

## COMUNICACIÓN CORTA

# ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE TRES ESPECIES DE LÍQUENES EN CUBA<sup>1</sup>

Daymara Idonay Vaillant-Flores<sup>2</sup>, Marlene Gómez-Peralta<sup>3</sup>, Carlos Rafael Romeu-Carballo<sup>2</sup>,  
Rebeca Ramírez-Ochoa<sup>2</sup>, Angela Porras-González<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Actividad antifúngica de extractos de tres especies de líquenes en Cuba.** El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad fungicida de los extractos de tres especies de líquenes. De las especies *Leptogium cyanescens*, *Physcia americana* y *Pyxine aff. cocoes* fueron colectados extractos del talo liquénico en el año 2009, en áreas del Jardín Botánico de Cienfuegos, Cuba. La actividad fungicida fue evaluada en hongos fitopatógenos de papa; *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora nicotianae var parasitica*. El estudio se realizó en el periodo comprendido del 2009-2011. Los compuestos se extrajeron con acetona, se concentraron por rotoevaporación, y se evaluaron a concentraciones de 0,01 y 0,07% en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), para lo cual se preparó una solución madre al 5% en dimetilsulfóxido. Los extractos se clasificaron por su toxicidad como: tóxico, ligero y moderadamente tóxico e inocuo. El extracto de *P. americana* al 0,07% inhibió 100% a *P. nicotianae*, y frente a *R. solani* manifestó valores por encima de 50%. *L. cyanescens* solo mostró actividad fungicida en ambos fitopatógenos a la mayor concentración estudiada; resultados similares se obtuvieron con el extracto de *P. aff. cocoes*. Los extractos liquénicos se clasificaron como ligeramente tóxicos a la mayor concentración e inocuos a la menor concentración probada.

**Palabras clave:** metabolitos liquénicos, actividad antibiótica en líquenes, hongos fitopatógenos en papa.

### ABSTRACT

**Antifungal activity of extracts from three species of lichens in Cuba.** The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of the three lichens extracts. Extracts from *Leptogium cyanescens*, *Physcia americana* and *Pyxine aff. cocoes* were collected from the lichens thallus in 2009 in areas from the Cienfuegos Botanic Garden, Cuba. The fungicide activity was evaluated against phytopathogens fungi of potato: *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora nicotianae var parasitica*. The study was conducted from 2009 to 2011. The compounds were extracted with acetone, concentrated by rotoevaporation, and evaluated at concentrations of 0,01 and 0,07% in potato dextrose agar (PDA) culture medium; stock solution was made of 5% dimethylsulfoxide. These extracts were classified by their toxicity as: toxic, slight and moderately toxic and harmless. The extracts from *P. americana* of 0,07% inhibited *P. nicotianae* 100%, and it showed values over 50% for *R. solani*. *L. cyanescens* only showed fungicide activity in both phytopathogens at the maximum concentration studied; similar results were obtained with the extract from *P. aff. cocoes*. The lichens extracts were classified as lightly toxic at the maximum concentration, and harmless at the minimum concentration.

**Keys words:** lichen metabolites, lichen antibiotic activity, phytopathogens fungi of potato.

<sup>1</sup> Recibido: 11 de junio, 2014. Aceptado: 23 de octubre, 2014. Parte de la tesis del primer autor para obtener el grado de Máster en Ciencias Botánicas, Mención Micología. Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Calle 110 # 514 Esq. 5ta B, Playa, La Habana, Cuba. Código Postal: 11 600 Teléfono: 537 202-2517 al 19; ext 149. dvaillant@inisav.cu, cromeu@inisav.cu, aporras@inisav.cu

<sup>3</sup> Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo. Edificio R, Ciudad Universitaria. Francisco J. Mújica S/N Col. Felicitas del Río. Código Postal 58030 Morelia, Michoacán, México. Teléfono: 44 33-167412 marlenegomezperalta@gmail.com



## INTRODUCCIÓN

Los hongos liquenizados son aquellos que establecen una relación simbiótica con un alga o cianobacteria. En esta simbiosis se manifiesta la producción de metabolitos secundarios por parte del hongo (micobionte), a partir de los glúcidos que recibe del organismo fotosintético (fotobionte), mediante la fotosíntesis. Estos metabolitos liquénicos presentan disímiles propiedades y desempeñan un papel importante tanto en la fisiología de los líquenes, como en la clasificación taxonómica de los mismos (Culberson et al., 1985; Feige y Lumbsch et al., 1995; Lumbsch, 2002; Toledo et al., 2004).

