

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE DIVERSAS ESPECIES FÚNGICAS FRENTE A METABOLITOS NATURALES

Armiñana, E., Sánchez, T., Reig, J. y Vicente, E. (*)

RESUMEN

Se ha corroborado la existencia de marcadas diferencias de sensibilidad de varios hongos filamentosos frente a ciertos metabolitos naturales de origen vegetal. Estas distintas sensibilidades constituyen marcadores que permiten el diseño de métodos de selección y análisis de híbridos obtenidos en experiencias de fusión celular somática, evitándose así la manipulación del genoma de la cepa original para la obtención de marcadores genéticos (auxotrofías, resistencias...) imprescindibles en todos los métodos de selección utilizados hasta el momento.

Dada la escasez cuantitativa y cualitativa de fungicidas de síntesis resulta interesante el alto poder inhibitor del crecimiento de bacterias y hongos presentado por el extracto hidro-alcohólico de **Clematis vitalba**, que además de ser comparable en eficacia a los productos comerciales, presenta la ventaja de ser termoestable en las condiciones de esterilización por autoclave y actuar en fase acuosa, lo que facilita su manejo en el laboratorio, no debiendo descartarse la posibilidad de su posible uso como fungicida comercial.

SUMMARY

Essay about the sensitivity of different fungoid species as opposed to natural metabolites

The existence in several filamentous fungi of remarkable differences in sensitivity to certain natural metabolites with a vegetable origin has been corroborated. These differences in sensitivity can be used as markers which make possible the experimental design for the selection and analysis of hybrids released from somatic cellular fusion, so avoiding the manipulation of the genome of the original strain.

Considering the quantitative and qualitative shortage of synthetic fungicides, the high inhibitory power on the bacterial and fungal growth of the hydro-alcoholic extract of **Clematis vitalba** is very interesting. Furthermore, this extract is so effective as the trading goods and it presents the advantages of: (1) being thermo-stable at the autoclaving conditions and (2) acting in the watery phase; this makes easy its use in the laboratory. The possibility of its feasible usage as a commercial fungicide can not be discarded.

(*) Dep. Microbiología. Fac. C. Biológicas. Universidad Literaria de Valencia.

INTRODUCCION

Los hongos inferiores son organismos sencillos y fáciles de cultivar en medios definidos simples, poseen un ciclo generacional muy corto, presentan diferenciación morfológica y fisiológica sencilla. Muchos de ellos son productores de alimentos y sustancias de interés comercial, mientras que otros son responsables de enfermedades o alteración de muy diversos productos. Por todo ello, han atraído la atención de los biólogos desde antiguo, habiendo sido objeto de intensas investigaciones tanto en el campo de la biología fundamental (Beadle y Tatum, Pontecorvo, ...) como en el de la biología aplicada (Pasteur, Fleming, ...).

En la actualidad, tras la puesta a punto de las técnicas de ingeniería genética en bacterias, se dispone de un poderoso método analítico para la realización de estudios de genética molecular, así como para la manipulación genética y diseño de cepas. Los hongos, por las características mencionadas, se constituyen en los candidatos idóneos para la extensión de estas técnicas a organismos eucariotas. (CASE, 1979; STEWART, 1981; STOHL, 1983; BALLANCE, 1983).

Son muchos los investigadores que actualmente están trabajando en este campo, hecho éste potenciado por la facilidad de obtener grandes cantidades de protoplastos (células vivas desprovistas de su pared), por métodos enzimáticos, que son capaces de fusionarse entre sí, con liposomas o de absorber el DNA libre cuando se dan las condiciones adecuadas y, posteriormente, regenerar el organismo completo con gran efectividad y rapidez en medios sencillos. (ANNE, 1976; YAMADA, 1980; COCKING, 1981; FERENCZY, 1981; MAKINS, 1981; ROLLO, 1981).

No obstante, dado el bajo porcentaje de fusionantes obtenibles en dichas experiencias, se hace imprescindible el diseño de métodos de selección de los híbridos. Estos se han basado tradicionalmente en la complementación genética de mutantes (auxótrofos, resistentes, termosensibles, ...) que

hacen posible el crecimiento de los híbridos en medios donde los parentales son incapaces de crecer. (ANNE, 1976; 1978; 1982; HARMS, 1981).

Sin embargo, no resulta conveniente en algunas ocasiones modificar el genoma de las cepas parentales como sería el caso de las cepas industriales, ya de por sí excesivamente alteradas, con lo que el uso de mutaciones como marcas genéticas queda excluido. Para estos casos sería de gran interés disponer de métodos de selección alternativos, que podrían basarse en la existencia de acusadas diferencias naturales de sensibilidad frente a inhibidores del crecimiento presentadas por los distintos organismos (COCKING, 1974; NIELSEN, 1979), principalmente en aquellos que por ocupar nichos ecológicos próximos, practican la antibiosis y disponen de un gran número de mecanismos de ataque y resistencia (ASENSIO, 1979).

