

185
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LOS ANTIBIOTICOS PRODUCIDOS POR
Penicillium frequentans EN LA GERMINACION DE
ESPORAS DE HONGOS FITOPATOGENOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CRISOSTOMO VILLEGAS GARCIA

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN	i
I. INTRODUCCIÓN	1
- Historia del descubrimiento de compuestos con actividad antimicrobiana	2
- ANTIBIÓTICOS	6
- Producción de Antibióticos en la naturaleza	6
- Mecanismos de acción de los Antibióticos	8
- Clasificación de los antimicrobianos	12
- Algunos organismos que producen antimicrobianos	13
- FRECUENTINA Y PALITANTINA	17
a) Descubrimiento, estudios pioneros y estructura química	17
b) Propiedades fisicoquímicas	19
c) Estudios en diversos hongos	20
- CONTROL BIOLÓGICO	21
II. OBJETIVOS	24

III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
- Aislamiento, cultivo y mantenimiento de las cepas de hongos a partir de tejido vegetal enfermo	25
- Cultivo de <u>P. frequentans</u> Westling y la producción de los antibióticos A y B	27
- Extracción y purificación parcial de los antibióticos	29
- Ensayos de las fracciones 4 y 5 antibióticos B y A respectivamente, sobre diferentes hongos	32
- Cálculo del efecto inhibitorio de los antibióticos	34
- Análisis estadístico	34
IV. RESULTADOS	37
- Identificación de los organismos aislados	37
- Producción de los antibióticos A y B	37
- Ensayos o pruebas de antagonismo <u>in vitro</u> de los antibióticos y determinación de su espectro antifúngico	39
- Análisis estadístico	42
V. DISCUSIÓN	48
VI. CONCLUSIONES	58

VII. BIBLIOGRAFÍA	60
VIII. APÉNDICE	65
- Apéndice 1.	65
- Apéndice 2.	66

TABLAS, FIGURAS Y LAMINAS.

Tabla I.	Ubicación taxonómica de las especies aisladas de acuerdo a Herrera y Ulloa (1990).	38
Tabla II.	Organismos que se aislaron y ensayaron con los antibióticos A y B.	40
Tabla III.	Valores promedio de las zonas de inhibición que produjeron los antibióticos A y B (SD) sobre el crecimiento de algunos de los hongos ensayados.	41
Tabla IV.	Análisis de varianza para el efecto del antibiótico A en el crecimiento de los hongos fitopatógenos ensayados, valores de F calculada, F tabulada y p para cada una de las especies.	46
Tabla V.	Análisis de varianza para el efecto del antibiótico B en el crecimiento de los hongos fitopatógenos ensayados, valores de F calculada, F tabulada y p para cada una de las especies.	46
Figura 1.	Esquema de <u>Penicillium Frequentans</u> .	4
Figura 2.	Estructura química de la citromicetina.	5
Figura 3.	Estructura química de la frecuentina y palitantina.	18

Figura 4.	Procedimiento para la extracción y purificación parcial de los antibióticos A y B.	31
Figura 5.	Aparato de destilación simple que se utilizó en la extracción del cloroformo.	32
Figura 6.	Modelo de los bioensayos realizados.	39a
Figura 7.	Gráficas de los ensayos de los antibióticos (SD), y las soluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10,000, en algunos hongos ensayados.	53
Figura 8.	Efecto inhibitorio de los antibióticos A y B, SD y Diluidos, sobre algunas de las especies ensayadas.	54
Lámina 1.	Efecto inhibitorio del antibiótico B sobre <u>Monilinia fructicola</u> .	43
Lámina 2.	Efecto inhibitorio del antibiótico concentrado B sobre <u>Colletotrichum gramminicola</u> .	44
Lámina 3.	Efecto inhibitorio del antibiótico concentrado B sobre <u>Cladosporium</u> sp. y <u>Alternaria brassicicola</u> .	45

RESUMEN

El presente trabajo representa una aportación al conocimiento que hoy en día se tiene sobre el control biológico de hongos fitopatógenos. El hongo Penicillium frequentans Westling, produce ciertas sustancias metabólicas llamadas antibióticos, con propiedades antifúngicas. Para la producción de estas sustancias, se hizo crecer al hongo en un medio estacionario líquido de Czapek - Dox con glucosa al 5%, se extrajeron y purificaron parcialmente las fracciones 4 y 5, antibióticos (B y A), mediante el procedimiento para extracción de antibióticos propuesto por Birkinshaw, (1952). Dichas fracciones se ensayaron con 32 especies de hongos que fueron aisladas a partir de tejido vegetal enfermo. Ambas fracciones mostraron un efecto inhibitorio sobre 29 de las 32 especies de hongos que se ensayaron. Siendo las especies más susceptibles Aspergillus niger Van Teighem, Trichoderma viridae Pers., y Verticillium dahliae Klebahn., y las más resistentes, en las cuales los antibióticos no ejercieron ningún efecto inhibitorio: Aspergillus flavus Link ex Fries, Rhizopus stolonifer (Ehrenb. ex Fries) Lind., y Cladobotrium sp. Se ensayaron los antibióticos A y B sin diluir (SD) y en forma diluída, observando que aún hay inhibición significativa en las diluciones 1/10 y 1/100, mientras que en las diluciones de 1/1,000 y 1/10,000 ya no se observó ningún efecto inhibitorio.

Ambos antibióticos son termoestables a temperaturas que van desde 25 °C hasta 120 °C, pues se esterilizaron en el autoclave sin presentar alteración aparente en su capacidad inhibitoria, sin embargo, esta disminuye con el paso del tiempo.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas han afectado el desarrollo social y económico del hombre, porque reducen la cantidad y la calidad de los productos vegetales de las especies de importancia agrícola, así como también su reproducción. Simultáneamente también las enfermedades de las plantas han alterado la historia de la humanidad, ya sea directa o indirectamente, al grado que han destruido sus cultivos y sus bosques (Nash y Snyder, 1962). Por tal motivo, el hombre tuvo que admitir la importancia de las enfermedades de las plantas y estimuló intensamente la investigación de sus causas.

Todo esto contribuyó de manera decisiva a que el hombre tuviera que desarrollar técnicas especiales para poder prevenir y controlar el ataque que causan los organismos fitopatógenos, principalmente los hongos, sobre sus cultivos y cosechas (Agrios, 1988).

A partir de este momento se vió en la necesidad de crear los fungicidas mediante la experimentación y la utilización de productos y sustancias químicas.

Los fungicidas son de gran importancia económica y han sido ampliamente utilizados para controlar las enfermedades que producen los hongos. Los antiguos griegos usaban el azufre como fungicida con muy buenos resultados, y aun en la actualidad es ampliamente utilizado.

Otros fungicidas inorgánicos se utilizaron después de que se aceptara la teoría en la que se establece que las enfermedades son causadas por microorganismos (Mc Callan, 1967). Tal es el caso de la mezcla bordelesa, que se prepara al mezclar sulfato de cobre y cal, la cual desarrolló Millardet, en (1932). A esto le siguió el uso del arsenato de plomo y de otros arsénicos, el cloruro de mercurio, y otros compuestos mercuriales que incluyen mercurios orgánicos. Los fungicidas orgánicos se inventaron en 1934, y desde entonces se han desarrollado un gran número de ellos, de los cuales los ditiocarbamatos y las quinonas son los grupos más abundantes (Horsfall, 1975).

- **HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.**

Gosio, en (1896) mientras investigaba la causa de la Pelagra (Enfermedad crónica, grave, caracterizada por eritemas y trastornos digestivos, psíquicos y nerviosos producida por deficiencia de niacina en el organismo), aisló una sustancia ácida cristalina de un moho del arroz, la cual mostró ligera actividad antibacteriana (Korzybski y Kurylowicz, 1961). Al parecer fue producida por el hongo Penicillium brevicompactum Diercks. Más tarde también se aisló esta misma sustancia de otras especies de Penicillium y se nombró ácido micofenólico. Este mostró una ligera actividad antibacteriana y una gran actividad contra un número considerable de hongos muchos de los cuales son patógenos de plantas y del hombre. El ácido micofenólico fué el primer antibiótico aislado en forma pura (Dekker, 1978).

En 1934 Weindling estudió el principio activo de Trichoderma lignorum Pers., el cual presenta propiedades antifúngicas y a la sustancia producida por este hongo se le nombró gliotoxina. Por otro lado, Van Luyk, en (1938) observó que el extracto de un cultivo de Penicillium expansum Link ex Gray., inhibió el crecimiento de ciertas especies de Fusarium, la sustancia se aisló y en la actualidad se le conoce comúnmente como patulina.

Los estudios clásicos de Wehmer, sobre la producción de ácido cítrico por algunos hongos le permitieron dar el nombre genérico de Citromyces a los mohos que producen éste compuesto (Mahmoodian y Stickings, 1964). Sin embargo, estos hongos se agrupan más tarde en el género Penicillium y principalmente, en las series de Penicillium frequentans (Raper y Thom, 1949).

P. frequentans, Westling (del latín frequentans: frecuente, común), antes de la aparición del manual de Raper y Thom, 1949, éste hongo había sido identificado como Penicillium flavi-dorsum Biourge., sin embargo, este último es considerado como sinónimo de Penicillium frequentans (Smith et al., 1965).

En la actualidad Pitt, (1979) considera a P. frequentans como sinónimo de P. glabrum (Wehmer) Westling. Los aislamientos de este hongo crecen rápidamente a 25°C y producen colonias verde oscuro con una textura estrictamente velutinosas. Los conidióforos son vesiculados y los conidios de paredes lisas formados en grandes cadenas, (fig. 1).

Es un hongo muy común en toda clase de sustratos, su distribución es amplia ya que es frecuente encontrarse en alimentos, composta, excremento de animales, papel, pulpa de papel, en cereales, productos de éstos, y en habitats naturales como el suelo y aire. Pertenece al subgénero Aspergilloides, en el cual sólo se incluyen aquellas especies en las que los esporangióforos están bien definidos y terminan en un penicilo monoverticilado (Raper y Thom, 1949; Pitt, 1979).

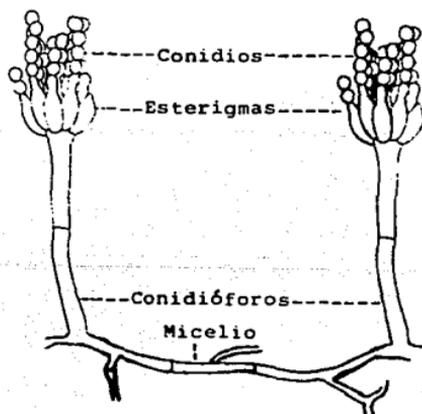


Figura 1. Esquema del talo micelial cenocítico de Penicillium frequentans, donde se observan las hifas, conidios y conidióforos.

Hetherington y Raistrick, (1931) aislaron una sustancia amarilla cristalina a partir de varias cepas de esta serie, y la nombraron citromicetina. Su estructura química (Fig. 2), fue determinada finalmente por Cavill, Robertson y Whalley en (1950) (Hetherington y Raistrick, 1931).