La actividad fungicida de extractos de líquenes ha sido reportada por varios investigadores; metabolitos liquénicos producidos por la especie *Lecanora argentata* en *Colletotricum acutatum*, agente causal de la antracnosis del pepino, fueron evaluados por Wei et al. (2008). Por otra parte, los metabolitos liquénicos producidos por *Hypogymnia physodes* demostraron la capacidad de inhibir el crecimiento y la esporulación de *Aspergillus flavus* (Suberu, 2004).

En la actualidad se buscan nuevas alternativas naturales de control de fitopatógenos, con el fin de disminuir el uso de plaguicidas químicos. Los líquenes, dados sus características, se muestran como candidatos efectivos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad fungicida de los extractos de tres especies de líquenes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies liquénicas fueron colectadas en el año 2009 en zonas del Jardín Botánico de Cienfuegos de la provincia del mismo nombre en Cuba; a una altura sobre el nivel del mar de 50 m y se identificaron por Brodo et al. (2001) como: *Leptogium cyanescens* (Rabenh) Körber, *Phycia americana* Merr y *Pyxine aff. cocoes* (Swartz) Nyl. Se colectaron con base en la abundancia de la especie en la zona, tomando solo la cantidad necesaria para el estudio. Los líquenes colectados se conservaron con su respectiva etiqueta en el herbario del Laboratorio de Micología del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) en La Habana, Cuba.

Los estudios de antibiosis se realizaron en los años 2010-2011 en los Laboratorios de Micología y

Química del INISAV. La extracción de las sustancias liquénicas se realizó mediante la metodología descrita por Jiménez et al. (2006). Las muestras, del talo liquénico de cada espécimen, se lavaron con abundante agua y se pusieron a secar en una estufa 30 °C durante 48 horas. Luego se trituraron hasta pulverizar y se pesó 1 g de cada polvo; esta porción se cubrió con 10 ml de acetona y se dejó reposar durante 48 horas, hasta que el solvente quedó saturado. Posteriormente, se filtró al vacío a través de un papel de filtro (no. 4) y se colocó en balones que fueron pesados con anterioridad. Los solventes se rotoevaporaron hasta quedar solo el crudo. Luego, por diferencia de los pesos de los balones, se determinó la cantidad de crudo obtenido y se disolvió con dimetilsulfoxido (DMSO) para obtener cada extracto al 5%. Los ensayos de antibiosis se realizaron por el método de envenenamiento del medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), a concentraciones de 0,07% y 0,01% (Cuadro 1). Cada dosis fue aplicada en el PDA fundido, previamente esterilizado, a temperatura de 30 a 45 C°.

**Cuadro 1.** Preparación de las concentraciones con el extracto de *L. cyanescens* y *P. americana* al 5% en dimetilsulfoxido (DMSO) Laboratorio de Química. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Cuba. 2010.

**Table 1.** Preparation of concentrations of *L. cyanescens* and *P. americana* extract of 5% dimethylsulfoxide (DMSO) Chemistry Laboratory at the Research Institute of Plant Protection (INISAV), Cuba. 2010.

Concentración	Cantidad de extracto	Cantidad de PDA para 50 ml
0,07%	7 ml	43 ml
0,03%	3 ml	47 ml
0,01%	1 ml	49 ml

PDA= Agar papa dextrosa / Potato dextrose agar.

El PDA, complementado con cada uno de los extractos liquénicos, se colocó en placas *Petri* de 5 cm de diámetro, y una vez solidificado, se colocaron en el centro discos de agar de 1 cm de diámetro con micelio de los hongos fitopatógenos *P. nicotianae* var *parasitica* y *R. solani* aislados de papa. Los hongos se encontraban conservados en tubos de PDA a razón de diez réplicas

por hongo, a 4 °C en el cepario correspondiente al Laboratorio de Micología del INISAV.

En el ensayo se utilizó un control negativo que consistió en DMSO a la mayor concentración probada. Se emplearon tres réplicas por tratamiento y las placas se incubaron a 25 °C en incubadora de calor durante siete días. Pasado este tiempo, se midieron los diámetros de las colonias tratadas y las testigos para calcular el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(DCC - DCT)}{DCC} * 100$$

Donde:

DCC: diámetro de la colonia control.

