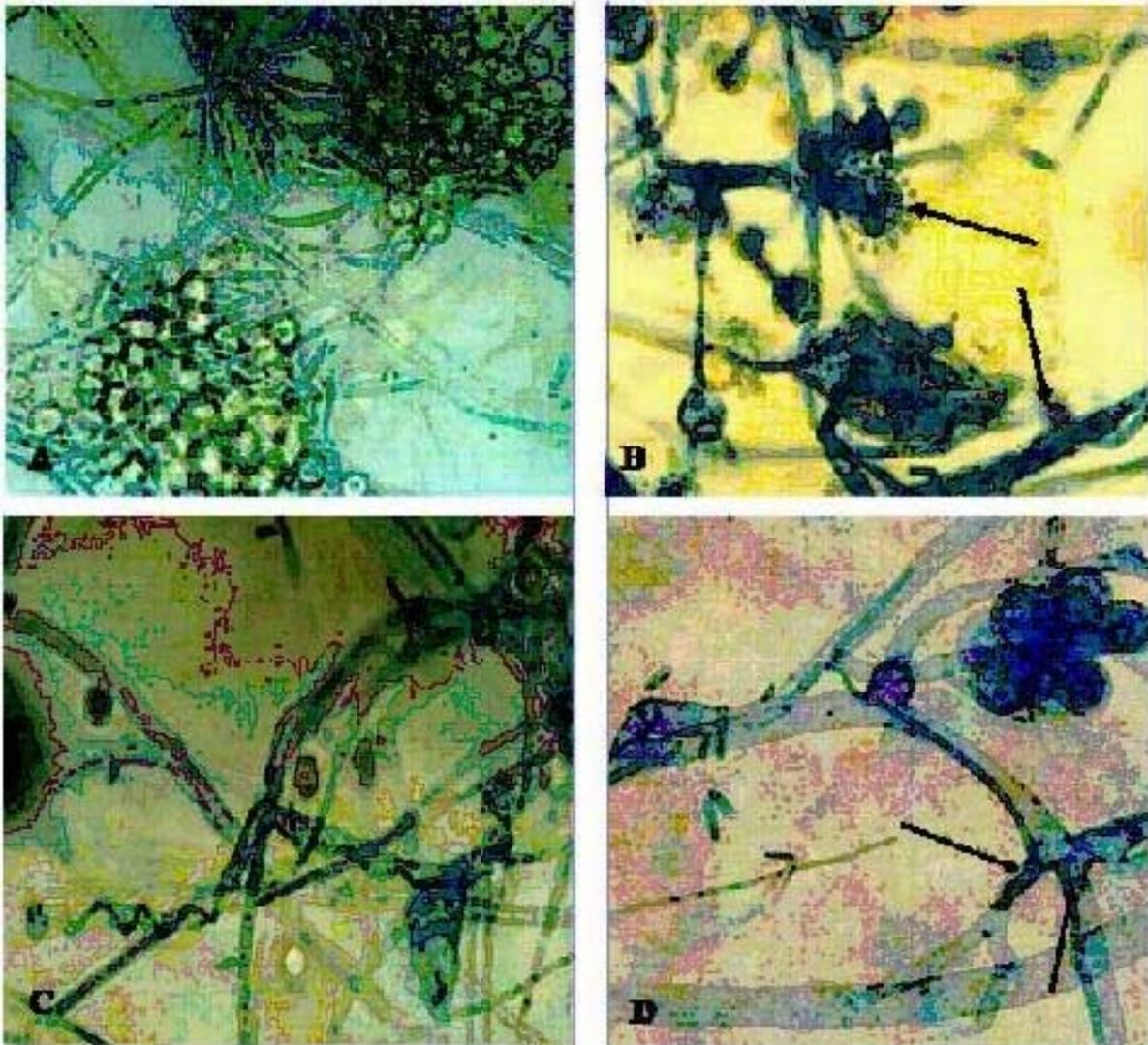


Fig. 1: A.- Hifas y macroconidios de *F. oxysporum* entre esporangios de *Cunninghamella* sp. B y C.- Efecto micoparasítico por enrollamiento de *F. oxysporum* y nuevos esporangios sincrónicos de *Cunninghamella* sp. D.- Hifas de *F. oxysporum* con ramificaciones absotivas penetrando en el hospedero.

transplantes de órganos, SIDA y terapia con desferoxamina (Rippon, 1988; Mazade *et al.*, 1998; Mostaza *et al.*, 1989; Ribes *et al.*, 2000; Rickert *et al.*, 2000; Sena Passos *et al.*, 2006).