Posteriormente, en 1943 Wilkins y Harris, describieron la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por Penicillium frequentans (Mahmoodian y Sticking 1964).

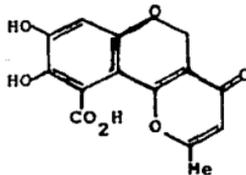


Fig. 2. Estructura química de la citromicetina o ácido frecuente.

- ANTIBIÓTICOS.

En 1962 Waksman, define a los antibióticos como sustancias metabólicas que producen ciertos microorganismos, las cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento e inclusive de destruir a otros microorganismos, aunque estas sustancias estén presentes en concentraciones extremadamente bajas, en el orden de $\mu\text{g/ml}$. Los antibióticos pueden ser toxinas, bacteriocinas, fungocinas etc.

Algunos investigadores, como Gottlieb y Shaw, (1970) basados en trabajos sobre el tema han sugerido que los antibióticos son sustancias orgánicas que son producidas por ciertos microorganismos las cuales son nocivas en bajas concentraciones para el desarrollo de otros y sus actividades metabólicas. Las sustancias antimicrobianas de las formas superiores de vida, tales como plantas y animales, también son consideradas como antibióticos.

- PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LA NATURALEZA.

La mayoría de los antibióticos que se conocen hoy en día se han detectado mediante el aislamiento y realización de pruebas de antagonismo (bioensayos), de los organismos pobladores del suelo y de otros habitats naturales. Algunos microbiólogos como Waksman, (1956), Brian, (1957) y otros fitopatólogos han asumido que los antibióticos juegan un papel clave en las interacciones de

competencia en el suelo, pero aún no existe evidencia convincente sobre la producción de antibióticos en la naturaleza, sin embargo, hay evidencia para sugerir que la producción de antibióticos en el suelo esta limitada o impedida por la escasez de nutrientes, aunque la producción de los primeros en ambientes naturales ha sido cuestionada desde varios puntos de vista. El crecimiento restringido y efímero de los productores potenciales, tales como los Actinomyces Streptomyces y principalmente las especies de Penicillium en el suelo, ha sido enfatizado y la posibilidad de la producción de antibióticos en sus microambientes, donde los nutrientes estan concentrados y donde ocurre una intensa competencia, ha sido desechada (Katz y Demain, 1977). Sin embargo, la relevancia natural de los antibióticos no esta necesariamente confinada a las interacciones competitivas en la naturaleza, también hay evidencia que ellos juegan un papel importante en la diferenciación morfológica, tal como la producción de esporas. Finalmete se ha argumentado que los antibióticos deben conferir una ventaja natural selectiva a sus productores, a medida que se dedica más DNA para su determinación genética (Williams y Vicker, 1986).

De estas teorías han surgido algunos conceptos:

1. La producción de antibióticos requiere que el organismo que los esta produciendo tenga una adecuada nutrición, especialmente nutrientes ricos en carbono. En el suelo, esto significa que la producción usualmente tiene lugar en la vecindad de sustratos orgánicos como paja y cáscaras de semillas.

2. La extracción de antibióticos de tales áreas ha sido difícil pero posible. Aunque la detección de compuestos antibióticos en la rizosfera ha tenido menos éxito, los números absolutos de los antagonistas pueden ser mayores aquí, que en la raíz libre de suelo.
3. La antibiósis en el medio de cultivo no necesariamente indica antibiósis en el suelo.
4. La inactivación de los antibióticos producidos en el suelo es debida a varios procesos, incluyendo la adsorción por los coloides de la arcilla y las partículas de humus, la degradación microbiológica real y la inestabilidad de estos metabolitos debida al pH. La más importante de estas es la adsorción.
5. Puede ocurrir que los antibióticos persistan en condiciones de adsorción. Se puede inferir una liberación lenta de las reacciones de la flora bacteriana (Baker, 1968).

- MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.

Muy pocos antibióticos antifúngicos han sido usados para el control de las enfermedades de las plantas, aunque se ha reportado que muchos disminuyen la enfermedad en condiciones experimentales. El conocimiento sobre el mecanismo

de acción de los antibióticos podría ayudar en su uso y en la búsqueda de sus análogos que se podrían adaptar mejor al control de las enfermedades de las plantas (Gottlieb y Shaw, 1970).

Las células fúngicas deben llevar a cabo muchos procesos bioquímicos como requisito para su desarrollo, y para mantenerse así mismas y no morir. Son muchos los efectos fisiológicos que producen los antibióticos a nivel celular, entre los que destacan; la inhibición en la síntesis de la pared de las membranas celulares, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y las reacciones de transporte en el proceso de respiración por las cuales la célula obtiene energía (Bauer, 1987).

Los hongos fitopatógenos han sido clasificados en tres grupos de acuerdo a su sensibilidad a algunos antibióticos, como la ascoquitina estos son: (i) altamente resistentes, (ii) moderadamente resistentes, (iii) sensitivos. Los hongos pertenecientes al grupo altamente resistente absorben la ascoquitina lentamente y se desintoxican mediante la reducción biológica. Los hongos moderadamente resistentes también absorben el antibiótico lentamente pero presentan un ligero mecanismo de desintoxicación o simplemente no lo presentan. Los hongos sensitivos absorben el antibiótico rápidamente y no presentan un mecanismo de desintoxicación (Nakanishi y Oku, 1989).

El efecto de ciertas sustancias antifúngicas como los antibióticos, los fungicidas, entre otros, sobre la germinación de las esporas y el desarrollo de los hongos fitopatógenos, hasta cierto punto, está determinado por la susceptibilidad intrínseca

de las especies a estas sustancias. Esta podría deberse en gran parte a la facilidad con que se transportan las sustancias químicas al interior de la célula fúngica. En los hongos se presentan los 4 tipos de transporte reconocidos por Whitaker (1976). En los Deuteromicetes, Ascomicetes y Basidiomicetes, los aminoácidos entran al interior de la célula mediante el transporte activo facilitado. Si el transporte depende de la concentración o actividad, del gradiente entre la célula y su ambiente, este cesa cuando la concentración interna del químico iguala la concentración externa, entonces diremos que el transporte ocurre por difusión. En algunos casos la cinética del transporte indica especificidad por ciertas configuraciones moleculares, y una mayor velocidad de incorporación, que no puede aumentar por cambios posteriores en la concentración externa de la sustancia química (Cole, y Kendrick, 1981).

El mecanismo de adsorción de las células está determinado en gran medida por la naturaleza y composición bioquímica de la pared celular, que en los hongos tiene varias funciones; actúa como un filtro controlando las secreciones de los metabolitos y otras sustancias producto del metabolismo secundario, así como la absorción de nutrientes y otras sustancias al interior de las células. Las paredes celulares también protegen a los hongos contra daños que pueden causar los factores externos (Kuhn, J.P. *et al.*, 1990).

Se ha estudiado el mecanismo de acción de algunos antibióticos sobre ciertas especies fitopatógenas, a continuación se mencionan algunos ejemplos:

Cicloheximida. Antibiótico antifúngico conocido como Actidiona es producida por Streptomyces griseus. Siegel y Sisler, (1964) demostraron que la cicloheximida no afecta la activación de los aminoácidos o la unión de los aminoácidos al RNA soluble. Ellos sugieren que el antibiótico inhibe la transferencia de la aminoacil-RNA soluble a los ribosomas y la formación del enlace peptídico.

Griseofulvina . Es producida principalmente por Penicillium griseofulvum Diercks., de donde inicialmente se aisló, aunque también la producen al menos otras cinco especies más de Penicillium. La griseofulvina muestra acción fungistática contra Basidiomycetes, Ascomycetes, Hongos Imperfectos y ciertos Phycomycetes, causando achaparramiento, ramificación excesiva y deformación de las hifas. La mayoría de los hongos que poseen quitina como principal constituyente de la pared celular, parecen ser más sensibles a la griseofulvina, mientras que los hongos que pertenecen al orden Oomycetes, con pared celular constituida de celulosa no fueron deformados por el antibiótico. En las especies de Botrytis sólo las zonas de la pared celular de reciente formación fueron afectados por el antibiótico y no así las paredes de las hifas que ya habían madurado, por lo cual se sugiere que la griseofulvina produce sus efectos interfiriendo con la biosíntesis de los elementos quitinosos de la pared celular, hay sin embargo, algunas especies de hongos con pared celular de quitina que no muestran respuesta ante la griseofulvina (Dekker, 1978).

Frecuentina y Palitantina. Antibióticos clasificados por Dekker, en (1978) quien los incluye dentro del grupo de los compuestos Alicólicos, son producidos por varias especies de Penicillium aunque principalmente por Penicillium frequentans, de donde originalmente fueron aislados, ambos son activos contra un gran número de hongos imperfectos, sin embargo, aún no se conoce su mecanismo de acción.

- CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS.

Debido a la necesidad de realizar una clasificación sistemática de tan gran número de compuestos heterogéneos, Waksman y Lechevalier, (1962) desarrollaron claves para su clasificación, las cuales se basan en la combinación de las características químicas y biológicas que son muy útiles para caracterizar las preparaciones de antibióticos como son, su punto de fusión, punto de ebullición, coloración, entre otros.

Biológicamente, las únicas características que tienen en común son su actividad antifúngica y el hecho de que las producen los microorganismos. Químicamente son, casi, tan diversos como los organismos que los producen; sin embargo, en la mayoría de los casos su estructura química aún no se conoce con detalle, aunque su complejidad varía desde compuestos simples hasta proteínas complejas. Estos autores proponen separar a los antibióticos con base en su

actividad biológica y posteriormente con base en sus propiedades físicas y químicas, tales como el color, la solubilidad en diversos solventes, la absorción en el espectro luminoso, y recientemente se ha utilizado su estructura química para clasificarlos.

Los antibióticos con propiedades antifúngicas difícilmente se pueden considerar como un grupo, ya que constituyen una amplia gama de sustancias que se relacionan remotamente entre sí.

Las sustancias metabólicas de origen microbiano que sólo muestran una débil actividad antimicrobiana, si no presentan actividad contra los hongos, de acuerdo a lo que Waksman llama " Concentraciones muy diluidas, en el orden de $\mu\text{g/ml}$ " y que principalmente sólo ejercen actividad antibacteriana, tales como la penicilina, cloramfenicol, las tetraciclinas y las eritromicinas, no deben ser considerados dentro de los antibióticos con actividad antifúngica (Dekker, 1978).

- ALGUNOS ORGANISMOS QUE PRODUCEN ANTIMICROBIANOS.

El descubrimiento de microorganismos productores de sustancias con propiedades antimicrobianas abre un nuevo camino en la investigación y el control de las enfermedades causadas por organismos fitopatógenos (Pusey y Wilson, 1984).

En 1947 Spray y Roberson, aislaron y estudiaron la sustancia activa que produce P. frequentans y observaron que presentaba propiedades antimicrobianas al ensayarla contra otros hongos.

