

Los líquenes, una alternativa para el control de fitopatógenos

Daymara I. Vaillant Flores

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

RESUMEN

Los líquenes son los hongos que establecen una relación de simbiosis con uno o varios organismos fotosintéticos (algas o cianobacterias), y de cuya interacción se origina un talo estable con estructura, ecología y fisiología específicas y diferentes a las que tienen los hongos o algas por separados. En esta interacción se produce por parte del hongo un número considerable de metabolitos secundarios, los cuales presentan, entre otras propiedades, una notable actividad antibiótica. Muchos investigadores han probado estas sustancias contra hongos fitopatógenos y hongos de importancia clínica con resultados relevantes. Estos estudios permiten considerar a los metabolitos liquénicos como candidatos para la obtención de nuevos biopesticidas.

Palabras claves: líquenes, metabolitos liquénicos, actividad fungicida

ABSTRACT

Lichens are the fungi that establish a symbiotic relation with one or various photosynthetic organisms (algae or cyanobacteria) and a stable thallus is originated in this interaction with structure, ecologist and specific physiology and different to the characteristics that fungi and algae have separately. In this interaction the fungus produces a considerable number of secondary metabolites which present, among other proprieties, an antibiotic notable activity. Many investigators have tested these substances against phytopathogenic fungi and fungi with clinical importance, with relevant results. This study permit considers lichens metabolites as candidates to obtain new biopesticides.

Key words: lichens, lichens metabolites, fungicide activity

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos formados por la simbiosis de un hongo filamentoso y un alga microscópica (clorofita o cianobacteria). En esta asociación el hongo recibe el nombre de *micobionte*, y el componente fotosintético de *fotobionte*. El hongo se encarga de proteger al alga de las radiaciones directas del sol, le proporciona agua y sales minerales. El alga a su vez realiza fotosíntesis y suministra al micobionte alimento y vitaminas. Los hongos carecen de pigmentos fotosintéticos, por lo que son incapaces de sintetizar hidratos de carbono a partir del CO₂ atmosférico; sin embargo, los líquenes aprovechan la capacidad del fotobionte de sintetizar hidratos de carbono para su desarrollo y la producción de metabolitos secundarios conocidos como *sustancias liquénicas* o *metabolitos liquénicos* [Coutiño y Montañez, 2000]. Estas sustancias son de gran importancia e interés para muchos científicos debido fundamentalmente a las propiedades antibióticas que presentan.

Características generales de los líquenes

A principios del siglo XIX los líquenes no se consideraban organismos distintos de los ya conocidos, y eran clasificados como algas o musgos. Fue a principios de 1870 que se determinó que los líquenes estaban constituidos por un alga y un hongo [Illana, 2012]. Las definiciones modernas consideran a estos organismos como hongos liquenizados, y para todos los efectos de nomenclatura se utilizan las normas para hongos, establecidas en el Código Internacional de Plantas y Algas. Se cree que más del 27 % de los hongos conocidos pueden formar asociaciones liquénicas [Moreno *et al.*, 2007].

Existen aproximadamente veinte mil especies de líquenes en cuya formación intervienen solo 100 especies distintas de fotobiontes, mientras que más del 99 % de los micobiontes son Ascomycota, en menos medida Basidiomycota y anamorfo [Riquelme, 2008; Barreno, 2003].

En los ascolíquenes la reproducción corresponde a fructificaciones denominadas *ascocarpos*, que a diferencia de los hongos no liquenizados son estructuras perennes. Los ascocarpos pueden ser sésiles, hundidos o estipitados. Presentan características morfológicas diferentes. Los tipos más frecuentes son peritecios, histerotecios (lirelas) y apotecios [Gómez, 1997].

Los basidiolíquenes, al igual que los ascolíquenes, se reproducen sexualmente por reproducción de basidios o basidiósporas [Wydrzycka, 2009]. Por otra parte, los líquenes anamorfos se reproducen a través de conidios. Las células que dan origen a los conidios están frecuentemente dentro de conidiomas picnidial. En esta estructura se forman los microconidios (picnósporas o piconconidios) [Chaparro y Ceballos, 2002; Gómez, 1997].

Los líquenes son organismos resistentes a las condiciones ambientales adversas y capaces, por tanto, de colonizar muy diversos ecosistemas. La protección frente a la desecación y la radiación solar que aporta el hongo y la capacidad de fotosíntesis del alga confiere al simbionte características únicas frente a otros organismos [Hauck *et al.*, 2007].