DCT: diámetro de la colonia tratada.

Los datos de los experimentos se procesaron mediante análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), utilizando la Prueba de Tukey (p<0,05), aplicando el programa Analest.

Los extractos líquénicos se catalogaron según los resultados de los porcentajes de inhibición, siguiendo la escala establecida por la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) (Cuadro 2) (Viñuela y Jacas, 1993). Además se calcularon las dosis inhibitorias mínimas y medias, mediante un análisis de regresión de los porcentajes de inhibición, transformando los valores probit en función de la concentración.

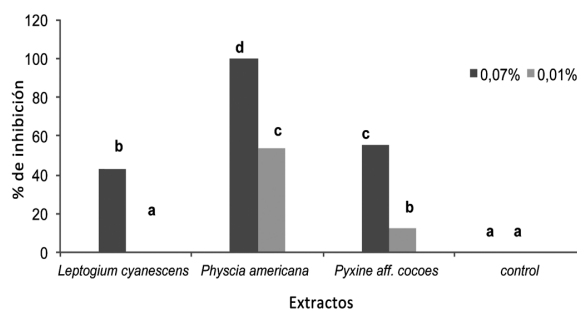
**Cuadro 2.** Clasificación establecida a escala de laboratorio a productos con actividad antimicrobiana. Viñuelas y Jacas (1993).

**Table 2.** Classification established at laboratory scale, to products with antimicrobial activity. Viñuelas y Jacas (1993).

Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial	Clasificación
Valores <30% de mortalidad	Inocuo
Valores 30-79% de mortalidad	Ligeramente tóxico
Valores 80-99% de mortalidad	Moderadamente tóxico
Valores >99%	Tóxico

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto producido por *P. americana* logró inhibir en un 100% el crecimiento micelial de *P. nicotiane* var *parasitica* a la mayor concentración, y mostró valores de más de un 50% de inhibición al 0,01%. El extracto de *L. cyanescens* solo tuvo efecto a la mayor concentración de estudio, con valores de un 43% de inhibición. Las sustancias líquénicas obtenidas de *P. aff. cocoes* registraron valores de más de un 50% de inhibición al 0,07%. Al 0,01% los porcentajes de inhibición fueron de un 12%, pero con diferencias significativas con el control. Todos los extractos líquénicos mostraron diferencias significativas entre sí y con el control (Figura 1).

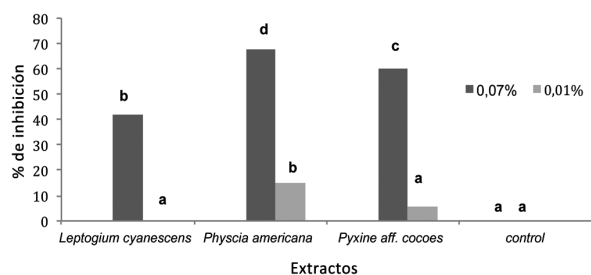


**Figura 1.** Porcentaje de inhibición de cada extracto de tres especies de líquenes sobre *P. nicotiane* var *parasitica*. Laboratorio de Micología, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Cuba. 2011.

Letras diferentes muestran diferencias significativas.

**Figure 1.** Inhibition percentage of each extract from three species of lichens over *P. nicotiana* var *parasitica*. Mycology Laboratory at the Research Institute of Plant Protection (INISAV), Cuba. 2011. Different letters show significant differences.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* de los extractos de *P. americana* y *P. aff. cocoes* fueron de 65 y 60%, a la concentración más alta, con diferencias significativas entre sí. A la concentración de 0,01% solo *P. americana* manifestó diferencias significativas respecto al control negativo, a pesar de tener valores por debajo del 20%. En los restantes extractos; solo *P. aff. cocoes* mostró actividad inhibitoria, pero sin diferencias significativas con el control (Figura 2).



**Figura 2.** Porcentajes de inhibición de cada extracto de tres especies de líquenes sobre *R. solani*. Laboratorio de Micología, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Cuba. 2011. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

**Figure 2.** Inhibition percentage of each extract from three species of lichens above *R. solani*. Mycology Laboratory at the Research Institute of Plant Protection (INISAV), Cuba. 2011. Different letters show significant differences.