Tras un primer estudio usando inhibidores comerciales (ARMIÑANA, 1982) y dado su escaso número y difícil acceso, se decidió probar la efectividad de metabolitos naturales producidos por los hongos en estudio y, además, ya que existen precedentes de sustancias antifúngicas en ciertas plantas (CHAUMONT, 1978a; 1978b; 1979), se abordó el estudio de la acción de sus extractos acuosos, alcohólicos e hidroalcohólicos frente a los hongos con la esperanza de encontrar efectos inhibitorios del crecimiento, así como diferencias en el comportamiento de los mismos que puedan ser utilizadas como marcadores complementables para la selección y análisis de los híbridos.

Este enfoque se presenta atractivo bajo distintos puntos de vista. Por una parte se enmarcan en el estudio genético de estos organismos, ya que se aplicarán los resultados en el diseño de métodos de análisis de los productos de fusión. Por otra parte pueden descubrirse relaciones ecológicas entre los organismos utilizados y, por último, pueden contribuir al descubrimiento de nuevos fungicidas de origen natural que se unan a los pocos actualmente conocidos.

MATERIAL Y METODOS

ORGANISMOS: Cepas de *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *Gliocladium virens*, suministradas por la Dra. M.^a Angeles Calvo de la Facultad de Farmacia de Barcelona, *Aspergillus niger* CECT 2090, *A. carbonarius* CECT 2086, *Trichoderma koningii* CECT 2412, *A. nidulans* (w pyro y), *A. nidulans* (pro y) y *A. rugulosus*, estos tres últimos cedidos por el Dr. J. Peberdy de la Universidad de Nottingham.

Tejidos frescos de *Hyosciamus albus*, *Digitalis purpurea*, *Solanum nigrum*, *Datura stramonium*, *Echallium elaterium*, *Hedera helix*, *Taxus baccata* y *Clematis vitalba*.

MEDIOS:

Medio líquido extracto de malta (EM). Extracto de malta 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l y glucosa 5 g/l.

Medio líquido Czapeck de Oxoid (CZ).

Medio agar extracto de malta (AEM). Medio EM con el 2% de agar.

Medio agar extracto de malta inhibidor (AEMI). Al medio AEM estéril y atemperado a 50°C se le añade el extracto inhibidor esterilizado por centrifugación excepto cuando se quiere probar la termoestabilidad, en cuyo caso se añade previamente al paso por el autoclave.

EXTRACTOS VEGETALES: Se procede al homogeneizado con una trituradora de cuchillas de 10-20 g de tejidos vegetales frescos en 100 ml de agua o alcohol, o en 200 ml de alcohol y agua en la proporción 1:1, se deja macerar durante 20-30 min. y después se filtra por una malla de nylon. Se toman 40 ml y se esterilizan por centrifugación (40.000 g, 30 min.). Los extractos alcohólicos e hidro-alcohólicos se concentran con rotavapor a 40°C y los acuosos se liofilizan.

OBTENCION DE METABOLITOS FUNGICOS: Matraces de 250 ml con 75 ml de EM o CZ se inoculan con una suspensión de esporas de cada hongo, se incuban en agitación orbital a 200 rpm durante 20 días a 28°C, tras lo cual se elimina el micelio filtrando por una malla de nylon

y se esteriliza por centrifugación tras lo cual se concentra por rotavapor al igual que los extractos vegetales. (Ver Fig. 1)

SIEMBRA E INCUBACION: Para la siembra de las series de placas se utilizó un replicador múltiple de ocho púas que se impregnaban con las suspensiones de esporas de los hongos, exceptuando el *Trichoderma koningii*, que se encontraban en pocillos excavados sobre una capa de agar en placa. Se incubaban durante 24 horas a 28°C y se procedía a sembrar en el centro de la placa el *T. koningii*. Posteriormente se mantenían en incubación durante dos días tras los cuales se calculaba la efectividad del extracto midiendo el diámetro de las colonias y comparándolos con los testigos. La demora de un día en la siembra del *Trichoderma* se debe a que éste posee un crecimiento muy expansivo e impide la formación normal de las colonias de las demás especies.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tal como se observa en la Fig. 2 existe una marcada antibiosis de la cepa de *Aspergillus rugulosus* frente al *Trichoderma koningii* cuando crecen juntos sobre una placa con medio AEM. Este hecho supone la existencia de una distinta sensibilidad natural por parte de ambas cepas frente a algún o algunos metabolitos producidos durante el crecimiento. Ya que esta es la base del sistema de selección que se pretende poner a punto, se procedió al estudio sistemático de la acción de diversos metabolitos extracelulares producidos por cada uno de los hongos empleados en este trabajo, al crecer en medio líquido (EM o CZ), frente a todas las demás cepas. Sin embargo, estas experiencias no repetían los efectos de inhibición observados en los cultivos mixtos sobre placa, lo que quizá se debiera a que en estos cultivos puros faltara la inducción para la producción de los metabolitos inhibidores por la ausencia de un competidor o que se tratase de sustancias lábiles que se inactivaran o perdieran durante la preparación de las secreciones extracelulares. No obstante, las secreciones