Los líquenes se pueden encontrar en una gran variedad de sustratos que les proporcionan permanencia y una superficie estable. Los sustratos más comunes incluyen rocas, árboles, madera, suelo, exoesqueleto de algunos invertebrados, caparazones de tortugas terrestres y aun materiales hechos por el hombre como vidrio, cuero, hierro, asbesto, cemento o ladrillo [Hawksworth *et al.*, 2005]. De acuerdo con esta condición, los líquenes se han clasificado en cortícolas (sobre cortezas de árboles y arbustos), muscícolas (crecen sobre musgos), terrícolas (crecen sobre el suelo), folícolas (crecen sobre hojas, típicos de ambientes tropicales), saxícolas (crecen sobre piedras y rocas) y liquenícolas (sobre otros líquenes) [Cubas *et al.*, 2010].

Características del talo

La anatomía del talo consiste en falsos tejidos llamados también *plecténquimas*. Estos están formados de cierto tipo de células, las cuales derivan de células de hifas fúngicas, mediante entrelazamiento, anastomosis, ramificación o agregación de las hifas [Gómez, 1997].

Los talos liquénicos se clasifican en base a su aspecto, estratificación y la estructura de fijación al sustrato, aunque algunos autores pueden utilizar otras carac-

terísticas para su clasificación [Coutiño y Montañez, 2000]. Según su estratificación, los talos pueden ser homómeros –donde el micobionte y el fotobionte se encuentran uniformemente distribuidos– y heterómeros, que están estratificados internamente y forman capas bien definidas, capa algal, médula y corteza [Seckbach, 2002].

La capa algal es donde se establece un contacto entre el fotobionte y el micobionte, y las relaciones entre ellos varía considerablemente, ya que puede no haber contacto directo entre ambos simbiontes o tener contacto mediante los apresorios o haustorios del hongo. Por otra parte, la médula está constituida por hifas laxantes entrelazadas de manera periclinal. Esta capa tiene la capacidad de incorporación de agua, y la mayoría de las sustancias liquénicas se depositan extracelularmente aquí. La corteza es una capa que protege a la mayoría de los líquenes; en ocasiones está pigmentada y cubre la superficie superior del talo y a veces también la inferior. En ella se desarrollan algunas estructuras vegetativas de valor taxonómico como pruinas, tomento, venas, cífelas, pseudocífelas y poros [Moreno *et al.*, 2007].

Los líquenes se agrupan en varias clasificaciones de acuerdo con su morfología y forma de crecimiento. Según Coutiño y Montañez (2000), se clasifican en cuatro grupos fundamentales: gelatinosos, crustáceos, foliáceos y fruticosos. Estos autores describen los talos gelatinosos de color negruzco, coriáceo y friable cuando secos, pero menos pulposos; pueden ser flexibles y traslúcidos cuando húmedos, y el fotobionte es una cianobacteria. Los crustáceos son aquellos que tienen aspecto de costra firmemente adherida al sustrato o se insertan dentro de este, no poseen corteza inferior y se fijan a la base por las hifas de la médula. Los foliáceos son aplanados y postrados con una superficie superior que se diferencia de la inferior; el talo presenta una forma más o menos redondeada a modo de roseta; en este tipo de crecimiento el talo se adhiere al sustrato por las rizinas. Los líquenes fruticosos presentan una morfología de pequeño arbusto, se fijan al sustrato por discos de fijación que son lóbulos alargados y estrechos que se sujetan por la mínima superficie; sobresalen del sustrato y pueden ser erectos o colgantes [Cubas *et al.*, 2010].

Carreón *et al.* (2011) incluyen en la forma foliácea otros tipos más específicos, tales como foliáceos umbilicados (foliáceos que se adhieren al sustrato por un punto

central llamado *ombligo*) y foliáceos psudofructicosos (líquenes heterómeros suberectos típicamente foliáceos, pero con aspecto fruticoso).

Clasificación taxonómica

Los hongos liquenizados a través de la historia causaron gran controversia para ordenarlos adecuadamente. Hale (1974) menciona algunos de los intentos hechos para clasificarlos. Él refiere que Linneo los consideró dentro del grupo de las algas y, de acuerdo con su forma de crecimiento, los ordenó en nueve series. Clasificaciones posteriores se basaron en las diferencias internas, así como la forma de los ascomarpos. Fries (1831) [citado por Coutiño y Montañez, 2000] los dividió en dos grupos, a los cuales les dio un tratamiento de órdenes, ascomarpos abiertos y ascomarpos cerrados, y Vaino (1890) [citado por Coutiño y Montañez, 2000] propuso una clasificación con la premisa de que no forman un grupo biológico aparte y pueden incluirse en los hongos. Este autor separó a los ascolíquenes en Discomycetes, con las series Cyclocarpae (apotecio), Graphidae (apotecio lireliforme), Coniocarpae (mazaedio) y Pirenomyces (peritecio).