A partir de la escala establecida por la OILB, los extractos líquénicos fueron ligeramente tóxicos a la

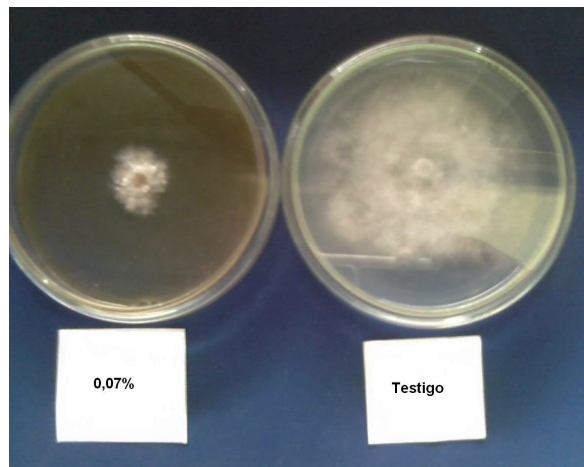
concentración de 0,07%, exceptuando el extracto de *P. americana* que se clasificó como tóxico frente *P. nicotianae* var *parasitica* (Cuadro 3). Al 0,01% este mismo extracto frente a este oomyceto, se mostró ligeramente tóxico y el resto resultó inocuo frente a los dos fitopatógenos (Cuadro 3). El efecto tóxico de un producto determinado, ya sea biológico o químico, se debe, en gran medida, al modo de acción que ejerce sobre el organismo que se estén probando. Las observaciones realizadas al microscopio óptico y estereoscopio de las colonias tratadas con cada uno de los extractos, mostraron daños en las hifas, con ruptura del citoplasma e hifas deformes. Además, de colonias con crecimiento ralo y poco abundante con respecto a la colonia control (Figura 3).

La  $DI_{10}$  estuvo en un rango de 0,004% a 0,05% y la  $DI_{50}$  se acotó en un rango de 0,01% a 0,06%, exceptuando el extracto de *L. cyanescens*, con el cual se necesitan valores por encima de los estudiados para lograr esta condición (Cuadro 4). La  $DI_{10}$  más baja para *P. nicotianae* var. *parasitica* fue la obtenida del extracto de *P. americana* con dosis por debajo de las empleadas

**Cuadro 3.** Toxicidad de los extractos de tres especies de líquenes en *P. nicotianae* var *parasitica* y *R. solani*. Laboratorio de Micología, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Cuba. 2011.

**Table 3.** Toxicity of extracts from three species of lichens of *P. nicotianae* var *parasitica* y *R. solani*. Mycology Laboratory at the Research Institute of Plant Protection (INISAV), Cuba. 2011.

Fitopatógenos	Extractos	Concentración	Clasificación
<i>P. nicotianae</i> var <i>parasitica</i>	<i>L. cyanescens</i>	0,07%	Ligeramente tóxico
		0,01%	Inocuo
	<i>P. americana</i>	0,07%	Tóxico
		0,01%	Ligeramente tóxico
	<i>P. aff. cocoes</i>	0,07%	Ligeramente tóxico
		0,01%	Inocuo
<i>R. solani</i>	<i>L. cyanescens</i>	0,07%	Ligeramente tóxico
		0,01%	Inocuo
	<i>P. americana</i>	0,07%	Ligeramente tóxico
		0,01%	Inocuo
	<i>P. aff. cocoes</i>	0,07%	Ligeramente tóxico
		0,01%	Inocuo



**Figura 3.** Efecto del extracto de *Pyxine aff. cocoes* al 0,07% sobre el crecimiento de la colonia de *P. nicotianae* var *parasitica* (izquierda placa con extracto, derecha testigo). Laboratorio de Micología, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Cuba. 2011.

**Figure 3.** Effect of *Pyxine aff. cocoes*'s extract of 0,07% on the growth of the colony of *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* (left plate with extract, right witness). Mycology Laboratory at the Research Institute of Plant Protection (INISAV), Cuba. 2011.

en este estudio, al igual que la  $DI_{50}$  se logró a la menor concentración empleada (Cuadro 4). En la literatura no hay evidencia de dosis inhibitorias medias de la mayoría de extractos líquenicos estudiados; existen otros estudios, como los realizados por Prashith et al.