de *Penicillium expansum* y *Aspergillus rugulosus* presentan cierta actividad que se refleja en la reducción del tamaño de la colonia como se aprecia en la Tabla 1. Es de resaltar que las cepas de *P. expansum* y *A. rugulosus* no se ven afectadas por sus propias secreciones, y es de esperar que aumentando las concentraciones, se podrá llegar a inhibir totalmente el crecimiento del resto de las especies.

En la Fig. 3 se representa la variación de los tamaños de las colonias referidas al testigo frente a las concentraciones de los extractos extracelulares de *Penicillium expansum*. Como puede apreciarse, se observa una respuesta distinta en cada hongo.

Como ya se ha dicho anteriormente, los resultados de las experiencias de sensibilidad utilizando extractos fúngicos extracelulares no manifiestan grandes diferencias entre los distintos hongos, por lo cual se decidió continuar la búsqueda de metabolitos naturales procedentes de otras fuentes. Desde la antigüedad es conocido que algunos extractos vegetales poseen actividad antifúngica y/o antibacteriana y se de-

idió proseguir la búsqueda en esta dirección. En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos con ocho plantas distintas que poseen, en mayor o menor grado, toxicidad para el hombre. Puede apreciarse que no existe una correlación positiva entre la toxicidad para el hombre y para los hongos, pues *Hyosciamus*, *Ecballium*, *Hedera* y *Taxus* se manifiestan completamente inefectivas o solo influyen en el crecimiento de las cepas afectadas por mutaciones deletéreas, mientras que *Clematis* manifiesta un efecto fungicida muy importante. En el resto de extractos se aprecia la existencia de sensibilidades diferenciales más o menos acusadas entre los distintos hongos. Así, en los extractos de *Digitalis* destaca la sensibilidad de *Aspergillus nidulans* (pro y), en el extracto alcohólico de *Datura* estas diferencias afectan a más especies, destacando también la presentada por el *A. nidulans* (pro y) que se destaca incluso en el extracto acuoso, y, por último, es en los extractos de *Clematis* donde estas diferencias se acentúan más.

	P.c.	P.e.	G.v.	A.n.	A.c.	Anid. 1	Anid. 2	A.r.	T.k.
Hyosciamus albus	>10.00	>10.00	10.00	>10.00	10.00	>10.00	>10.00	10.00	10.00
EtOH	5.00	5.00		5.00		1.15	<0.63		
Hyosciamus albus	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	20.00
Liof.	5.00	1.25	5.00	2.50	5.00	1.25	1.25	10.00	
Digitalis purpurea	10.00	>10.00	>10.00	>10.00	>10.00	>10.00	10.00	10.00	10.00
EtOH		2.50	2.50	0.32	5.00	0.32	<<0.32		
Digitalis purpurea	20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	10.00	>20.00	20.00
Liof.		5.00	10.00	<5.00	5.00	<5.00	<<5.00	<5.00	
Solanum nigrum	>10.00	10.00	>10.00	>10.00	>10.00	>10.00	>10.00	10.00	10.00
EtOH	2.50		0.63	2.50	2.50	2.50	<0.63		
Solanum nigrum	>20.00	>20.00	>20.00	20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	20.00
Liof.	2.50	10.00	5.00		2.50	<2.50	<2.50	5.00	
Datura stramonium	10.00	>10.00	10.00	>10.00	10.00	>10.00	5.00	10.00	10.00
EtOH	1.25	0.63	2.50	1.25	1.25	<0.63	<<0.63	0.63	
Datura stramonium	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	20.00	>20.00	20.00
Liof.	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<5.00	<<5.00	<5.00	
Ecballium elaterium	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
EtOH									
Ecballium elaterium	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Liof.									
Hedera helix	10.00	10.00	10.00	>10.00	>10.00	>10.00	>10.00	10.00	10.00
EtOH				5.00	2.50	0.63	<0.63		
Hedera helix	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	20.00	20.00
Liof.	10.00	2.50	10.00	5.00	2.50	1.25	<1.25		
Taxus baccata	10.00	10.00	10.00	>10.00	>10.00	>10.00	>10.00	10.00	10.00
EtOH				5.00	5.00	1.25	<0.63		
Taxus baccata	20.00	20.00	20.00	>20.00	>20.00	>20.00	>20.00	20.00	20.00
Liof.				10.00	5.00	2.50	<2.50		