Marcano (1993) menciona que la base para la clasificación de los líquenes en el sistema de los hongos fue establecida en 1932 por Nannfeldt, cuando separó a los ascomicetes en ascoloculares y ascoliminales, ya que los nombres dados a los líquenes se refieren al componente fúngico en la simbiosis. Los caracteres del hongo son considerados los más importantes para su agrupación; de ahí que la clasificación de Ozenda y Clauzade (1970) atiende en primer lugar al tipo de hongo que forma la simbiosis. De este modo se diferencian tres clases: Ascolíquenes, Basidiolíquenes y líquenes anamorfos. Dentro del primer grupo se diferencian, a su vez, dos subclases: Pyrenolichenes y Discolichenes, según posean peritecios o apotecios [Hibbett *et al.*, 2007].

Quimiotaxonomía de líquenes y sustancias líquénicas

Una de las características que conlleva la interacción entre un hongo y un alga para constituir un talo líquénico es la aparición de una serie de productos del metabolismo secundario conocidos como *metabolitos líquénicos* o *sustancias líquénicas*, las cuales se depositan en el talo [Gulluce *et al.*, 2006]. Estos compuestos son de naturaleza química compleja y tienen disímiles propiedades [Toledo *et al.*, 2004].

Culberson *et al.* (1985) demostraron que la composición química de los líquenes está determinada por la

constitución genética del componente fúngico. Además, la composición química cualitativa no parece verse modificada ni por la composición del sustrato ni por condiciones microambientales. Todo esto permitió el uso de los metabolitos secundarios como buenos caracteres taxonómicos en muchos grupos de líquenes. William Nylander descubrió en 1866 que la aplicación de pequeñas cantidades de reactivos químicos, tales como una solución acuosa de hidróxido de potasio al 30-40 % (denominado K) o de hipoclorito de calcio o sodio (denominado C), sobre el cortex o la médula del talo líquénico, producían en muchos de los casos un cambio de color en la zona de aplicación, y que estas reacciones coloreadas permitían diferenciar dos especies próximas entre sí [Marcano, 1993, citado por Gómez, 1996].

A partir de estos estudios, los liquenólogos no dudan en aplicar las técnicas disponibles a su alcance, ni en usar aquellos productos químicos capaces de reaccionar de manera específica con las sustancias líquénicas, con el fin de estudiar y comprender mejor el papel que estos metabolitos tienen en la biología de los líquenes. Yasuhiko Asahina (1954) [citado por González, 2007] introdujo un nuevo reactivo, una solución alcohólica o acuosa de parafenilendiamina (PD o P) capaz de producir reacciones coloreadas con aquellas sustancias que poseen un grupo aldehído en su molécula. Asahina y Shibata (1954) publicaron una extensa monografía en la que quedaron recogidas todas sus investigaciones en este campo. La monografía de Asahina representó un gran paso adelante en la quimiotaxonomía de los líquenes, y dio a conocer técnicas rutinarias, fáciles de usar por otros liquenólogos [González, 2007].

Los compuestos líquénicos son tan estables que los líquenes secos de antiguos especímenes de herbarios pueden utilizarse en análisis químicos con resultados similares o iguales a especies recién colectadas. Estos organismos son excepcionales por la alta concentración de metabolitos que pueden almacenar en el talo, se conservan por largos períodos sin sufrir invasiones de bacterias y hongos, lo que demuestra la marcada actividad antimicrobiana de las sustancias líquénicas [Toledo *et al.*, 2004].

Muchos de estos metabolitos se producen en menor cantidad por otros organismos. Los aceptados como típicos de líquenes son dépsidos, dépsidonas, depsonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos [Piovano *et al.*, 2002].

Asahina y Shibata en los años treinta [citado por González, 2007] agruparon las sustancias líquénicas

en alifáticas y aromáticas. Dentro de los alifáticos se incluían los ácidos grasos polioles y triterpenos, y en la serie aromática los derivados del ácido tetrónico (ácido pulvínico), dépsidos, depsidonas, quinonas, dibenzofuranos y derivados de la dicetopiperazina.