En 1947 Polock, aisló la sustancia activa que produce P. vesiculosum, posteriormente se demostró que ambas sustancias eran idénticas y se les dió el nombre de ácido frecuéntico. Este ácido forma cristales amarillo oscuro, su punto de fusión es de 155 °C y es ópticamente inactivo; al parecer tiene la siguiente fórmula empírica $C_6 H_6 O_3$. Es muy soluble en cloroformo y agua, e insoluble en benceno o hexano, se disuelve con rapidez en una solución de carbonato de sodio, es estable en forma ácida o alcalina a 100 °C, da lugar a una coloración verde-oscuro en presencia de cloruro férrico y reacciona con el cloruro de benceno diazonium, lo que indica que tiene un carácter fenólico (Curtis et al., 1951).

Se demostró que el ácido frecuéntico tiene una actividad ligeramente antimicrobiana ya que una dilución de 1 en 8000 impide el crecimiento de Staphilococcus aureus, S. enteriditis, se inhibe con una dilución de 1 en 500, pero Escherichia coli, Corynebacterium diphtheriae y Streptococcus haemolyticus no se vieron afectados con una dilución de 1 en 250 (Florey y Brian, 1949).

Más tarde Banier, en (1950) aisló un producto metabólico a partir de P. frequentans y P. vesiculosum Bain., este metabolito es ligeramente antimicrobiano, al cual describió y nombró ácido frecuéntico. Este compuesto era de color amarillo y desarrollaba un color verde intenso al reaccionar con el cloruro férrico, se observó que su composición química era similar a la citromicetina $C_{14} H_{10} O_7 \cdot 2H_2O$, un producto metabólico de P. frequentans muy bien conocido. No obstante, ambos compuestos diferían en otras propiedades físicas y químicas, por ejemplo, en la fórmula empírica $(C_6 H_5 O_3)_n$, en el punto de fusión $155\text{ }^\circ\text{C}$ y la estabilidad al reaccionar con agentes hidrolíticos; aunque comparten la mayoría de sus características, lo que sugiere que la citromicetina y el ácido frecuéntico corresponden al mismo compuesto (John y Brian, 1951).

Brian y Hemming en (1947), realizaron recristalizaciones continuas en etanol, los cristales de ácido frecuéntico se secaron a $100\text{ }^\circ\text{C}$ y se fundieron a $155\text{ }^\circ\text{C}$, sin embargo, su fusión ocurrió entre 290 y $300\text{ }^\circ\text{C}$ con un considerable ennegrecimiento.

Por otra parte, estos mismos autores encontraron en una muestra que se secó al vacío y a $150\text{ }^\circ\text{C}$, la siguiente composición química: C = 57.9 %, H = 3.6%; el cual se calculó para $C_{14} H_{10} O_7$, C = 57.9, H = 3.5%. El peso equivalente de una muestra de ácido frecuéntico que se secó al aire, se calculó por medio de una titulación potenciométrica, la que fue de 162, calculado por $C_{14} H_{10} O_7 \cdot 2H_2O$, 163 de un ácido dibásico.

La determinación del punto de fusión de la mezcla que contenía ácido frecuéntico mostró el mismo comportamiento, sin embargo, ésto no podía ser tomado como una evidencia decisiva para la identificación de las sustancias. Aunque el espectro de absorción de infrarrojo, fue idéntico en la región de 3-14 μ para ambas sustancias.

El ácido frecuéntico y la citromicetina dieron una solución anaranjada la que viró a una coloración verde fluorescente cuando se añadió ácido sulfúrico concentrado; además ambos compuestos redujeron rápidamente el nitrato de plata amoniacal en frío. Al disolver ácido frecuéntico en ácido sulfúrico 2N durante ocho horas, se convirtió en citromicetina que presenta un punto de fusión a 290 °C con un ennegrecimiento previo, esto concuerda con los resultados que obtuvo Freeman, en (1948) pues una muestra de citromicetina ennegreció a 260 °C y se descompuso entre los 290 y 300 °C; lo que resulta en la generación de un intenso color pardo cuando se añade cloruro férrico (John y Brian, 1951).

Al realizar los ensayos para determinar la actividad antimicrobiana del ácido frecuéntico y de la citromicetina en el crecimiento de Staphylococcus aureus, se observaron zonas de inhibición de 25 y 26mm de diámetro respectivamente (John y Brian, 1951).

- FRECUENTINA Y PALITANTINA

A)- DESCUBRIMIENTO, ESTUDIOS PIONEROS Y ESTRUCTURA QUIMICA.

El primer trabajo lo realizaron Birkinshaw y Raistrick, en (1936) y encontraron que la palitantina es un metabolito de P. frequentans y de otras especies afines. Curtis et al., (1951) aislaron la frecuentina, (Figura 3 a), a partir de P. frequentans y la palitantina a partir de P. palitans Westling (Birkinshaw y Raistrick, 1936).

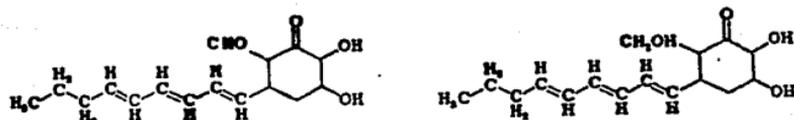
En 1959 Bowden et al., determinaron la fórmula molecular y la configuración de la palitantina (Figura 3 b). Recientemente se demostró que la frecuentina es deshidropalitantina en la cual el grupo $-CH_2-OH$ se reemplaza por $-CHO$ (Grove y Tidd, 1963).

En 1936 Birkinshaw y Raistrick, al describir el aislamiento de la palitantina a partir de P. palitans, mencionan la existencia de un ácido dextrorrotatorio.

Por otra parte Birkinshaw, (1952) recalco que el ácido dextrorrotatorio fue muy probablemente idéntico a la frecuentina, lo cual se estableció por medio de la determinación del espectro de infrarrojo de ambas sustancias.

La palitantina y la frecuentina tienen en común un grupo aldehído y un doble enlace etilénico y tres hidrógenos activos, pero la primera se distingue de la segunda por la presencia de un hidróxilo enólico. Curtis y Duncanson, (1952) presentan la evidencia de que los esqueletos de carbono y las posiciones de los átomos de oxígeno son idénticos.

La frecuentina ($C_{14}H_{20}O_4$), tiene una banda de absorción a 1732 cm^{-1} , con un pequeño pico cerca de los 1720 cm^{-1} , mientras que, la palitantina tiene una banda a 1718 cm^{-1} , ésto junto con la evidencia química, indican que sólo que los grupos carbonilo estén formando parte de un anillo forzado, no están conjugados con otros dobles enlace (Curtis y Duncanson, 1952).



(a) Frecuentina

(b) Palitantina

Figura 3. Estructura química de los antibióticos frecuentina y palitantina.

B).- PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

En 1936 Birkinshaw y Raistrick, encontraron que la palitantina contiene un grupo carbonilo activo, considerado como aldehído, al hacerla reaccionar con el reactivo de Doecevre, ioduro de mercurio potásico alcalino, dió por oxidación ácido palitántico $C_{14} H_{22} O_6$. La reducción catalítica de la palitantina formó tetrahidropalitantina, la cual conserva la función original del carbonilo y se oxidó formando ácido tetrahidropalitántico; la palitantina, sin embargo, contiene 2 enlaces etilénicos y un anillo carbocíclico (Bowden *et al.*, 1959).

La frecuentina (fig. 3a.), cristaliza en forma de agujas incoloras las cuales se funden a $134.5^{\circ} C$ (se descompone) a $[\alpha]^{20}_{5481} + 82^{\circ}$ en $CHCl_3$, lo que da como resultado un aceite amarillento. Carece de nitrógeno, azufre, o halógenos no produce cenizas después de la combustión y es ópticamente activa. El microanálisis del material que se recristaliza tres veces a partir de benceno y tres veces a partir de agua, indica que la molécula contiene las siguientes cantidades de carbono e hidrógeno: C=66.6, 66.4, 66.3; H=7.9, 8.0, 8.2; peso molecular (Rast.) 238; $CH_3-(C)$ (Kuhn y Roth, 1958) 5.7; activo H=1.15 OMe, nil. C=66.6; H=8.0; peso molecular 252; $CH_3-(C)$ =5.9 por 1; hidrógeno activo = 1.2 por 3.

Es muy soluble en acetona y dioxano, menos soluble en cloroformo etanol y benceno es ligeramente soluble en tetracloruro de carbono y agua. El compuesto es marcadamente surfactante; hace espuma fácilmente en solución acuosa y decolora una solución de bromuro en ácido acético glacial.

La frecuentina es un aldehído, reduce el óxido de plata amoniacal y da positiva la prueba de Schiff; no libera dióxido de carbono de una solución de bicarbonato de sódio. La frecuentina da un color magenta en presencia del cloruro férrico (Curtis et al., 1951).

C).- ESTUDIOS EN ALGUNOS HONGOS.

En 1988 De Cal A., realizó un estudio en el cual extrajo las fracciones 3, 4 y 5 del medio de cultivo líquido en Papa/Dextrosa de P. frequentans. Este autor observó que las fracciones 4 y 5 fueron las más tóxicas con mayor actividad antimicrobiana, ya que inhibieron el crecimiento de 14 de los 22 hongos fitopatógenos que ensayó.

Algunos de los hongos fitopatógenos probados por éste autor son los siguientes: Botrytis cinerea Pers. ex Fr., Fusarium oxysporum Schlecht., Monilinia laxa (Aderh et Ruhl) Honey, Cladosporium cucumerinum Ellis & Arth., Verticillium dahliae Klebahn, Alternaria alternata (Fr.) Keissler, Rhizopus stolonifer (Ehrenb. ex Fr.) Lind., Trichoderma viride Pers. y otras especies más.

- CONTROL BIOLÓGICO.

Desde el siglo pasado, se ha intentado hacer uso de los organismos que parasitan o actúan como antagonistas, mediante la producción de sustancias tóxicas contra los fitopatógenos, como un medio de control de las enfermedades de las plantas (Bauer, 1987). El control biológico, como fué definido por Garrett, (1965) involucra la reducción de la enfermedad a través de la mediación de uno o más organismos vivos, excluyendo al hospedero o al hombre. En la mayoría de los casos el ambiente es alterado para favorecer el efecto de los organismos vivientes en el ecosistema. El estudio de la microbiología agrícola se ha difundido en años recientes y una de las áreas de interés particular ha sido el control biológico, este trata de combinar la manipulación de los factores edáficos y microclimáticos con la agricultura, la reproducción de las plantas y la intervención directa con inóculos microbianos para producir el máximo crecimiento o rendimiento de las plantas y disminuir las enfermedades. El control biológico, por supuesto, se originó en los ecosistemas naturales donde en general, una seria enfermedad es la excepción y los patógenos supuestamente han co-evolucionado y existen en balance con sus hospederos vegetales y con los otros microorganismos de su ambiente (Campbell, 1989).

Se han descubierto un gran número de ejemplos de control biológico y probables mecanismos de este. Los mecanismos que actúan a través de un organismo vivo tienen que actuar directamente sobre el patógeno ya sea inhibiendo total o parcialmente su crecimiento o incluso matándolo, lo que se conoce como

"antagonismo", un ejemplo de esto se puede ver en un cultivo dual en agar, en el que Dendrostilbella sp. inhibe el crecimiento de Phymatotrichum omnivorum Shear. También pueden actuar por medio de la intervención del hospedero.