	P.c.	P.e.	G.v.	A.n.	A.c.	Anid. 1	Anid. 2	A.r.	T.k.
Clematis vitalba EtOH	<0.63 <<0.63	<0.63 <<0.63	<0.63 <<0.63	1.50 <0.63	<0.63 <<0.63	<0.63 <<0.63	<0.63 <<0.63	<0.63 <<0.63	<0.63 <<0.63
Clematis vitalba Liof.	<5.00 <<5.00	<5.00 <<5.00	<5.00 <<5.00	<5.00 <<5.00	<5.00 <<5.00	<5.00 <<5.00	<5.00 <<5.00	<5.00 <<5.00	<5.00 <<5.00
Clematis vitalba EtOH/H ₂ O Hojas	0.31 <<0.04	0.63 <<0.04	0.31 <<0.04	1.25 <<0.04	0.08 <<0.04	<0.04 <<0.04	<0.04 <<0.04	<0.04 <<0.04	1.25 <<0.04
Clematis vitalba EtOH/H ₂ O Semillas	0.25 <0.01	0.25 <0.01	0.25 <0.01	0.50 <0.01	0.06 0.01	0.06 0.01	0.03 0.01	0.06 0.01	0.25 0.01
Aspergillus rugulosus Secreción	>75.00 18.75	>75.00 37.50	>75.00 18.75	>75.00 <18.75	>75.00 <18.75	>75.00 18.75	>75.00 37.50	75.00	>75.00 18.75
Penicillium expansum Secreción	>100.00 6.25	100.00	100.00	>100.00 0.20	>100.00 <0.20	>100.00 6.25	>100.00 3.13	100.00	>100.00 6.25

TABLA 1.—Valoración del efecto inhibitor de los extractos que figuran en la columna de la izquierda frente al crecimiento de los siguientes hongos: (P.c.) *Penicillium chrysogenum*. (P.e.) *P. expansum*. (G.v.) *Gliocladium virens*. (A.n.) *Aspergillus niger*. (A.c.) *A. carbonarius*. (A.nid. 1) *A. nidulans* (w pyro y). (A. nid. 2) *A. nidulans* (y pro). (A.r.) *A. rugulosus*. (T.k.) *Trichoderma koningii*.

El valor superior corresponde a la Concentración Mínima Inhibitoria y el valor inferior a la Concentración Máxima Inefectiva en % de volumen de extracto o secreción/volumen de medio, estimadas ambas por la ausencia total de crecimiento o el alcanzar un diámetro de colonia similar al que presentan las distintas especies cuando crecen sobre placas testigos de AEM. Donde solo hay un único valor se indica la máxima concentración utilizada en las experiencias donde la especie fúngica no muestra ningún tipo de inhibición del crecimiento, pues el diámetro de la colonia es similar al de los testigos desde la primera placa con máxima concentración de la serie de diluciones.

En las Fig. 4 y 5 se plasma de un modo gráfico las distintas sensibilidades frente a un extracto acuoso autoclavado de *Clematis* donde se puede apreciar las sensibilidades de cada especie al comparar la aparición de la primera colonia de cada organismo en la serie de dilución $\frac{1}{2}$ en cada placa.

Es de destacar que *Trichoderma koningii* solo es inhibido por los extractos de *Clematis* y a una concentración por lo general inferior a la requerida para la inhibición de *Aspergillus niger*, hecho éste muy importante a la hora de confeccionar un medio selectivo para los productos de fusión entre estas dos cepas, pues hasta la fecha no habíamos encontrado ninguna sustancia que seleccionase favorablemente a *A. niger* frente a *T. koningii*. También es importante resaltar que el extracto de *Clematis* actúa a concentraciones igual o menores al 1,5% de peso fresco de planta/volumen de medio que, en una primera aproximación, equivale a las dosis empleadas con los fungicidas comerciales. Además, dada su termoestabilidad, pues no se degrada durante los tratamientos de esterilización en el autoclave, y su actuación en solución acuosa, su manejo en el laboratorio se ve facilitado en gran medida.

De estos resultados podemos concluir que este tipo de ensayos presentan interés no solo desde un punto de vista de investigación fundamental y aplicada a las técnicas de fusión de protoplastos, sino también pueden descubrir nuevos fungicidas que amplíen la escasa gama existente.