Empleo de los metabolitos líquénicos por el hombre

En la medicina tradicional los líquenes tienen múltiples usos; en muchos países de Europa numerosas especies se emplean en el tratamiento de enfermedades estomacales, diabetes, tuberculosis pulmonaria, tratamiento de cáncer, entre otras [Ranković *et al.*, 2008]. Textos de medicina verde incluyen géneros de líquenes con propiedades medicinales. Tal es el caso de *Cladonia*, *Evernia*, *Lobaria*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Pertusaria*, *Physia*, *Rocella*, *Usnea* y *Xanthoria*. Durante la Edad Media los líquenes fueron priorizados en muchos herbarios para tratamiento de enfermedades [Purvis, 2002].

En los años cuarenta del pasado siglo aparecieron diversos trabajos de Paul Rufus Burkholder, notable microbiólogo que demostró la actividad antibacteriana de líquenes del género *Usnea* frente a *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*. Las investigaciones dieron como resultado que la sustancia que inhibía el crecimiento de estas bacterias era el ácido úsnico; lo mismo sucedió cuando se probaron las producidas por la especie *Ramalina reticulada* [Bustinza y Caballero, 1948]. A partir de los años cincuenta fue el ácido úsnico la sustancia líquénica que ocupó la mayor parte de los trabajos de investigación por su marcada acción antitumoral. Estos estudios mostraron extensos resultados *in vitro*; otros metabolitos con esta propiedad se identificaron en las especie *Peltigera leucophlebia* y *Collema flaccidum*, dos líquenes muy comunes [Malhotra, 2008, citado por Illana, 2012]. Asimismo el ácido úsnico se utilizó como ungüento para heridas y quemaduras, con mayor efectividad que la penicilina. Otras sustancias líquénicas han sido estudiadas como antibióticos en patologías vegetales [Hur *et al.*, 2004].

Los últimos trabajos realizados en el campo de la bioquímica aplicada a las sustancias líquénicas han puesto de manifiesto una posible acción antiviral de estos compuestos. En 1989 Hirabayashi presentó sus investigaciones sobre la acción inhibitoria del polisacárido GE-3-S sobre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en cultivos *in vitro* [Toledo *et al.*, 2004]. Experimentos clínicos demostraron que el tratamiento como adyuvante con ácido úsnico a pacientes con

el virus del papiloma humano reduce la aparición del cáncer cérvico uterino [Scirpa *et al.*, 1999].

Identificación de los metabolitos líquénicos

Para el estudio de las sustancias líquénicas se aplican muchas técnicas químicas. El primer método que se empleó para su identificación fue la cromatografía en papel, que permitía la separación y detección de estos compuestos y las técnicas de microcristalización que identificaban los metabolitos líquénicos, según la morfología de los cristales [Asahina y Shibata, 1954]; sin embargo, la microcristalización presentaba numerosos problemas debido a la presencia de sustancias en muy bajas concentraciones que interfieren en la formación de los cristales de mayor concentración [Manrique, 1989].

Las técnicas empleadas en la actualidad para la identificación y cuantificación de los metabolitos líquénicos son la cromatografía en capa fina (TLC), que es el método microquímico más accesible, seguro y usado de manera general para la identificación rutinaria de los metabolitos líquénicos; la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), que permite cuantificar los compuestos líquénicos; la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), efectiva para el análisis y separación de los compuestos líquénicos; la cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía gaseosa de espectrometría de masa (GC-MS). Estas últimas permiten identificar ácidos grasos [Barbero, 1998].

Estudios de actividad antibiótica de los metabolitos líquénicos

Con el descubrimiento de las propiedades antibióticas de los metabolitos producidos por líquenes, los investigadores comprobaron su efecto sobre un número considerable de organismos patógenos, tanto para el hombre como para las plantas y animales. Desde los años cuarenta diversos investigadores realizaron pruebas de actividad antibacteriana del ácido úsnico, sustancia producida fundamentalmente por especies del género *Usnea*. Bustinza y Caballero (1948) efectuó ensayos con las especies productoras de ácido úsnico *Evernia furfuracea*, *E. prunastri* y *Usnea barbata* frente a bacterias de interés clínico como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium tuberculosis*. Estudios recientes realizados con especies del género *Usnea* mostraron actividad bactericida del ácido úsnico en *S. aureus* con concentraciones mínimas inhibitorias en un rango de 22 a 34 µg/mL [Ortega, 2004, citado por Rosales *et al.*, 2008].