Son tres las categorías clásicas del antagonismo: Antibiosis, Competencia y Explotación (Baker, 1968).

Antibiosis.- El término antibiosis será usado en sentido amplio, para incluir los agentes metabólicos producidos por organismos los cuales tienen efectos dañinos sobre otros.

Algunos fitopatólogos, impresionados por la naturaleza implacable de los compuestos producidos por muchos microorganismos del suelo, están de acuerdo con Jackson, (1965) que la antibiosis de alguna manera juega un papel clave en la Ecología de los microorganismos del suelo. La principal evidencia de que la antibiosis es significativa en el control biológico, descansa sobre correlaciones entre la supresión de la enfermedad, asociada con el incremento en la producción de antibióticos. Mientras estas correlaciones son importantes, la cuantificación del impacto de la antibiosis en el control biológico requiere ser reforzada (Baker, 1968).

Algunos patógenos, especialmente los hongos, al atacar los tejidos vegetales vivos o recientemente cortados, son tolerantes al estrés en estos ambientes frecuentemente secos, bajos en nutrientes y con toxinas de las plantas, tales como gomas y resinas. Sin embargo, muchos de los hongos que degradan la madera son

competitivos y en general hay un amplio rango de estrategias adoptadas por los competidores. Otros patógenos, como los que causan pudriciones de poscosecha, dentro de los que destacan algunos del género Penicillium, producen antibióticos que inhiben o deterioran el desarrollo de los competidores y algunos como Fusarium culmorum pueden infectar aún desde el suelo teniendo una alta habilidad competitiva (Campbell, 1989).

II. OBJETIVOS.

Debido al uso indiscriminado de los pesticidas, nuestro ambiente se esta contaminando en forma gradual y constante, por tal motivo, es necesario desarrollar otras estrategias de control, y el "control biológico" puede resultar como una alternativa del control químico (Pusey y Wilson, 1984).

Por lo anteriormente expuesto surgió la inquietud de desarrollar este trabajo, cuyos objetivos principales son los siguientes:

- 1.- Aislar, purificar e identificar hongos a partir de tejido vegetal enfermo, que sirvan como organismos de ensayo.
- 2.- Producir y extraer los compuestos con actividad antimicrobiana a partir de Penicillium frequentans.
- 3.- Determinar el efecto de los extractos con actividad antifúngica, antibióticos, de P. frequentans, en la germinación de esporas de algunos hongos que pueden ser fitopatógenos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los medios de cultivo que se prepararon para el desarrollo de este trabajo, fueron los siguientes: Papa Dextrosa Agar (PDA), Extracto de Malta Agar (EMA) y Czapek-Dox (con glucosa al 5%). Las formulaciones de los medios de cultivo empleados en el desarrollo del presente estudio se encuentran en el Apéndice 1 (Hanlin y Ulloa, 1988).

- AISLAMIENTO, CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS HONGOS QUE SE OBTUVIERON A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL ENFERMO.

Los diferentes hongos que se utilizaron, se aislaron a partir de tejido vegetal enfermo, tal como: mango Mangifera indica L., fresa Fragaria indica L., manzano Pyrus malus L., naranjo Citrus aurantiacum L., limón Citrus medica L., plátano Musa sp. L., hojas y tallos de durazno Prunus persica Batsch., maíz Zea mays L., papa Solanum tuberosum L., jitomate Lycopersicum esculentum Mill., tomate Physalis aequata Jacq., entre otros (Sánchez, 1968).

Este material biológico se obtuvo de diferentes lugares como: el Jardín Botánico de la UNAM, de salidas al campo (Tlaxcala, Puebla, Cuernavaca y Veracruz), y del Servicio Externo del Lab. de Fitopatología del Departamento de Microbiología del

IPN. El cual se procesó de la siguiente manera: se cortaron pequeños pedazos (de aproximadamente .5 cm²) de tejido vegetal enfermo, los cuales se desinfectaron superficialmente al sumergirlos en una solución de (hipoclorito de sodio al 2 %) durante 2 minutos, lavandose posteriormente con agua destilada estéril (Ulloa y Hanlin, 1978). Posteriormente, las muestras del tejido vegetal se "sembraron" en cajas de Petri de cristal de (90 x 15 mm), con medio de cultivo papa dextrosa agar PDA. Después de la "siembra", las cajas se incubaron en la estufa bacteriológica a 25 °C donde se mantuvieron de 2 a 4 días, hasta que empezaron a aparecer los hongos.

Las colonias de hongos que aparecieron inicialmente en las cajas de Petri, se transfirieron a placas con PDA nuevas. Con la ayuda de una asa bacteriológica, se tomó una fracción del micelio y de esporas de cada una de las colonias que se consideraron mohos diferentes, y se "sembraron" por separado, con el propósito de lograr colonias gigantes puras, después de logradas, se transfirió una fracción a tubos de ensayo de 15 x 2 cm, con medio inclinado de PDA, y se almacenaron a 5 °C para su identificación posterior. El procedimiento de aislamiento se repitió tantas veces como fue requerido.

Los mohos que se aislaron se determinaron con la ayuda de las claves para hongos imperfectos, de Raper y Thom (1949), Barron (1968) y Barnett y Hunter (1985).

Se tuvo especial cuidado en el mantenimiento de las cepas, las que se revisaron periódicamente, para evitar que se perdieran al deshidratarse el agar. Para lo cual los hongos se transfirieron a tubos nuevos con medio inclinado de PDA cada 2 meses aproximadamente. Este procedimiento se repitió el número de veces que fue necesario y cada una de las cepas se conservó por duplicado en tubos con medio inclinado de PDA.

CULTIVO DE Penicillium frequentans, Y PRODUCCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS A Y B.

La cepa original de Penicillium frequentans, cuya clave de cepario y número de colección es (NRRL 6543), fue proporcionada por el Dr. Miguel Ulloa Sosa y el Biól. Calixto Benavides Ocampo del Instituto de Biología de la UNAM, que a su vez les fue donada por el Dr. Wicklow del (Northern Regional Research Laboratory), Laboratorio de Investigación Regional Septentrional de Peoria Illinois, en 1986. Esta fue preservada mediante el método de liofilización, las esporas fueron suspendidas en suero de bovino, y las ampollitas se sellaron al vacío. Se ha reportado que las cepas preservadas por este método han mostrando un vigor relativo después de 8 a 17 años de almacenamiento a una temperatura de 4 a 10 °C, de 363 cepas probadas, 331 fueron viables después de 17 años de liofilización (Hesseltine, 1960).

La cepa se sembró en el medio de cultivo EMA después de 6 años de almacenamiento, presentando un desarrollo excelente y una esporulación abundante. Se sabe que éste hongo produce frecuentina y que esta sustancia causa una disminución en los índices de producción de Zearalenona la que es sintetizada por algunas especies de Fusarium.

El hongo se cultivó y mantuvo en tubos de ensayo con medio inclinado de EMA, y se conservó en refrigeración.

Para la producción del inóculo de P. frequentans, este se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo de EMA, y con la ayuda de un asa bacteriológica, las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 3 días, al cabo de los cuales se cortaron discos de agar de 10 mm de diámetro que contenían micelio y esporas con el fin de lograr un buen inóculo. Los discos de agar se tomaron de la perifería de la colonia, pues es la parte que presenta el crecimiento más activo.

Para la producción de los antibióticos, se prepararon previamente 2 matraces Erlenmeyer de 1000 ml, con 500 ml del medio de cultivo líquido Czapek-Dox con glucosa al 5 % como fuente de carbono. Dichos medios se esterilizaron en el autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos; ya estériles y fríos se inocularon los matraces con ocho discos de micelio cada uno y se incubaron en medios estáticos y en la oscuridad, para evitar el posible efecto inhibitorio de la luz sobre la actividad de los antibióticos, pues algunos autores como Curtis et al., (1951), consideran que estos son foto-activos, para lo cual se cubrieron con papel

de aluminio y así estimular el crecimiento del hongo y la producción de los antibióticos. Dichos matraces se tuvieron a temperatura ambiente entre 20 y 25 °C durante 20 días, ya que es el tiempo en el que se logra el mayor rendimiento de antibióticos (De Cal. A., et al., 1988).

Transcurrido el tiempo de incubación se separó el medio líquido del micelio y las esporas mediante una filtración, a través de papel Whatman Núm. 1, con ayuda de un equipo Millipore. Después de esto, el extracto crudo fué centrifugado a 15000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar los residuos de micelio y esporas, el precipitado se desechó obteniéndose así un extracto crudo libre de residuos celulares (Curtis et al., 1951).

Posteriormente se procedió a esterilizar el extracto mediante filtración a través de membranas de nitrocelulosa, Millipore de 0.45 y 0.22 μm de diámetro de poro.

- EXTRACCIÓN Y PURIFICACION PARCIAL DE LOS ANTIBIÓTICOS.

La extracción y la purificación parcial de los antibióticos, se llevo a cabo mediante la siguiente técnica, propuesta por Birkinshaw, (1952) con modificación hecha por De Cal. A. et al., (1988)(Fig. 4).

Para efectuar la primera extracción se usó cloroformo (1:1, v/v) como solvente. Este procedimiento se realizó con el filtrado crudo en un embudo de separación de 500 ml, de la siguiente manera: el filtrado se depositó en el embudo y sobre el

primero se vertió el cloroformo agitando vigorosamente hasta homogeneizar; luego se dejó reposar durante 5 minutos, para permitir la formación de 3 fases en la solución: (1) una fase acuosa, (2) una interfase y (3) una fase orgánica. Las dos primeras se desecharon y la fracción orgánica se colectó en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml.

La siguiente extracción se realizó con agua destilada (5:1 v/v), cuyo pH se ajustó a 11 con NaOH - 1N. Se agregaron 5 partes de la fase orgánica por una parte de agua, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 3 minutos, para permitir nuevamente la formación de las 3 fases en la solución. Se colectaron por separado, tanto la fracción orgánica 4, como la fracción acuosa.

Después se practicó una destilación simple a la fracción orgánica 4, usando el aparato de destilación que se muestra en la Fig. 5 , con el objeto de extraer y eliminar el cloroformo y así recuperar el antibiótico **B** de la fracción orgánica, el cual se colectó en pequeños viales estériles de cristal de 5 ml, en los que se guardó y refrigeró a 5 °C para utilizarlo más tarde en los bioensayos; la fracción acuosa de la segunda extracción se acidificó a pH 3 ó 4 con HCl 1N y se le practicó una extracción con éter dietílico (1:1, v/v), la fracción orgánica que se formó, en la que se encuentra el antibiótico crudo **A**, se colectó en un vaso de Precipitados de 50 ml, el éter se dejó evaporar hasta que sólo quedó 1 ml de dicha fracción en el vaso, pasándose después a pequeños viales de cristal de 3 ml los que se refrigeraron a 5 °C hasta su uso posterior, la fase acuosa se desechó (Birkinshaw, 1952; De Cal. A. et al., 1988).