(2012), donde emplearon extractos de *Everniastrum cirrhatum* contra *Candida albicans*\* y *Cryptococcus neoformans*\* con  $DI_{50}$  de 0,0474%.

La actividad fungicida de sesenta líquenes sobre *Colletotrichum acutatum*, causante de la antracnosis en pepino fue evaluado por Wei et al. (2008); entre las especies estudiadas se encontraban *Physcia sterallis*, *Pyxine endochrysin* y *P. consocians*, todas pertenecientes a los mismos géneros de las especies de estudio y las cuales mostraron porcentajes de inhibición de más de un 60%. Otro hongo liquenzado con una marcada actividad fungicida fue *Parmelia sulcata*, que en dosis bajas (0,0037 mg/ml), inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinérea* y *Aspergillus fumigatus* (Rankovic y Kosanic, 2012). Por otra parte, Shahi et al. (2001) utilizaron el extracto acuoso de *Heterodermia leucomela* obteniendo efecto de un 100% de inhibición a dosis de 60 y 80  $\mu$ l/ml, sobre los hongos fitopatógenos *Cladosporium gladosporioides*, *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum*. Los resultados obtenidos en la clasificación de los extractos líquenicos sobre *P. nicotianae* y *R. solani* pueden variar de acuerdo a las dosis establecidas para el estudio, por lo que se podrían analizar con otras concentraciones mayores. La actividad antimicrobiana de los extractos líquenicos está influenciada por diversos factores como: especie de líquen, solvente utilizado para la extracción y la concentración empleada (Rankovic et al., 2010); esto podría ser una de las razones por las que se obtuvieron valores tan bajos con los extractos producidos por *L. cyanescens*. Esta especie es reportada por Nash

**Cuadro 4.** Valores de las  $DI_{10}$  y  $DI_{50}$  de cada extracto de tres especies de líquenes en *P. nicotianae* var *parasitica* y *R. solani*. Laboratorio de Micología, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Cuba. 2010.

**Table 4.**  $DI_{10}$  and  $DI_{50}$  values of each extract from three species of lichens for *P. nicotianae* var *parasitica* and *R. solani*. Mycology Laboratory at the Research Institute of Plant Protection (INISAV), Cuba. 2010.

Fitopatógenos	Extractos	$DI_{10}$	$DI_{50}$	R <sup>2</sup>	Ecuación Probit
<i>P. nicotianae</i> var <i>parasitica</i>	<i>L. cyanescens</i>	0,05%	Dosis >0,07%	100%	Probit (%)= 13,3 +7,32 logC
	<i>P. amaricana</i>	0,004%	0,01%	100%	Probit (%)= 12,1 +3,51 logC
	<i>P. aff. cocoes</i>	0,006%	0,06%	97,2%	Probit (%)= 6,72 +1,37 logC
<i>R. solani</i>	<i>L. cyanescens</i>	0,05%	Dosis >0,07%	100%	Probit (%)= 14,6 +8,47 logC
	<i>P. amaricana</i>	0,02%	0,05%	100%	Probit (%)= 16,1 +9,23 logC
	<i>P. aff. cocoes</i>	0,009%	0,05%	99,8%	Probit (%)= 7,4 +1,72 logC

et al. (2001) sin presencia de sustancia líquénica por cromatografía de capa fina (TLC), lo cual puede ser una razón de su baja actividad biocida.

En cuanto al tipo de solvente empleado, estudios recientes demuestran que influye en la cantidad de sustancia líquénica extraída, y por tanto en la actividad antimicrobiana que puede presentar el extracto. Al evaluar el efecto fungicida de los metabolitos producidos por las especies: *Bulbothrix setschwanensis*, *Erverniastrum nepalense*, *Heterodermia diademata* y *Parmelaria thomsonii* utilizando tres solventes diferentes (acetona, metanol y cloroformo), se obtuvieron los mejores resultados en los extractos con acetona frente a: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. roseum* y *Penicillium citrinum* (Tiwari et al., 2011).