Resultados similares obtuvieron Ofokansi y Esimone (2005) al utilizar el extracto metanólico del líquen *Ramalina farinacea*.

Otras especies con una marcada actividad antibiótica son las pertenecientes al género *Parmotrema*. Esto se debe en gran medida a la presencia de metabolitos secundarios del tipo de dépsidos y depsidonas. Estas sustancias revelaron un efecto inhibitorio del desarrollo de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* cuando se extrajeron de la especie de *P. tinctorum* con una dosis inhibitoria media de 57,016 µg/mL [Kusumaningrum *et al.*, 2011]. Esta misma especie mostró actividad fungicida frente a *Cladosporium sphaerospermum* [Teixeira *et al.*, 2002]. También *P. praesorediosum* inhibió el crecimiento de bacterias y levaduras patógenas en humanos, con resultados significativos frente a *Candida albicans* [Balaji y Upreti, 2011].

Por otra parte, Ramamoorthy *et al.* (2012) notificaron la actividad fungicida del extracto líquénico obtenido de *Everniastrum cirrbatum*. Esta especie se probó a concentraciones de 10-100 µg/mL frente a los hongos de importancia clínica *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* con resultados relevantes a la mayor concentración. Los extractos líquénicos de *Hypogymnia physodes* y *Ramalina farinacea* lograron inhibir del 70 al 80 % el crecimiento micelial, y la esporulación de *Aspergillus flavus* en el 75 %, a un rango de concentración de 0,1 a 5 mg/mL [Suberu, 2004]. También Hur *et al.* (2003) [citado por Toledo *et al.*, 2004] realizaron ensayos con los metabolitos producidos por *Heterodermia* sp. en un número determinado de hongos fitopatógenos, entre los que se destacan *Bipolaris coicis*, *Collectotricum orbiculare* y *Fusarium graminearum*. Shahi *et al.* (2001) utilizaron el extracto acuoso de *Heterodermia leucomela* sobre los hongos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum*, y sobre especies del género *Trichophyton* con resultados del 100 % de inhibición a dosis de 60 y 80 µg/mL. Por otra parte, *Lecanora argentana* logró el 68 % de inhibición del crecimiento de *Collectotricum accutatum*, agente causal de la antracnosis del pepino; resultados similares fueron obtenidos con los líquenes *Cetrelia japonica* (61,4 %), *Ramalina conduplicans* (59,5 %) y *Umbilicaria esculenta* (59,5 %) [Wei *et al.*, 2008].

Oh *et al.* (2006) lograron inhibir por completo el crecimiento micelial de los hongos *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. y *Sclerotium cepivorum*

con extractos líquénicos de especies pertenecientes a los géneros *Ramalina* y *Parmelia*. Resultados similares alcanzaron Rankovic y Kosanic (2012) cuando probaron los extractos de las especies *P. saxatilis* y *P. surcata*, frente a hongos fitopatógenos, con resultados significativos en *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Otras especies cuyas sustancias líquénicas han tenido efecto antifúngico sobre hongos de importancia para la agricultura son *Bulbothrix setschwanensis*, *Everniastrum nepalense*, *Heterodermia diademata* y *Parmelia thomsonii*, quienes mostraron actividad fungicida frente a *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. roseu* [Tiwari *et al.*, 2011].

A partir del conocimiento de la relevante actividad antimicrobiana que presentan las sustancias líquénicas, las industrias farmacéutica y agroquímica mostraron gran interés por los líquenes; sin embargo, por características propias de estos organismos de presentar un lento crecimiento en medio natural no se pueden producir a escala industrial un gran número de estos metabolitos. Por esta razón, en la actualidad se desarrollan diferentes metodologías para el cultivo de líquenes o del micobionte para lograr la producción controlada de estas sustancias sin afectar la prevalencia de la especie en la naturaleza.

El método más popular es el establecido por Yamamoto *et al.* (1987), que consiste de forma general en sembrar en medio de cultivo enriquecido una porción microscópica de tejido del talo líquénico. Esta técnica fue utilizada por Hur *et al.* (2003) cuando cultivaron el micobionte de *Heterodermia* sp. en diferentes medios de cultivos y extrajeron los metabolitos producidos por esta especie con hidróxido de metilo. El extracto se probó frente a 18 hongos fitopatógenos y se obtuvo el 100 % de inhibición de cinco especies del género *Pythium*. En un estudio similar Hae *et al.* (2009) cultivaron 14 especies de líquenes, y los extractos producidos por las especies *Evernia prunastri*, *Lecania hyalina* y *Lecanora argentata* fueron ensayados contra *Colletotrichum acutatum*, *C. cocodes* y *C. gloesporioides*, con los que obtuvieron porcentajes de más del 50 % de inhibición del crecimiento micelial.