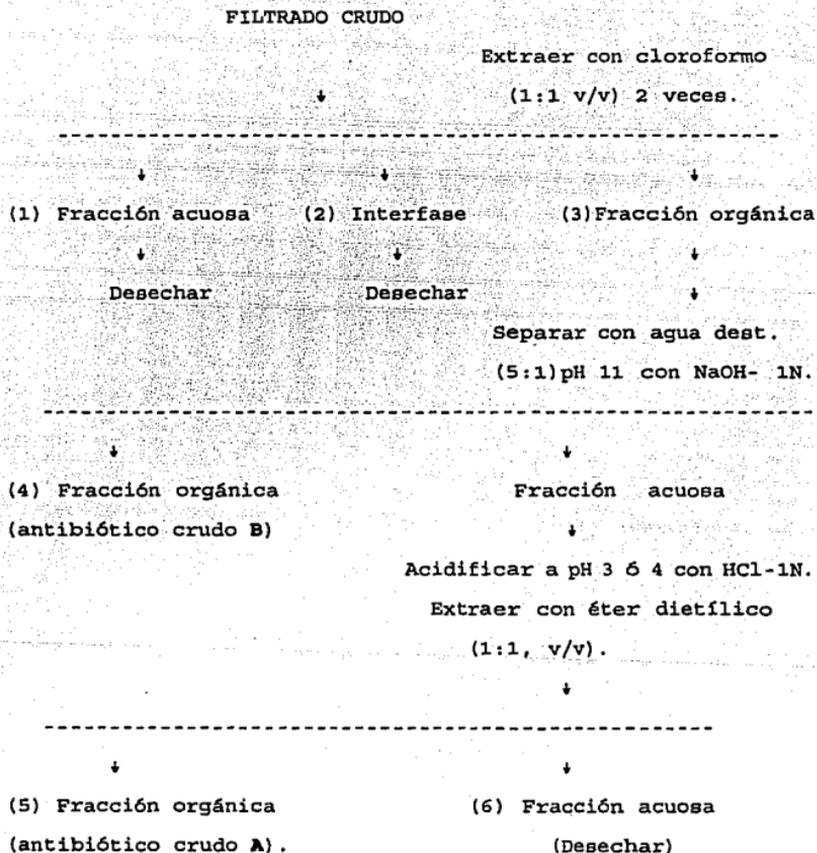


Figura 4. Procedimiento para la extracción y purificación parcial de los antibióticos que sintetiza *E. frequentans*, de acuerdo con Birkinshaw (1952) y con modificación hecha por De Cal. A. *et al.*, (1988).

**ENSAYOS DE LAS FRACCIONES 4 Y 5, ANTIBIÓTICOS A y B
RESPECTIVAMENTE, SOBRE LOS DIFERENTES HONGOS AISLADOS.**

Debido a la imposibilidad de realizar los ensayos con los antibióticos diluidos en todas las cepas que se aislaron, se escogieron al azar 4 hongos para dichos ensayos y fueron los siguientes: Monilinia fructicola, Colletotrichum gramminicola, Alternaria brassicicola y Cladosporium sp., cuyo micelio y esporas se ensayaron contra la acción inhibitoria de los antibióticos A y B (SD) y las diluciones 1/10, 1/100, 1/1,000 y 1/10,000, utilizando éter dietílico como solvente.

Las pruebas *in vitro*, se realizaron en cajas de Petri de cristal de 90 mm de diámetro por 15 mm de profundidad que contenían medio de cultivo PDA, ver (Figura 6 y láminas 1 - 3).

Bomba de recirculación

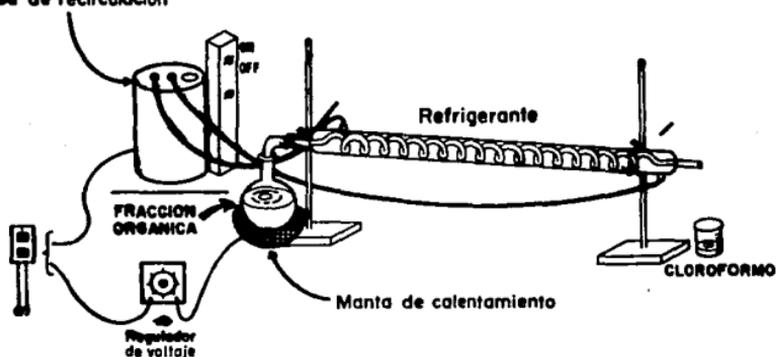


Fig. 5.

Aparato de destilación simple que se utilizó para separar y extraer el cloroformo de la fracción orgánica y así concentrar los antibióticos en el matraz.

De cada uno de los organismos ensayados se preparó una suspensión de micelio y esporas como inóculo, esta se realizó de la siguiente manera: se depositó 1 ml de agua destilada estéril en un mortero también estéril. Posteriormente con un asa bacteriológica se tomó una fracción de micelio y esporas de aproximadamente 4 mm² y se colocó en el mortero donde se mezcló con el agua destilada hasta obtener una suspensión homogénea.

Posteriormente, con una pipeta estéril de 1 ml, se tomó 0.1 ml de la suspensión de esporas y micelio y se depositó en el centro de cada una de las cajas de Petri y a continuación, se vertieron 15 ml de medio de cultivo PDA en forma líquida. Enseguida, se mezcló el inóculo y el agar moviendo las cajas de Petri sobre la mesa del laboratorio de forma circular y opuesta, es decir, moviendo las cajas en el sentido de las manecillas del reloj y en el sentido opuesto de este, con el fin de distribuir el inóculo en todo el medio de cultivo y en todas y cada una de las cajas, las cuales se dejaron reposar hasta que solidificó el agar. Ya solidificado, se impregnó un disco de papel filtro Whatman Núm. 1, de 10 mm de diámetro, con la solución del antibiótico, aproximadamente unos 50 µl de la dilución a probar, el disco se depositó en el centro de las cajas de Petri.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con su lote testigo respectivo, y cada ensayo se repitió 5 veces. El tratamiento control fue un disco de papel filtro que se impregnó con éter dietílico ya que los antibióticos se resuspendieron en 2 ml de este solvente. Posteriormente las cajas de Petri se refrigeraron durante una

hora a 5 °C, con el fin de simular condiciones adversas y romper así la latencia de las esporas al retirarlas del refrigerador e incubarlas a 25 °C, lo que estimula su germinación.

- **CÁLCULO DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ANTIBIÓTICOS.**

Después de un período de incubación a 25 °C, por un lapso de 24 a 48 horas, las cajas se revisaron frecuentemente para observar el desarrollo de los hongos y detectar así la formación del halo de inhibición. Se midieron sus diámetros con una regla transparente, tanto de la parte más ancha como de la más angosta del halo de inhibición del tratamiento (iT). Se calculó la media entre ambas lecturas, y a este valor se le restó el valor del diámetro del halo de " inhibición " del testigo (it), para obtener así la inhibición real (IR), (Fig. 6).

De esta manera se obtuvo el valor promedio de la inhibición real para cada tratamiento, y para cada uno de los organismos que se ensayaron.

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los valores de los halos de inhibición que presentaron las diferentes especies de hongos que se ensayaron ante el efecto de los antibióticos A y B , se procesaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANDEVA) manualmente y con

la ayuda de los programas Epistat y Statgrafics. La separación de medias, o diferencias singificativas mínimas, se determinaron mediante la prueba de Tukey, en el apéndice 2, aparecen las fórmulas utilizadas en las pruebas estadfsticas (Little y Hills, 1976; Castañeda, 1980).

El análisis de varianza, ANDEVA, que desarrolló Fisher en 1962, es una técnica que permite determinar la variación total que esta presente en un conjunto de datos; se divide en varios componentes, a cada uno de los cuales se asocia una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total (Little y Hills, 1976; Márquez, 1988).

Con el fin de detectar estadísticamente si el efecto de los antibióticos sobre los hongos ensayados es significativo se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis nula.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

Las diferencias observadas son debidas al azar, es decir, los antibióticos A y B (extractos crudos), o sea, las fracciones 4 y 5 respectivamente, no causan ningún efecto sobre las esporas de los hongos ensayados.

Hipótesis alternativa.

$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$ (o al menos un par de ellas son diferentes).

Las diferencias observadas no son debidas al azar, sino al efecto de los antibióticos **A** y **B** (extractos crudos) sobre la germinación de las esporas de los hongos ensayados, es decir, las fracciones 4 y 5 sí son efectivas.

IV. RESULTADOS

- IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.

Los 32 mohos que se aislaron a partir de diferentes sustratos, se presentan en la tabla 1., de los cuales podemos observar que la mayoría de géneros (19) se encuentran dentro de la Subdivisión Deuteromycotina. Todos éstos géneros de mohos están considerados por la literatura como hongos fitopatógenos (Webster, 1980; Cova 1988), pues algunas de sus especies pueden causar daño a las plantas; sin embargo, aunque se aislaron de material vegetal enfermo, como ya se mencionó con anterioridad, no se realizaron pruebas de patogenicidad para poder confirmar los postulados de Koch y por ende el efecto fitopatógeno de los hongos aislados.

- PRODUCCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS A y B.

El hongo Penicillium frequentans, produjo 2 sustancias antifúngicas, las cuales inhibieron en mayor o en menor grado la germinación de las esporas de 29 aislamientos diferentes de mohos de los 32 que se ensayaron. La producción de las sustancias antifúngicas se detectó a los 10 días de la incubación y la máxima producción se alcanzó a los 20 días, cuando el filtrado crudo inhibió la germinación de las esporas de los diferentes hongos (De Cal. A. et al., 1988).

Tabla 1. Ubicación taxonómica, según Herrera y Ulloa (1990), de los organismos que se aislaron a partir de diferentes sustratos vegetales y se determinaron hasta nivel de especie, con la ayuda de las claves.

REINO FUNGI					
DIVISION EUMYCOTA					
Subdivisión	orden	Familia	Género y sp.	Hospedero o sustrato	
PHYCOMYCOTINA	Peronosporales	Pythiaceae	<i>Pythium</i> sp.	Fresa	
	Mucorales	Mucoraceae	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb. ex Fr.) Lind.	Fresa, Manzana	
DEUTEROMYCOTINA	Sporobolomycetales	Sporobolomycetaceae	<i>Heterosporia</i> sp.	Duraznero	
	Moniliales	Agonomycetaceae	<i>Rhizoglyphis</i> sp.	Fresa	
		Moniliaceae	<i>Aspergillus flavus</i> Link ex Fr. <i>Aspergillus niger</i> Van Tieghem <i>Sclerotinia cinerea</i> Pers ex Fr. <i>Sclerotis zilli</i> Pers ex Fr. <i>Penicillium italicum</i> Link. <i>Dematium frequentans</i> Mesling <i>Penicillium</i> sp. <i>Trichoderma viridide</i> Pers. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Verticillium dahliae</i> Kiebahn	Maíz Maíz Fresa Fresa y Manzana Naranja y Limón Naranja y Limón Duraznero Duraznero y Manzana Tomate y Papa	
		Dematiaceae	<i>Alternaria brassicicola</i> Mees. <i>Alternaria solani</i> ETT. et G. Martin <i>Sclerotinia</i> sp. <i>Cleosporium</i> sp. <i>Botrytis bonariensis</i> Sacc. <i>Botrytis oblonga</i> Zimm. <i>Pithecolobium</i> sp.	Col y coliflor Cilantro y Tomate Plátano Duraznero y Tomate Duraznero Maíz Duraznero	
		Tuberculariaceae	<i>Fusarium oxysporum</i> Sutr. y Jaim. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlect.	Mango Jitomate y Papa	
		Melanconiales	Melanconiaceae	<i>Colletotrichum gramminicola</i> Corda <i>Asiatotia musillerae</i> de Toll.	Maíz Mango
		Sphaeropsidales	Sphaeropsidaceae	<i>Phoma pithe</i> Sacc.	Duraznero y Tomate
	ASCOMYCOTINA	Helotiales	Sclerotiniaceae	<i>Monilia fructicola</i> Wint. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Libert. <i>Sclerotinia</i> sp.	Duraznero Papa Jitomate
	BASIDIOMYCOTINA	Ustilaginales	Ustilaginaceae	<i>Ustilago maidis</i> (D.C.)	Maíz

El filtrado crudo se esterilizó en el autoclave a 15 Lbs de presión durante 15 min y a 120 °C, observándose que la actividad antimicrobiana de las sustancias producidas por *P. frequentans* no es afectada por el calor, a esta temperatura.