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestro agradecimiento a D. Rafael M.^a García Palomo, Catedrático de Inglés del Instituto de Bachillerato Andreu Sempere de Alcoy, por su colaboración en la traducción del título y el resumen del presente artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- ANNE, J., EYSSEN, H., DE SOMER, P. (1976). Somatic hybridisation of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature* 262:719-721.
- ANNE, J., PEBERDY, J. F. (1976). Induced fusion of fungal protoplast following treatment with polyethylene glycol. *Journal of General Microbiology* 92: 413-417.
- ANNE, J., EYSSEN, H. (1978). Insolation of interspecies hybrids of *Penicillium citrinum* and *P. cyano-fulvum* following protoplast fusion. *FEMS Microbiology Letters* 4: 87-90.

- ANNE, J. (1982). Genetic evidence for selective chromosomal loss in interspecies hybrids from *Penicillium chrysogenum* + *P. stoloniferum*. *FEMS Microbiology Letters* 14: 191-196.
- ARMIÑANA, E., MENGUAL, A. M., MORENO, V., VICENTE, E. (1982). Sensibilidad diferencial de los géneros *Penicillium* y *Gliocladium* a diversos inhibidores del crecimiento. *Collectanea Botanica* 13(2): 391-401.
- ASENSIO, C., BAQUERO, F. (1979). Las microcininas. *Investigación y Ciencia* 35: 106-115.
- BALLANCE, D. J., BUXTON, F. P., TURNER, G. (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 112(1): 284-289.
- CASE, M. E., SCHWEIZER, M., KUSHNER, S. R., GILES, N. H. (1979). Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(10): 5259-5263.
- CHAUMONT, J. P., BOURGEOIS, M. (1978 a). Propriétés antagonistes de cent extraits de plantes supérieures vis à vis de sept champignons phytopathogènes. *Lloidia* 41(5): 437-441.
- CHAUMONT, J. P., JOLIVET, J., JETHRIT. (1978 b). Recherche de substances antifongiques d'origine végétale: action de 100 extraits de plantes des Alpes Françaises sur sept champignons phytopathogènes. *Phytiatrie-Phytopharmacie* 27: 275-284.
- CHAUMONT, J. P. (1979). Les propriétés fongistatiques de huit phanérogames vis à vis de champignons phytopathogènes. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 126 *Lettres Bot.* (5) 537-541.
- COCKING, E. C., POWER, J. B., EVANS, P. K., SAFWAT, F., FREARSON, E. M., HAYWARD, C., BERRY, S. F., GEORGE, D. (1974). Naturally occurring differential drug sensitivities of cultured plant protoplasts. *Plant Science Letters* 3: 341-350.
- COCKING, E. C. (1981). Opportunities from the use of protoplast. *Phil. Trans. R. Soc. London B.* 292: 557-568.
- FERENCZY, L. (1981). Microbial protoplast fusion. En *Genetics as a tool in microbiology*. (Glover, S. W. and Hopwood, D. A. Eds.): 1-34. Cambridge University Press.
- HARMS, C. T., POTRYKUS, I., WIDHOLM, J. M. (1981). Complementation and dominant expression of amino acid analogue resistance markers in somatic hybrid clones from *Daucus carota* after protoplast fusion. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 101(S): 377-390.
- MAKINS, J. F., HOLT, G. (1981). Liposome-mediated transformation of streptomycetes by chromosomal DNA. *Nature* 293: 671-673.
- NIELSEN, E., ROLLO, F., PARISI, B. (1979). Genetics markers in cultured plant cells: differential sensitivities to amethopterin, azetidine-2-carboxylic acid and hydroxyurea. *Plant Science Letters* 15: 113-125.
- ROLLO, F., GALLI, M. G., PARISI, B. (1981). Liposome-mediated transfer DNA to carrot protoplasts: a biochemical and autoradiographic analysis. *Plant Science Letters* 20: 347-354.
- STEWART, G. G. (1981). The genetic manipulation of industrial yeast strains. *Can. J. Microbiol.* 27: 973-990.
- STOHL, L. L., LAMBOWITZ, A. M. (1983). Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1058-1062.
- YAMADA, Y., HARA, Y., KATAGI, H., SENDA, M. (1980). Protoplast fusion. *Plant. Physiol.* 65: 1099-1102.