Trabajos con metabolitos líquénicos en Cuba

Cuba presenta una gran diversidad de especies de líquenes. Minter *et al.* (2001) informan un estimado de 800 especies de líquenes, y se teoriza que existan más; sin embargo, no se tienen reportes de estudios sobre la actividad antibiótica de sustancias líquénicas,

ni de identificación de sus metabolitos. Desde 2009 se comenzaron a realizar estudios preliminares con extractos liquénicos producidos por especies cubanas. En uno de estos trabajos, Vaillant *et al.* (2014) informaron la actividad fungicida del hongo liquenizado *Loxospora postulata*, especie de crecimiento crustáceo colectado en corteza de *Roystonea regia* (palma real) en áreas pertenecientes al Jardín Botánico de Cienfuegos. Este liquen produjo metabolitos en medio de cultivo y mostró una marcada actividad fungicida frente a *Rhizoctonia solani* a concentraciones de 0,1 mg/mL.

También se estudiaron las actividades antifúngicas de las especies *Parmotrema dilatatum*, *Parmotrema tinctorum*, *Parmotrema praesorediosum*, *Parmotrema cristiferum*, *Ramalina americana*, *Cladonia portentosa* y *Cladonia ceratophylla* frente a los hongos fitopatógenos *R. solani* y *Phytophthora nicotianae* con resultados relevantes [Vaillant *et al.*, 2011; datos no publicados]. Además, fueron identificados algunos de los metabolitos secundarios presentes en estas especies mediante el método de TLC. Entre las sustancias identificadas se encontraron el ácido clorovirensico, ácido ramaniolico, entre otros, algunos de los cuales se les conoce una marcada actividad antimicrobiana [Vaillant *et al.*, 2011; datos no publicados].

Todos los estudios anteriormente citados permiten visualizar a los líquenes como posible alternativa futura para la producción de bioplaguicidas. Aún quedan investigaciones por realizar relacionadas fundamentalmente con el establecimiento de una metodología de cultivo y producción, y la obtención de formulados para su uso en la práctica agrícola.