**ENSAYOS O PRUEBAS DE ANTAGONISMO *in vitro* DE LOS ANTIBIÓTICOS
CONCENTRADOS A Y B, Y LA DETERMINACIÓN DE SU ESPECTRO
ANTIFÚNGICO.**

Los ensayos que se realizaron para establecer la toxicidad de los antibióticos A y B, es decir, las fracciones 4 y 5 (SD) (ver lámina 1-3), mostraron que estas fueron las más tóxicas, y mucho más activas que el filtrado crudo, ya que inhibieron la germinación de las esporas de la mayoría de los 32 hongos ensayados, lo anterior se resume en la (tabla II). Los resultados de los ensayos que se realizaron con los antibióticos diluidos y (SD) sobre los hongos: Monilinia fructicola, Colletotrichum gramminicola, Alternaria brassicicola y Cladosporium sp., se muestran en la Tabla III, y en la figura 7.

Es importante mencionar que la mayoría de las especies ensayadas en este trabajo no se han probado anteriormente contra el efecto antimicrobiano de las fracciones 4 y 5, estas especies aparecen señaladas con un asterisco (*) para ubicarlas fácilmente.

Tabla III. Valores promedio de los diámetros o zonas de inhibición que produjeron los antibióticos A y B (SD) y en forma diluida sobre el crecimiento de cuatro especies de hongos fitopatógenos.

Especies de mohos	Valor promedio del diámetro o zonas de inhibición, (mm).		Diluciones
	Antib. A	Antib. B	
<u>Alternaria brassicicola</u>	34.4	40.8	SD
	23.5	29.7	1/10
	12.5	18.5	1/100
	3.1	9.2	1/1,000
	-	-	1/10,000
<u>Colletotrichum gramminicola</u>	29.4	42.2	SD
	22.0	30.6	1/10
	15.7	19.8	1/100
	8.3	10.0	1/1,000
	-	-	1/10,000
<u>Cladosporium sp.</u>	33.4	35.5	SD
	23.8	25.5	1/10
	11.5	13.7	1/100
	3.4	5.1	1/1,000
	-	-	1/10,000
<u>Monilinia fructicola</u>	42.2	42.4	SD
	29.1	33.4	1/10
	18.4	21.6	1/100
	8.3	10.2	1/1,000
	-	-	1/10,000

Como se puede apreciar en la figura 7, los antibióticos **A** y **B** en las diluciones de 1/10 y 1/100, aún inhiben parcialmente la germinación de las esporas de los hongos ensayados. Sin embargo, las diluciones de 1/1,000, y 1/10,000, prácticamente no causan ningún efecto de inhibición.

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis de varianza (ANDEVA) indicó que la diferencia entre los promedios de los halos de inhibición de los hongos que se ensayaron con los antibióticos **A** y **B** sin diluir, son estadísticamente significativos. Como se observa en la tabla IV, los valores de **F** observados indican una significancia alta (**p 99%**) para todas las especies y para ambos antibióticos, por lo tanto las diferencias que se observaron se deben al efecto de los antibióticos y no al azar.

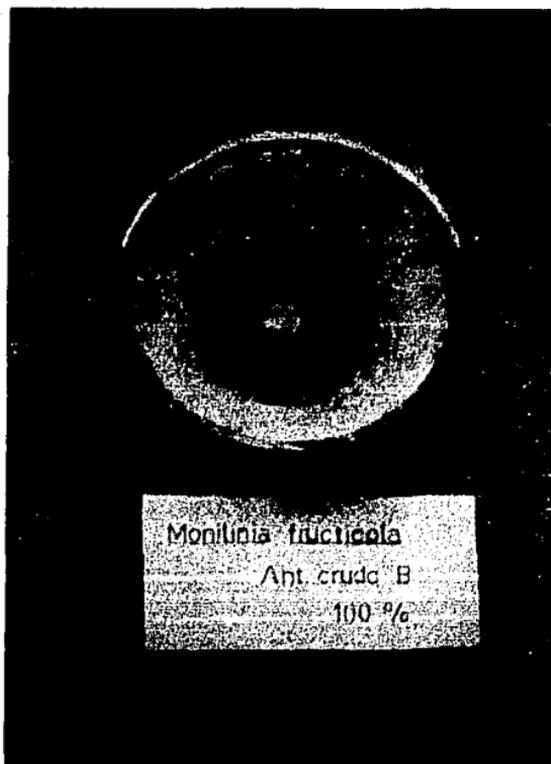


Lámina 1 Efecto inhibitorio del antibiótico concentrado B sobre Monilinia fructicola

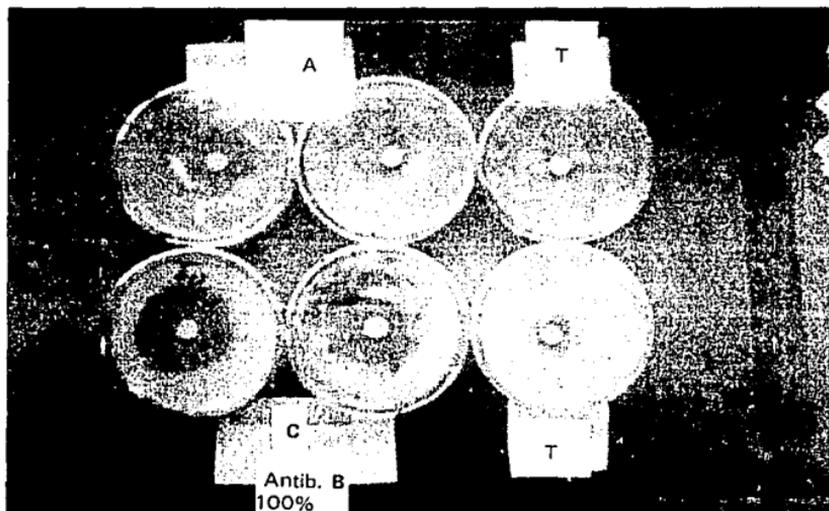


Lámina 2 Efecto inhibitorio del antibiótico concentrado **B** sobre (A) Collectotrichum graminicola, testigo (T) y (C) | Monilinia fructicola.

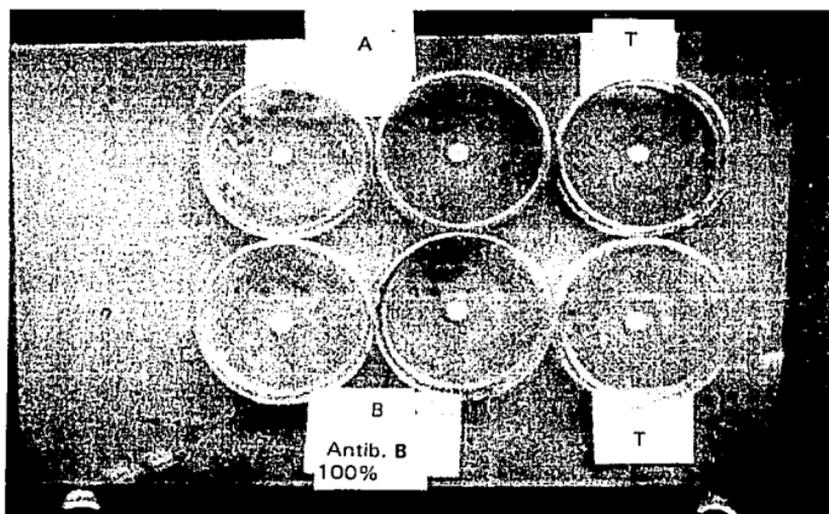


Lámina 3 Efecto inhibitorio del antibiótico concentrado B sobre (A) Cladosporium sp., (B) Alternaria brassicicola y (T) Testigo.

Tabla IV. Análisis de varianza para el efecto del antibiótico A en el crecimiento de hongos fitopatógenos. Valores de F calculada; F tabulada y p para cada una de las especies que se ensayaron.

Especie	Valor de F Calculada	F Tabulada		Valores de p	
		$\alpha .05$	$\alpha .01$	$\alpha .05$	$\alpha .01$
<u>M. fructicola</u>	421.5	5.32	11.26	p > 95 %	p > 99 %
<u>C. gramminicola</u>	172.22	5.32	11.26	p > 95 %	p > 99 %
<u>A. brassicicola</u>	142.20	5.32	11.26	p > 95 %	p > 99 %
<u>Cladosporium sp.</u>	462.2	5.32	11.26	p > 95 %	p > 99 %

Tabla V. Análisis de varianza para el efecto del antibiótico B en el crecimiento de hongos fitopatógenos. Valores de F calculada; F tabulada y p para cada una de las especies que se ensayaron.

Especie	Valor de F Calculada	F Tabulada		Valores de p	
		$\alpha .05$	$\alpha .01$	$\alpha .05$	$\alpha .01$
<u>M. fructicola</u>	144.36	5.32	11.26	p > 95 %	p > 99 %
<u>C. gramminicola</u>	523.50	5.32	11.26	p > 95 %	p > 99 %
<u>A. brassicicola</u>	472.78	5.32	11.26	p > 95 %	p > 99 %
<u>Cladosporium sp.</u>	630.25	5.32	11.26	p > 95 %	p > 99 %

SEPARACION DE MEDIAS.

Tratamiento: Antibiótico A.

sp1	sp2	sp3	sp4

Tratamiento: Antibiótico B.

sp3	sp1	sp2	sp4
-----		-----	

La separación de medias muestra el efecto interespecífico de los antibióticos **A** y **B** en el crecimiento de los mohos.

Las especies corresponden a: 1 Alternaria brassicicola, 2 Monilinia fructicola, 3 Colletotrichum gramminicola, 4 Cladosporium sp., respectivamente.

Cuando una línea une o conecta a dos especies, significa que el efecto inhibitorio de ambos antibióticos de manera independiente sobre las especies ensayadas, no es significativamente diferente en el nivel de significancia de .05 %, es decir, las especies unidas por una línea presentan casi el mismo promedio del valor del efecto inhibitorio causado por los antibióticos.