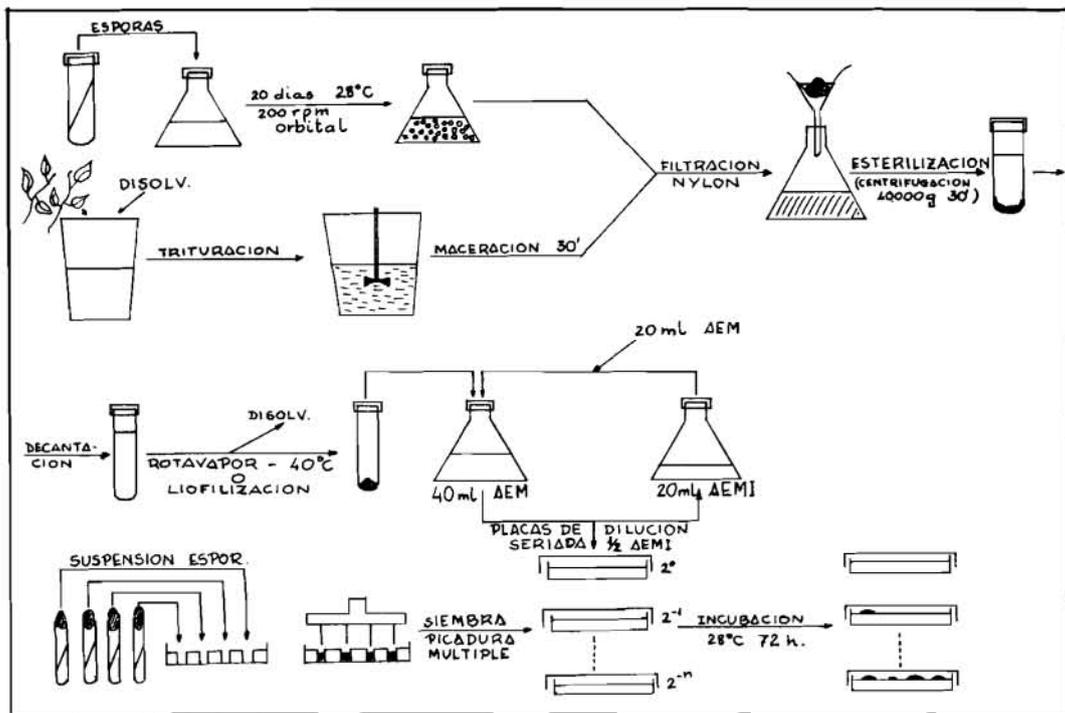


FIGURA 1.—Diagrama del proceso seguido en la elaboración de los extractos y secreciones, obtención de los distintos medios AEM y formación de la serie de diluciones 1/2 en placa y su siembra con un replicador múltiple.