Actualmente se reconocen 15 taxa: 12 especies y 3 variedades en el género *Cunninghamella* (Zheng *et al.*, 2001). Estos autores, señalan la ausencia de zigosporos en 8 taxones posiblemente por ausencia de ambos tipos de cruzamiento en los mismos lo cual es observado en la cepa del presente caso. Teniendo en cuenta sus caracteres morfológicos, la cepa parasitada por *F. oxysporum* podría tratarse de *C. elegans* (especie saprófita) la cual posee caracteres semejantes a *C. bertholletiae*. Ambas especies, se diferencian porque *C. bertholletiae* crece a 45°C

mientras que *C. elegans* no lo hace (Rippon, 1988; de Hoog *et al.*, 2000; Zheng & . Chen, 2001; Shipper & Stalpers, 2002). Como sólo poseíamos la cepa de *Cunninghamella* micoparasitada, el resultado del estudio fisiológico podría resultar dudoso en su interpretación: sin embargo, basándonos en las características de las colonias, su micromorfología y la falta de crecimiento a 40°C, típica de las especies saprofitas, el color de las colonias (que no adquirieron colores amarillentos) y considerando que es una de las especies frecuentes del suelo, podemos pensar que estamos frente a *C. elegans*, (Zheng & . Chen, 2001; Shipper & Stalpers, 2002). La imposibilidad de aplicación de otras técnicas de identificación no permitieron esclarecer definitivamente este punto.

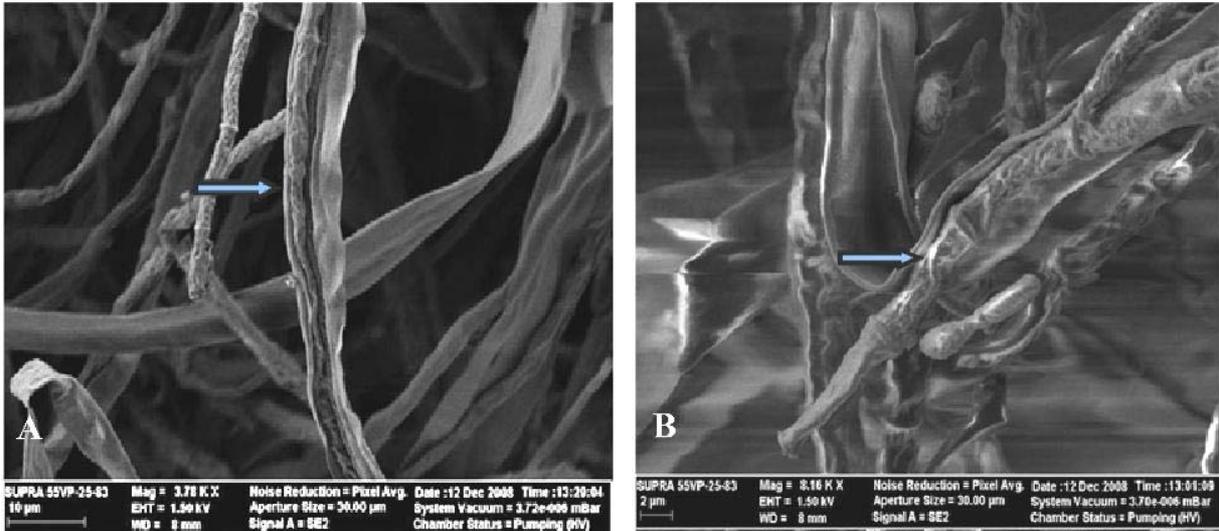


Fig. 2: Efecto micoparasítico de contacto por microscopía electrónica de barrido de *F. oxysporum* sobre hifas de *Cunninghamella*

En el presente caso *F. oxysporum* no fue capaz de matar a *Cunninghamella* sp. a pesar de que, por sus características de micoparásito necrotrófico es agente de biocontrol de muchos fitopatógenos y aún de cepas de su misma especie (Herrera Estrella *et al.*, 1998; Vajna, 2008).

Se ha señalado que los micoparásitos de contacto pertenecen generalmente a anamorfos de Ascomycetes capaces de parasitar a los integrantes de este gran grupo, así como a sus teleomorfos (Barnett *et al.*, 1973; Curtis *et al.*, 1978). Sin embargo, en el caso que se describe *F. oxysporum* complex (Ascomycota) parasita un integrante de los Zygomycota (*Cunninghamella*), situación poco común en la literatura, pero observada en *Rhizopus nigricans* (Pathak, *et al.*, 1981). Esto demuestra las capacidades adaptativas de esta especie al micoparasitismo en grupos filogenéticamente distantes. Aparentemente este es el primer caso reportado de interacción entre *F. oxysporum* complex y una especie de *Cunninghamella*.

AGRADECIMIENTO

Trabajo subsidiado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (C.I.U.N.T.) Código 26 D/454 «Impacto en salud humana y ambiental de los hongos en Tucumán. Su aplicación en biotecnología». Directora: Prof. Dra. Aida van Gelderen.