V. DISCUSIÓN

La producción de los antibióticos **A** y **B** por Penicillium frequentans en Czapek-Dox con glucosa al 5% en cultivo estacionario, tiene lugar después de 10 días de incubación, y alcanza la producción máxima a los 20 días aproximadamente; sin embargo, la actividad de los antibióticos disminuye con el paso del tiempo, lo que se puede deber a varios factores, entre los que destacan: la descomposición natural, la disminución de la tasa de biosíntesis, el incremento de la tasa del catabolismo de los mismos por el hongo, los cambios en el pH del medio, envejecimiento del cultivo etc. (Curtis et al., 1951; De Cal. A. et al., 1988).

Después de esterilizar el extracto crudo, los antibióticos se extrajeron a partir de éste y se ensayaron contra las esporas de los diferentes hongos que se aislaron y clasificaron para tal efecto.

Al ensayar las fracciones 4 y 5 del filtrado crudo, antibióticos **B** y **A** respectivamente, para determinar si poseen actividad inhibitoria contra la germinación de las esporas de diferentes hongos se pudo comprobar que éstos compuestos sí tienen actividad antifúngica, ya que fueron activos contra 29 de las 32 especies de hongos que se ensayaron, la mayoría de ellos considerados fitopatógenos por la literatura (Tabla II) (Cova, 1988; Webster, 1980).

En la tabla II aparece el valor promedio del diámetro del halo de inhibición, de 5 repeticiones realizadas para cada ensayo, y para cada una de los 32 hongos. El tamaño de la zona o halo de inhibición, indica la actividad relativa de los antibióticos.

Como puede apreciarse en dicha tabla el diámetro de las zonas de inhibición que produjeron los antibióticos A y B sin diluir, fluctuó entre los 2.5 y 54.9 mm.

Los ensayos de laboratorio mostraron que los antibióticos en forma concentrada inhibieron la germinación de las esporas de la mayoría de los hongos ensayados.

Las especies de mohos que resultaron más sensibles al efecto inhibitorio de los antibióticos fueron las siguientes: Aspergillus niger - Este organismo presentó una fuerte inhibición de la germinación. El antibiótico A sin diluir, produjo en esta especie una zona de inhibición de 41.3 mm de diámetro, mientras que la del antibiótico B fue de 54.9 mm. En Trichoderma viridae el valor promedio de la zona de inhibición fue de 45 mm con el antibiótico A, y con el antibiótico B de 54.2 mm de diámetro. Y Verticillium dahliae presentó también una fuerte inhibición; el antibiótico A formó un halo de inhibición de 42.4 mm, y el B produjo una zona de inhibición de 54.2 mm.

Además se observó que los antibióticos A y B sin diluir no ejercieron efecto inhibitorio en 3 de las 32 especies que se ensayaron. Las colonias de mohos como

Aspergillus flavus, Rhizopus stolonifer, Cladobotrium sp., crecieron profusamente en toda la caja de Petri, sin presentarse el efecto inhibitorio causado por los antibióticos.

Aspergillus flavus fue una de las especies más resistentes a la acción inhibitoria de los antibióticos A y B, esto coincide con los resultados que obtuvo García Aguirre, (1985) en cuyo trabajo, se probaron 18 fungicidas convencionales de uso frecuente, como el Captafol, el Clorotalonil, el Benomil, el Captan, el Zineb, el Maneb etc., sobre diferentes especies de Aspergillus, en donde A. flavus fue la especie más resistente a la acción inhibitoria de los fungicidas. Sin embargo hay que hacer notar que éstos fungicidas son de origen químico.

Los antibióticos A y B son termoestables a las temperaturas que van desde los 25 a los 120 °C, de acuerdo con A. de Cal et al., 1988, pues el extracto crudo se esterilizó en el autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos y a una temperatura de 120 °C.

Al comparar los ensayos se observó que los antibióticos que se esterilizaron en el autoclave, producen el mismo efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de los hongos que se ensayaron, que el que producen aquellos que se esterilizaron a través de membranas Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro.

La acción de los antibióticos se puede considerar como fungistática (Curtis, 1951), ya que al paso del tiempo el diámetro de la zona o halo de inhibición

disminuye, y la colonia crece hacia el disco de papel, es decir, hacia el centro de las cajas de Petri. Esto se debe a que al paso del tiempo los antibióticos pierden su actividad antifúngica, aunque también podría deberse a una respuesta adaptativa por el hongo. Según De Cal. A. *et al.*, (1988) después de 70 días, el antibiótico **A** perdió casi toda su actividad (90- 95 %), mientras que el antibiótico **B** aún conserva el 30 % de su actividad sobre el crecimiento del tubo germinativo, en las esporas ensayadas.

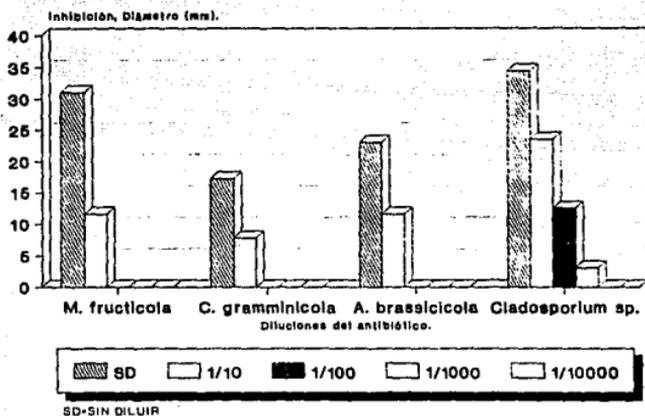
De acuerdo con De Cal. A. *et al.* (1988) y Curtis *et al.* (1951), las fracciones 4 y 5, o antibióticos **A** y **B** que se purificaron parcialmente y se resuspendieron en éter etílico, fueron las que presentaron la mayor actividad antifúngica, ver (figs. 7 y 8).

Al ensayar los antibióticos **A** y **B** sin diluir (SD) y las diluciones 1/10, 1/100, 1/1,000 y 1/10,000 para establecer el límite mínimo de actividad, se observó que las diluciones 1/10, 1/100, y los antibióticos concentrados (SD) son los que producen el mayor halo de inhibición. En las diluciones 1/1,000 y 1/10,000 prácticamente no se observa ningún efecto de inhibición.

Aparentemente los compuestos antifúngicos son tóxicos a las esporas ya que evitan su germinación, y el crecimiento de los tubos germinativos, sin embargo, el mecanismo de acción aún no se conoce (De Cal. A. *et al.*, 1988).

Las fracciones 4 y 5, presentaron fuertes propiedades antifúngicas contra la mayoría de los hongos que se ensayaron, muchos de ellos considerados como fitopatógenos, aunque cabe mencionar que no se realizaron pruebas de patogenicidad para corroborar lo anterior.

INHIBICIÓN INTERESPECÍFICA DE LAS
ESPECIES ENSAYADAS, POR EL ANTIBIÓTICO
A.



INHIBICIÓN INTERESPECÍFICA DE LAS
ESPECIES ENSAYADAS, POR EL ANTIBIÓTICO
B.

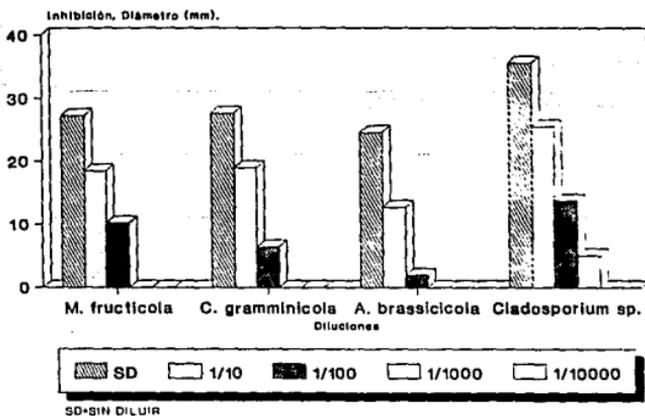


Fig. 7

Efecto de los antibióticos A y B sin diluir (SD) y las diferentes diluciones en el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos. Las diluciones se realizaron con éter etílico.

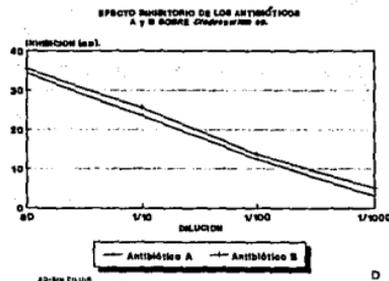
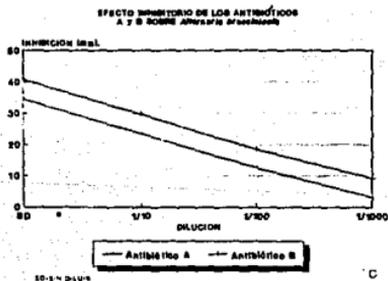
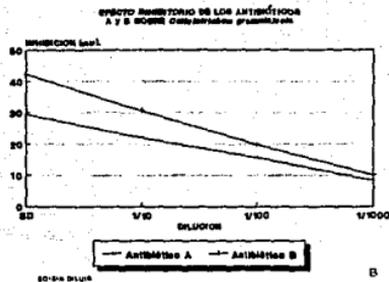
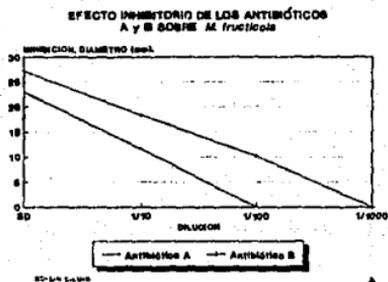


Fig. 8

Efecto de diferentes diluciones de los antibióticos A y B en el crecimiento de (A) *M. fructicola*, (B) *C. graminicola*, (C) *A. brassicicola* y (D) *Cladosporium* sp.

Por otro lado, podemos postular que el mecanismo de antibiosis de estos compuestos podría ser efectivo en el control biológico de hongos fitopatógenos, sin embargo, en la práctica la evidencia del mecanismo de antibiosis en la naturaleza es poco conocido, por lo que se deben realizar una mayor cantidad de estudios en el laboratorio, y sobre todo en el campo, para conocer el efecto de los factores ambientales sobre los antibióticos, y su comportamiento ante estas condiciones. De tal manera que podamos establecer así su efectividad real sobre los hongos fitopatógenos.

El efecto de ciertas sustancias antifúngicas como los antibióticos, los fungicidas entre otros, sobre la germinación de las esporas y el desarrollo de los hongos fitopatógenos, está hasta cierto punto determinado por la susceptibilidad intrínseca de las especies a estas sustancias. Es sabido que algunos organismos son altamente resistentes a la acción inhibitoria de ciertos antibióticos o compuestos antifúngicos, algunos son moderadamente resistentes, mientras que otros son completamente sensibles a los mismos compuestos, esto se debe en gran parte a la manera en que los hongos absorben estas sustancias, y si tienen o no mecanismos de desintoxicación. Las especies altamente resistentes absorben las sustancias antifúngicas muy lentamente y presentan mecanismos de desintoxicación, mientras que los que son sensibles absorben los antibióticos muy rápido y no presentan mecanismos de desintoxicación.