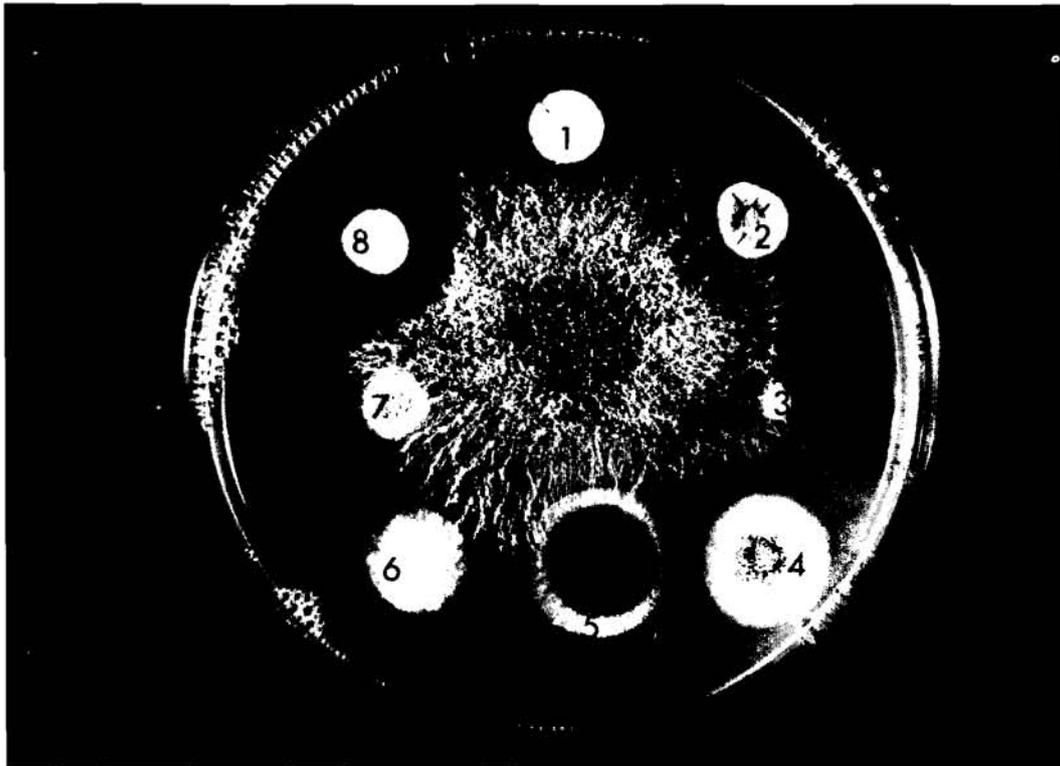


FIGURA 2.—Placa de medio AEM con los siguientes hongos: (1) *Penicillium chrysogenum*. (2) *P. expansum*. (3) *Gliocladium virens*. (4) *Aspergillus niger*. (5) *A. carbonarius*. (6) *A. nidulans* (w pyro y). (7) *A. nidulans* (y pro). (8) *A. rugulosus*. (9) *Trichoderma koningii*. Obsérvese el halo de inhibición de la cepa (8) frente a la cepa (9), y en menor medida el de la cepa (4) frente a la (9).

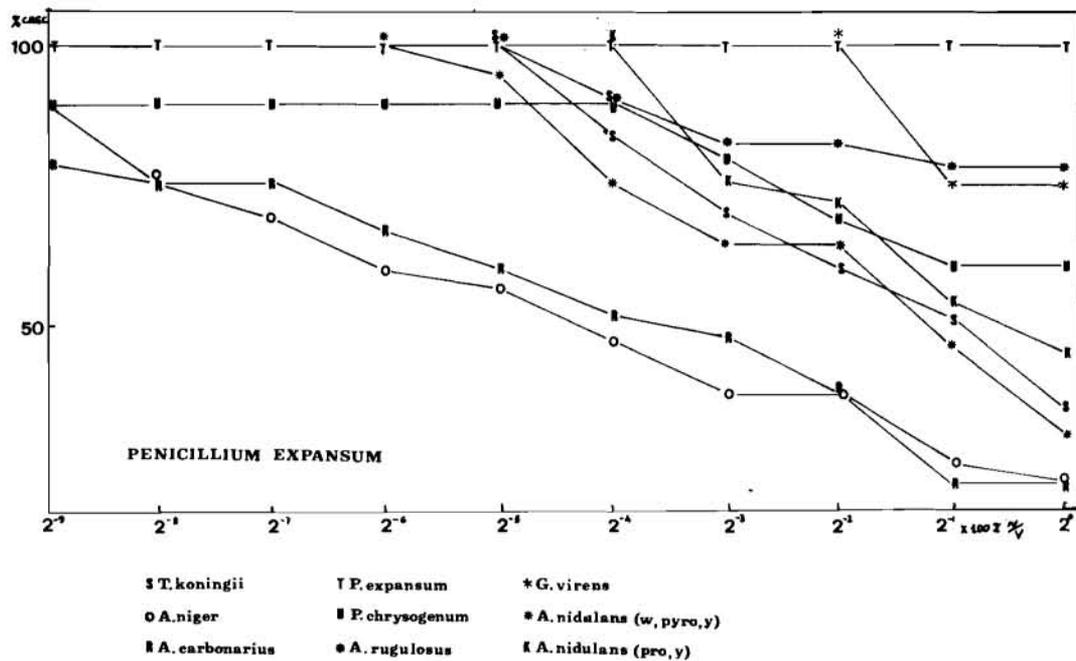


FIGURA 3.—En la abscisa se representa las concentraciones de la serie de dilución en % en v/v de secreción extracelular de *Penicillium expansum*, y en la ordenada el % de crecimiento (diámetro de la colonia referido al diámetro de la colonia testigo).