Las características taxonómicas de las especies de hongos fitopatógenos también influyen en la actividad inhibitoria del crecimiento micelial de los metabolitos líquénicos. Los resultados mostraron que los valores de inhibición de cada uno de los extractos variaron para cada especie de hongo fitopatógeno. Para *P. nicotianae* var *parasitica* los porcentajes de inhibición fueron mayores que para *R. solani*, esto podría deberse entre otras cosas, a las características morfológicas y bioquímicas de estas especies. Teniéndose en cuenta que la pared celular de *P. nicotianae* var *parasitica* está compuesta de celulosa, a diferencia de *R. solani* que presenta quitina como en el resto de los hongos (Pérez et al., 2010). Los resultados obtenidos para ambos fitopatógenos marcan el inicio del estudio de las propiedades antibióticas de los metabolitos líquénicos de especies cubanas. Quedarían aun buscar nuevas alternativas de obtención de metabolitos en condiciones de laboratorio y la identificación a través de técnicas cromatográficas de los mismos.

## LITERATURA CITADA

- Brodo, I.M., S. Sharnoff, and S. Sharnoff. 2001. Lichens of North America. Yale University Press, London, USA.
- Culberson, C.F., W.L. Culberson, and A. Johnson. 1985. Does the symbiont alga determine chemotype in lichens?. *Mycologia* 77:657-660.
- Feige, G.B., and H.T. Lumbsch. 1995. Some types of chemical variation in lichens. *Crypt. Bot.* 5:31-35.
- Jiménez, E., M.L. Caballero, R.M. González, M.R. Chapa, R. Vázquez, y E. Ángeles. 2006. Detección del efecto del extracto del liquen de *Usnea florida* sobre la implantación y fecundidad del estadio adulto de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c. *Vet. Méx.* 37:43-50.
- Lumbsch, H.T. 2002. Analysis of phenolic products in lichens for identification and taxonomy. In: I.C. Kranner et al., editors, *Protocolos in lichemology*. Springer-Verlag, Berlin, GER. p. 281-295.
- Nash, III., T.H. Ryan, B.D. Gries, and F. Bungarts. 2001. Lichen flora of the Greater Sonoran Desert Region, Vol I. Lichens Unlimited, Arizona State University. Tempe, AZ, USA.
- Pérez, M.I., L.F. Peñaranda, y M.M. Herazo. 2010. Impacto, manejo y control de enfermedades causadas por *Phytophthora palmivora* en diferentes cultivos. Universidad de Pamplona, ESP. 71 p. [https://iserupa.files.wordpress.com/2010/12/phytophthora\\_palmivora\\_docx.pdf](https://iserupa.files.wordpress.com/2010/12/phytophthora_palmivora_docx.pdf) (consultado sept. 2013).
- Prashith, R., L.S. Raghavendra, D. Swathi, M. Venugopal, and V. Kanivebagillu. 2012. Antifungal and cytotoxic activity of *Everniastrum cirrahatum*. *Chiang Mai J. Sci* 39(1):76-83.
- Rankovic, R., and M. Kosanic. 2012. Antimicrobial activities of different extracts of *Lecanora atra*, *Lecanora muralis*, *Parmelia saxtilis*, *Parmelia sulcata* and *Parmeliopsis ambigua*. *Pak. J. Bota.* 44:429-433.
- Rankovic, R., D. Rankovic, and D. Maric. 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. *Mikrobiologija* 79:812-818.
- Shahi, S.K., A.C. Shukla, A. Dikshit, and D.K. Upreti. 2001. Broad spectrum antifungal properties of the lichen *Heterodermia leucomela*. *The Lichenologist* 33:177-179.
- Suberu, H. 2004. Preliminary studies of inhibitions in *Aspergillus flavus* with extracts of two lichens and Bentex-T fungicide. *Afr. J. Biotechnol.* 3:468-472.
- Tiwari, P., H. Rai, D.K. Upreti, S. Trivedi, and P. Shunkla. 2011. Assessment of antifungal activity of some himalayan foliose lichens against plant pathogenic fungi. *Am. J. Plant Sci.* 2:841-846.
- Toledo, F.J., A. García, F. León, y J. Bermejo. 2004. Ecología química en hongos y líquenes. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.: XXVIII* (109):510-528.
- Viñuela, E., y J. Jacas. 1993. Los enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas. Ministerio de Agricultura. H.D. 2-93. Madrid, ESP. 24 p.
- Wei, X., J. Hae-Sook, H. Keon, K. Young, and H. Jae-Seoun. 2008. Antifungal activity of lichen-forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. *Plant Pathol. J.* 24:202-206.