REFERENCIAS

- Asahina, Y.; S. Shibata: *Chemistry of lichen substances*, Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japón, 1954.
- Balaji, P.; D. K. Upreti: «Lichens - a Potential Organism for Sustainable Agriculture», *EnviroNews* 17 (4): 21-26, India, 2011.
- Barbero, M. M.: «Estudio florístico y quimiotaxonómico de los líquenes selicícolas del maresme», Tesis para optar por el título de Doctor en Biología, Facultad de Biología de Universidad de Barcelona, España, 1998.
- Barreno, E.; S. Pérez: «*Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias*». Serie naturaleza, Cuadernos de medio ambiente, Ed. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias y KRK Ediciones, Oviedo, España, 2003.
- Bustanza, F.; A. Caballero: Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes», *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 7 (1): 511-548, España, 1948.
- Carreón, Y.; M. Gómez; S. Fernández; V. M. Gómez; E. Garay: «Manual de prácticas de laboratorio de micología. México», <http://es.scribd.com/doc/140888134/Manual-de-Practicas-de-Laboratorio-de-Micologia-pdf> (Consultado en enero de 2013).
- Chaparro, M.; J. Aguirre: *Hongos liquenizados*, vol. 1, Ed. El Malpensante, Universidad. Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 2002.
- Coutiño, B.; A. L. Montañez: «Los líquenes», *Ciencias* 59: 64-65, México, 2000.
- Cubas, P.; J. Núñez; A. Crespo; P. K. Divagar: Líquenes: qué son y su uso como bioindicadores. Documento GEMM / Proyecto de Innovación 123 - UCM. 2010. http://www.aulados.net/GEMM/Documentos/San_Quintin_Innova/Liquenes_que_son_uso.pdf (consultado: enero de 2013).
- Culberson, C. F.; W. L. Culberson; A. Johnson: «Does the Symbiont Alga Determine Chemotype in Lichens?», *Mycology* 77 (4): 657-660, Inglaterra, 1985.
- Gómez, M.: *Morfología e identificación de líquenes*, Universidad de Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México, 1997.
- González, S.: «Las sustancias liquénicas. Curso avanzado de bioquímica del suelo. La naturaleza de los aportes naturales. 2007, España», <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/03/21/61847> (consultado: marzo de 2013).
- Gulluce, M.; A. Aslan; M. Sokmen; A. Adiguzel; G. Agar; A. Sokmen: «Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*», *Phytomedicine* 13 (7): 515-521, EE. UU., 2006.
- Hae, J.; L. Lököš; H. Keon; R. Jung; K. Jung; K. Young; J. S. Hur: «Isolation of Lichen-Forming Fungi from Hungarian Lichens and Their Antifungal Activity Against Fungal Pathogens of Hot Pepper Anthracnose», *The Plant Pathology Journal* 25 (1): 38-46, Corea, 2009.
- Hale, M. E.: *The Biology of Lichens*, Edward Arnold Publishers, Inglaterra, 1974.
- Hauck, M. C. Dulamsuren; M. Mühlenberg: «Lichen Diversity on Steppe Slopes in the Northern Mongolian Mountain Taiga and its Dependence on Microclimate», *Rev. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 202 (7): 530-546, Holanda, 2007.
- Hawksworth, D. L.; T. Iturriaga; A. Crespo: «Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos», *Rev. Iberoam. Micol.* 22 (2): 71-82, España, 2005.
- Hibbet, D.; M. Binder; F. Bischoff; M. Blackwell; F. Cannon; O. E. Eriksson; F. Huhndorf; J. Timothy; P. M. Kirk; R. Ckingf: «A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi», *Mycological Research* 111 (5): 509-547, EE. UU., 2007.
- Hur, J. S.; H. Harada; S. O. Oh; K. M. Lim; E. S. Kang; S. M. Lee; H. Y. Kahng; H. W. Kim; J. S. Jung; Y. J. Koh: «Distribution of Lichen Flora on South Korea», *J. Microbiol.* 42 (2): 163-167, EE. UU., 2004.
- Hur, J. S.; J. K. Hye; M. L. Kwang; J. K. Young: «Isolation, Cultivation and Antifungal Activity of Lichen-Forming Fungus *Heterodermia* sp.», *The Plant Pathology Journal* 19 (2): 75-78, Corea, 2003.
- Illana, C.: «Lichens Used in Traditional Medicine», *Bol. Soc. Micol.* 36: 163-174, España, 2012.
- Kusumaningrum, I. K.; W. P. Suwarso; A. H. Cahyana: «Screening for Bioactive Compound Group in *Parmotrema tinctorum* Extract and Bioactivity Test of Dichloromethane Extract as Anti-tuberculosis Against *Mycobacterium tuberculosis* H37RV and Toxicity Against *Artemia salina*», *Sci. J. UBU.* 2 (1): 53-59, Tailandia, 2011.
- Mancuso: «A Zinc Sulphate and Usnic Acid Preparation Used Aspost-Surgical Adjuvant Therapy in Genital Lesion Byhuman Papillomavirus», *Minerva Ginecologica* 51 (6): 255-260, Italia, 1999.
- Manrique, E.: «Aplicación de técnicas analíticas e interpretación de las variaciones químicas en líquenes» *Anales Jard. Bot. Madrid* 46 (1): 249-257. España.1989.