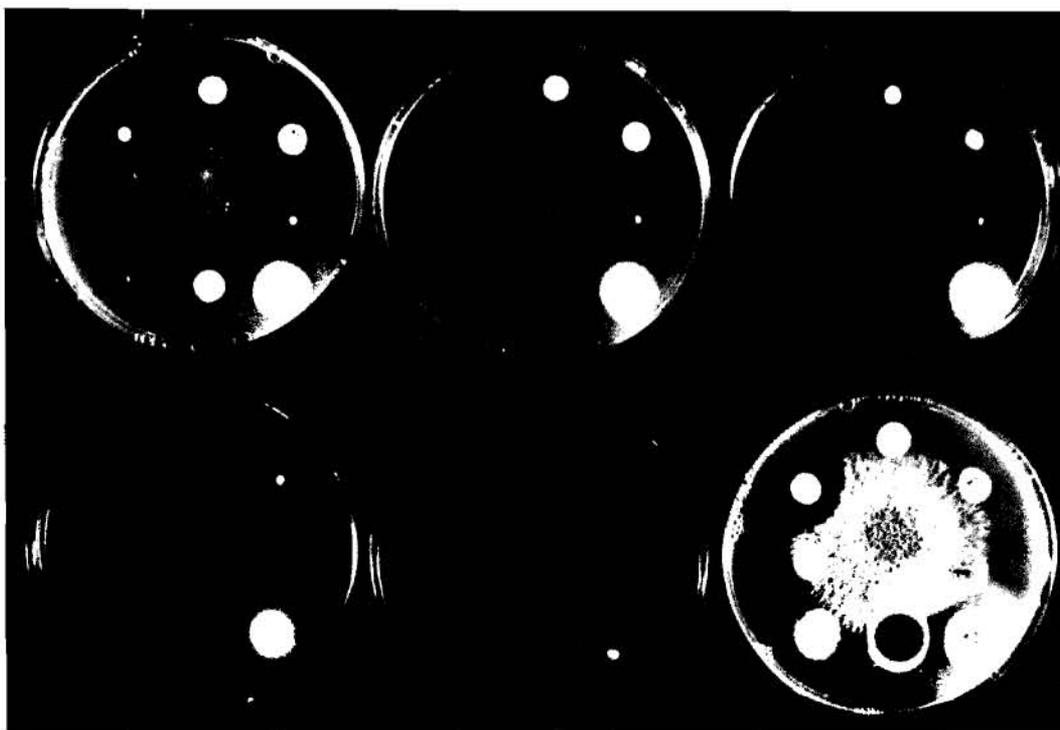


FIGURA 4.—Serie de dilución del medio AEMI con el extracto de *Clematis vitalba* (acuoso y autoclavado) donde se aprecian las distintas sensibilidades de las especies fúngicas ensayadas. El orden de las especies es análogo al de la Figura 2.

El orden creciente de las concentraciones va de izquierda a derecha y de arriba a bajo. La placa del extremo inferior derecho es el testigo.

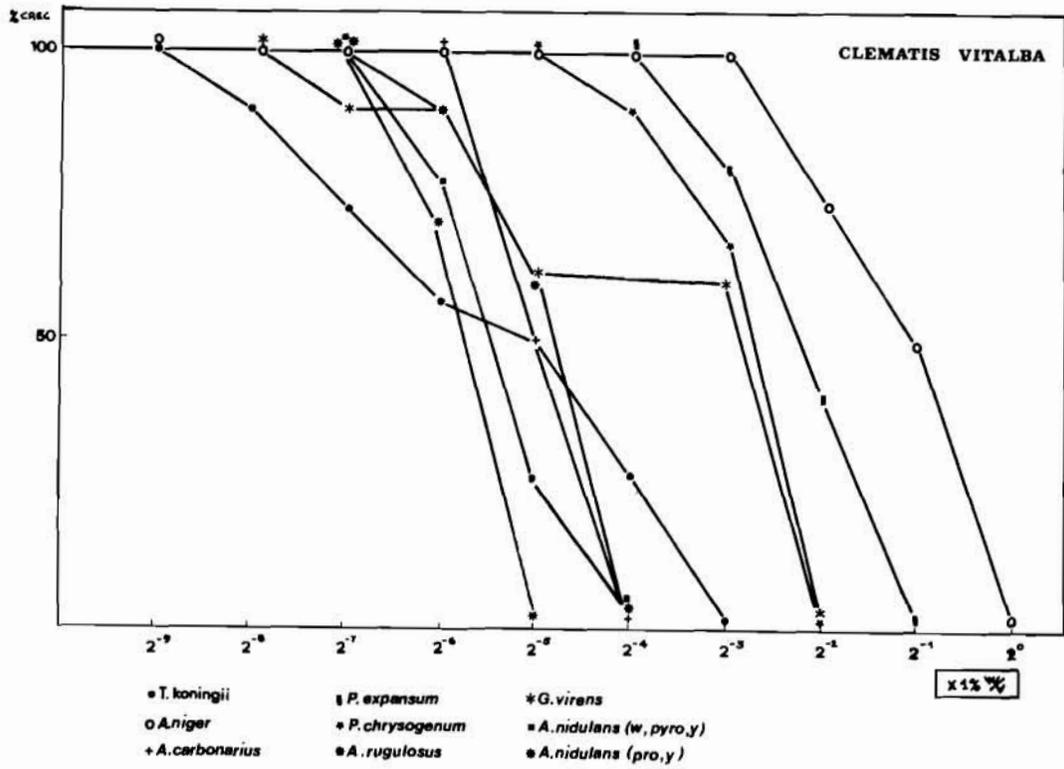


FIGURA 5.-Al igual que en la Figura 3, se representan las variaciones del crecimiento de las distintas especies frente a las diluciones del medio AEMI con el extracto de *Clematis vitalba* (acuoso y autoclavado).