REFERENCIAS

Baker, R. (1987). Mycoparasitism: ecology and physiology. Canadian J Plant Pathol 9: 370-379

Barnett, H.L. (1963). The Nature of Mycoparasitism by Fungi. Annual Review of Microbiology, 17:1-14

Barnett, H.L. & Binder, F.L. (1973). The fungal host-parasites relationships. Annual Review of Phytopathology 1 1:273-292

Bélanger, R.R.; Dufour, N.; Caron, J.; Benhamou, N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. Biocontrol Science and Technology, 5:41-53

Benhamou, N.; Chet, I. (1993). Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology, 83:1062-1071

Bruce, A.; Srinivasan, U.; Staines, H.J. & Highley, T.L. (1995). Chitinase y laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. Int Biodeterioration & Biodegradation 23:337-353

Cook, J.R. & Baker, K.F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press.

Curtis, F.C.; Evans, G.H.; Lillis, V.; Lewis, D.H.; Cooke, R.C. (1978). Studies on Mucoralean Mycoparasites. I. Some effects of *Piptocephalis* species on host growth. New Phytol, 80: 157-165.

de Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gene, J. & Figueras, M.J. (2000). Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. Universitat Rovira i Virgili.

Elad, Y.; Chet, I.; Boyle, P.; & Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathol 73: 85-88.

- Elad Y. & Kapat A.** (1987). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur J Plant Pathol 1999, 105:177-189.
- Herrera Estr ella, A.; Chet, I.** (1998). Biocontrol of Bacteria & Phytopathogenic Fungi. Agricultural Biotechnology . Publisher Marcel Dekker , New York (USA): Marcel Dekker .
- Inbar , J. & Chet, I.** (1995). The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Mycobiology 141: 2823-2829.
- Inbar J. and Chet I.** (1997). Lectins and biocontrol. Critical Reviews in Biotechnology 17: 1-20.
- Jeffries P .** (2008). Mycoparasitism within the Zygomycetes. Botanical Journal of the Linnean Society 91: 135-150.
- Jeffries P .. & Joung T.W.K.** (1994). Interfungal Parasitic Relationships. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Manocha M.S.** (1991). Physiology and Biochemistry of Biotrophic Mycoparasitism. En: D.K, Arora, L. Ajello, K.G , Mukersi, Handbook of Applied Mycology . Ed: D.K, Arora, B, Rai, K.G, Mukery , G.R, Knudsen. Vol. 1: Soil and Plants, pp. 273-300
- Mazade M.A.; Margolin J.F .; Rossmann S.N. and Edwards M.S.** (1998). Survival from pulmonary infection with *Cunninghamella bertholletiae*: case report and review of the literature. Pediat. Inf. Dis. J. 17:835-839
- Mostaza, J.M.; Barbado F .J.; Fernandez-Martin J.; Pena-Yanez J.;and Vazquez-Rodriguez J.J..** (1989). Cutaneous ticular mucormycosis due to *Cunninghamella bertholletiae* in a patient with AIDS. Rev . Infect. Dis. 1 1:316-318
- Pathk, S.P. ; Kumar, V. & Dwivedi, R.S .** (1981). Defence structure development in *Rhizopus nigricans* during mycoparasitism by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant and Soil 62:135-139
- Ribes, J.A.; Vanover-Sams C.L; and Baker D.J.** (2000). Zygomycetes in human disease. Clin. Microbiol. Rev . 13:236-301
- Ricker ts, V. ; Bohme A.; V iertel A.; Behrendt G.; Jacobi V .; Tintelnot K. and Just-Nubling G ..** (2000). Cluster of pulmonary infections caused by *Cunninghamella bertholletiae* in immunocompromised patients. Clin. Infect. Dis. 31:910-913
- Rippon, J.W .** (1988). Medical Mycology . 3rd Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA.
- Schipper , M.A.A. & S talpers, J.A.** (2002). Zygomycetes. The Order Mucorales: In Pathogenic fungi in humans and animals,ed. Dexter, H. Howard, Second Edition.Mycology vol. 16. Marcel Dekker . Inc, NY , Basel pp.67-125
- Sena Passos X.; Souza Sales W.; Maciel P.J.; Rodrigues Costa C.; Milioli Ferreira D. ; Rodrigues do Silva M. R.** (2006). Nosocomial Invasive Infection Caused by *Cunninghamella bertholletiae* : Case Report Mycopathologia , 161:33-35
- Vajn, L.** (2008). Phytopathogenic *Fusarium oxysporum* Schlecht, as a Necrotrophic Mycoparasite. J. of Phytopath. 114: 338-347
- Zheng R.L. & Chen, G .Q.** (2001). A monograph of *Cunninghamella* . Mycotaxon 80: 1-75