- Minter, D. W.; M. Rodriguez; J. Mena: *Fungi of the Caribbean: An Annotated Checklist*, PDMS Publishing, Inglaterra, 2001.
- Moreno, E.; A. Sánchez; J. Hernández: *Guía ilustrada de hongos liquenizados de Venezuela*, Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas, 2007.
- Ofokansi, K. C.; C. O. Esimone: «Evaluation of *in vitro* Antimicrobial Activity and Release Behavior of Ointments and Application Containing Extract of Lichen *Ramalina farianaceae* (L.) Ach», *Plant Product Research Journal*. 9: 6-10, Suráfrica, 2005.
- Oh, S. O.; H. S. Jeon; K. M. Lim; Y. J. Koh; J. S. Hur: «Antifungal Activity of Lichen-Forming Fungi Isolated from Korean and Chinese Lichen Species Against Plant Pathogenic Fungi», *Plant Pathol. J.* 22 (4): 381-385, Corea, 2006.
- Ozenda, P.; G. Clauzade: *Les Lichens. Étude biologique et flore illustrée*, Ed. Masson et Cie., París, Francia, 1970.
- Piovano, M.; J. A. Garbarino; F. A. Giannini; E. R. Correche; G. Feresin; A. Tapia; S. Zacchino; R. D. Enriz: «Evaluation of Antifungal and Antibacterial Activities of Aromatic Metabolites from Lichens», *Boletín Sociedad Chilena de Química* 47 (3): 235-240, Chile, 2002, http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-16442002000300006&lng=es&nrm=iso (consultado: marzo de 2013).
- Purvis, W.: *Lichens*, The Natural History Museum, Smithsonian's Natural World Series, Londres, Inglaterra, 2000.
- Ramamoorthy, P. K. T.; R. H. LakshmanaShetty; S. Devidas; V. T. Muduraj; K. S. Vinakaya: «Antifungal and Cytotoxic Activity of *Evernia trumcirrhata* (Fr.) Hale», *Chiang Mai. J. Sci.* 39 (1): 76-83, India, 2012.
- Rankovic, B.; M. Kosanic: «Antimicrobial Activities of Different Extracts of *Lecanora atra*, *Lecanora muralis*, *Parmelia saxatilis*, *Parmelia sulcata* and *Parmeliopsis ambigua*», *Park. J. Bot.* 44 (1): 429-433, Pakistán, 2012.
- Ranković, B.; M. Misić; S. Sukdolak: «The Antimicrobial Activity of Substances Derived from the Lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata*», *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1239-1242, Inglaterra, 2008, <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-007-9580-7#page-1> (consultado: marzo de 2013).
- Riquelme, F. S: «Evaluación del uso de líquenes como indicadores biológicos de contaminación atmosférica en la Quebrada de la Plata región metropolitana», tesis en opción al título de Ingeniero Forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile, Chile, 2008.
- Rosales, L. A.; N. Naranjo; N. Almaraz; M. Ortega: «Los líquenes como fuente de sustancias bactericidas», 2008, http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/Ciudad%20Obregon/RECURSOS_NATURALES/RN045.doc. (consultado: junio de 2014).
- Scirpa, P.; G. Scambia; V. Masciullo; F. Battaglia; E. Foti; R. Lopez; P. Villa; M. Malecore; S. Seckbach, J.: *Simbiosis: Mechanisms and Model Systems*, Joseph Seckbach Ed. J Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, Inglaterra, 2002.
- Shahi, S.K.; A. C. Shukla; A. Dikshit; D. K. Upterti: «Broad Spectrum Antifungal Properties of the Lichen *Heterodermia leucomela*», *The Lichenologist* 33: 177-179, Inglaterra, 2001.
- Suberu, H.: «Preliminary Studies of Inhibitions in *Aspergillus flavus* with Extracts of Two Lichens and Bentex-T fungicide», *African Journal of Biotechnology* 3 (9): 468-472, Nigeria, 2004.
- Teixeira, A.; N. K. Honda; F. Mesquita; R. M. Muzzi; M. R. Marques: «Bioactive Derivatives Obtained from Lecanoric Acid, a Constituent of the Lichen *Parmotrema tinctorum* (Nyl) Hale (Parmeliaceae)», *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12: 74-75, Supl. Brasil, 2002, <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v12s1/a36v12s1.pdf> (consultado: marzo de 2013).
- Tiwari, P.; H. Rai; D. K. Upreti; S. Trivedi; P. Shukla: «Assessment of Antifungal Activity of Some Himalayan Foliose Lichens Against Plant Pathogenic Fungi», *American Journal of Plant Sciences* 2 (6): 841-846, EE. UU., 2011.
- Toledo, F. J.; A. García; F. León; J. Bermejo: «Ecología química en hongos y líquenes», *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 28 (109): 509-528, Colombia, 2004.
- Vaillant, D.; C. Romeu; M. Gómez; R. Ramírez: «Actividad fungicida del hongo liquenizado *Loxospora pustulata* sobre *Rhizoctonia solana*», *Revista Ciencia y Tecnología de Argentina* 16 (21): 12-14, 2014.
- Wei, X.; J. Hae-Sook; H. Keon-Seon; K. Young-Jin; H. Jae-Seoun: «Antifungal Activity of Lichen-Forming Fungi Against *Colletotrichum acutatum* on Hot Pepper», *Plant Pathol. J.* 24 (2): 202-206, Corea, 2008.
- Wydrzycka, U.: *Botánica general*, EUNA, Heredia, Costa Rica, 2009.
- Yamamoto, Y.; R. Mizuguchi; S. Takayama; Y. Yamada: «Effects of Culture Conditions on the Growth of Usneaceae Lichen Tissue Cultures», *Plant Cell Physiol* 28 (8): 1421-1426, Japón, 1987.