El mecanismo de adsorción de las células está determinado en gran medida por la naturaleza y composición bioquímica de la pared celular (Kuhn, J.P. *et al.*, 1990).

La mayoría de los hongos que poseen quitina como principal constituyente de la pared celular, son más sensibles a ciertos antibióticos como la griseofulvina, mientras que los hongos que pertenecen al orden Qomycetes, con pared celular constituida de celulosa no fueron afectados por el antibiótico.

Los hongos al igual que las bacterias, las plantas superiores y otros microorganismos, son capaces de producir metabolitos secundarios, estos son producidos por células que han dejado de crecer o cuyo crecimiento es restringido. El metabolismo secundario incluye una amplia gama de procesos metabólicos que son más activos cuando se restringe el crecimiento normal. Es decir, los intermediarios de las vías metabólicas primarias como: azúcares, ácido shikímico (un producto de siete carbonos que se forma en la vía HMF de la glucólisis), aminoácidos, ácido mevalónico (formado por condensación de tres moléculas de acetil CoA), Malonil CoA y ácidos grasos, no se utilizan para el crecimiento sino que se desvían a otras vías poco comunes para la síntesis de metabolitos secundarios.

En los hongos filamentosos a diferencia de los unicelulares, los metabolitos secundarios pueden acumularse en las partes más viejas de la colonia, cuando aun esta sigue creciendo en los márgenes (De Acon, 1988).

La gran ventaja de los hongos como fuente de metabolitos secundarios, es su habilidad de producir los compuestos en medios acuosos, en donde se acumulan tanto en el micelio como en medio de cultivo.

En el presente trabajo, únicamente se aislaron los metabolitos del medio de cultivo, probablemente se puede obtener un aumento en la actividad de los antibióticos al romper las células del micelio. Sin embargo, habría que hacerlo para comprobar esta teoría.

Los antibióticos **A** y **B**, sólo se purificaron parcialmente, es de suponer que si se realiza una purificación total se lograría un aumento en la actividad antimicrobiana de los antibióticos, ya que los antibióticos en general cuando están en forma pura, presentan mayor actividad, sin embargo, es necesario efectuar la purificación total de estos antibióticos, para corroborar lo anterior, por lo que es preciso señalar que el campo de investigación de estos metabolitos es aún muy extenso.

VI. CONCLUSIONES.

- Las fracciones 4 y 5, antibióticos B y A respectivamente, que se obtuvieron a partir de P. frequentans, presentaron una fuerte actividad antifúngica en la mayor parte de los hongos aislados, ya que inhibieron la germinación de las esporas de 29 de los 32 hongos que se ensayaron, la mayoría de los cuales se consideran fitopatógenos en la literatura (Cova, 1988).
- Aspergillus flavus, Cladobotrium sp. y Rhizopus stolonifer no presentaron inhibición ante la acción antifúngica de los antibióticos, por lo que resultan ser las especies más resistentes.
- Los antibióticos concentrados presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre los hongos que fueron sensibles a estos.
- Las diluciones más efectivas fueron las de 1/10 y 1/100.
- Los antibióticos en la dilución de 1/1,000 presentan una inhibición muy baja, casi nula, mientras que en la dilución 1/10,000 de ambos no causa ningún efecto inhibitorio en la germinación de las esporas de los hongos ensayados.

El antibiótico **B**, presenta mayor actividad antifúngica que el antibiótico **A**, en la mayoría de las especies ensayadas, esto concuerda con los resultados obtenidos por De Cal. A. et al. (1988).

Ambos antibióticos, son termoestables a temperaturas que van desde los 25 hasta los 120 °C, según De Cal. A. et al. (1988), el antibiótico **B** es más estable y menos influenciado por el medio externo que el antibiótico **A**.

Los antibióticos pierden su actividad antifúngica a medida que pasa el tiempo, lo cual puede deberse a varios factores como son: la descomposición natural de los mismos, la disminución de la tasa de biosíntesis, el incremento de la tasa de catabolismo de los antibióticos por el hongo, los cambios en el pH del medio, el envejecimiento del cultivo etc.

El efecto mayor de los antibióticos **A** y **B** sobre los hongos ensayados en este trabajo, ver (Tabla II), se observa en las especies de la Familia Moniliaceae.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.

- Agrios, N. G. 1988 .Fitopatología. Limusa, México. 756 pp.
- Barnett, L. H. y Hunter, B. B. 1985 .Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Mc Millan, Nueva York. 218 pp.
- Barron, A. L. 1968. " The Genera Of Hyphomycetes From Soil." Wilkins, Baltimore. 304 pp.
- Bauerde la I, Ma. L. 1987. Fitopatología. Limusa, México. 384 pp.
- Birkinshaw, J. H. (1952). Studies in biochemistry of microorganisms. Palitantin. Part 2. Further derivatives and degradation products. Biochem. J. 51: 271-276.
- Birkinshaw, O. y Raistrick, H. (1936). XLVIII. Penicilic acid, a metabolic product of Penicillium puberulum Bainier and P. cyclopium Westling. Biochem J. 28: 640 - 1656.
- Bowden, K., Lythgoe, B. y Marsden, D.J.S. (1959). Antibiotics produced by fungi. Journal of Chem. Soc. 7: 1662-1668.
- Brian, W. P. y Hemming, G. H. (1947). Production of antifungal and antibacterial substances by fungi; preliminary examination of 166 strains of fungi imperfecti. Chem. and Ind. 3: 158 - 167.
- Brian, P. W. (1957). The ecological significance of antibiotic production. In Williams, R. E. C. (1957). Microbial Ecology. Cambridge, Cambridge. 168-188 pág.
- Baker, R. (1968). Mecanisms of biological control of soil-borne pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 6: 263-294.
- Campbell, R. 1989. Biological Control Of Microbial Plant Pathogens. Cambridge, Nueva York. 218 pp.

- Castañeda, R. P. 1980. Bioestadística Aplicada. Trillas, México. 216 pp.
- Cole, T. C. y Kendrick, B. 1981. Biology Of Conidial Fungi. Academic Press, Nueva York. 660 pp.
- Cova, R. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 347 pp.
- Curtis, P. J. y Duncanson, L. A. (1952). A structural relationship between frequentin and palitantin. Biochem. J. 51: 276 - 278.
- Curtis, P.J., Heming, H.G., y Smith, W.K. (1951). Frequentin: An antibiotic produced by some strains of Penicillium frequentans Westling. Nat. 167: 557-558.
- De Acon, W. J. 1988. Introducción A La Micología Moderna. Limusa, México. 330 pp.
- De Cal. A., M. Sagasta, E. y Melgarejo, P. (1988). Antifungal substances produced by Penicillium frequentans and their relationship to the biocontrol of Monilinia laxa. Phytopathol. 78: 888 - 893.
- Dekker, J. (1963). Antibiotics in the control of plant diseases. Ann. Rev. Microbiol. 17: 243 - 262.
- Dekker, J. (1968). Antibiotics produced by microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 32: 579 - 635.
- Dekker, J. 1978. Advances In Applied Microbiology. Academic Press, Nueva York. Vol 24: 579 - 635.
- Florey, H. W. y Brian, P. W. (1949). Antibiotics. Chem. Ind. 9: 647 - 652.
- García, A. G. y Martínez M. E. (1983). Efecto in vitro de fungicidas sobre diferentes especies de Aspergillus. An. Ins. Biol. Univ. Nal. Autón. México, Ser. Botánica. 27: 23 - 27.

- Gottlieb, D. y Shaw, D. P. (1970). Mechanisms of action of antifungal antibiotics. Ann. Rev. Phytopathol. **8**: 371-402.
- Grove, J. F. y Tidd. (1963). Structure of frequentin. Chem. and Ind. **2**: 412 - 417.
- Hanlin, T.R. y Ulloa, M. 1988. Atlas Of Introductory Micrology. Hunter Textbooks Inc., Baltimore. 196 pp.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El Reino De Los Hongos. Fondo de Cultura Económica, UNAM, México. 552 pp.
- Hesseltine, C. W., Bradle, B. J. y Benjamin, C. R. (1960). Preservation of microorganisms. Micología. **52**: 762-774.
- Hetherington, A. C. y Raistrick, H. (1931). Studies in relation of biosynthesis of fungal metabolites. Phil. Trans. B. **220**: 209 - 215.
- Horsfall, J. G. (1975). Fungi and fungicides. The story of a nonconformist. Ann. Rev. Phytopathol. **13**: 1 - 13.
- Jacson, R. M. (1965). Antibiosis and fungistasis of soil microorganisms. In Baker, K. F., Snyder, W. C. Ecology Of Soil-Borne Plant Pathogens. Univ. California Press, Berkeley. 571 pp.
- John, F. G. y Brian, W. P. (1951). Identity of frequentin acid and citromycin. Nat. **167**: 995 pág.
- Kuhn, J. P., Trinci, J. P. A. y Jung, J. M. 1990. Biochemistry Of Cell Wall And Membranes In Fungi. Springer-Verlag, Nueva York. 327 pp.
- Little M. T. y Hills J. F. (1976). Métodos Estadísticos Para La Investigación En Agricultura. Trillas, México. 270 pp.
- Mahmoodian, A. y Stickings, E. C. (1964). Studies in the biochemistry of microorganisms. Metabolites of Penicillium frequentans series Westling. Biochem. J. **92**: 369 - 378.

- Márquez, J. M. 1988. Probabilidad y Estadística. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 657 pp.
- Martín, J. E. y Demain, A. L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. Microb. Rev. **44**: 230-251
- Mislivec, B. y Tuite, J. (1970). Temperature and relative humidity requirements of Penicillium isolated from yellow dent corn kernels. Micol. **62**: 75 - 83.
- Mc. Callan, S. E. A. (1967). History of Fungicides. In: D.C. Torgeson, Fungicides. Academic Press, Nueva York. Vol **1**: 1 - 37.
- Nash, S. N. y Snyder, W. C. (1962). Quantitative estimation by plate counts of propagules of the bean root rot Fusarium in field soil. Phytopathol. **52**: 567-72.
- Nakanishi, T. y Oku, H. (1969). Mechanism of selective toxicity: Absorption and detoxication of an antibiotic ascochitine by sensitive and insensitive fungi. Phytopathol. **59**: 1563-1565.
- Onions, A. H. S. y Smith, D. 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. Common. Micol. Inst. Kew. :397 pp.
- Pitt, I. J. (1979). The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces. Academic Press, Nueva York. 634 pp.
- Pusey, P. L. y Wilson, C. L. (1984). Postharvest biocontrol of stone fruits brown rot by Bacillus subtilis Plant. Dis. **68**: 753 - 756.
- Korzybski, T. y Kurylowicz, W. (1961). Antibiotics. Antibiot. Chemother. **10**: 9 - 16.
- Raper, K. B. y Thom, C. 1949. A Manual of the Penicillia. Williams y Wilkins Co., Baltimore. 425 pp.

- Sánchez, S. O. 1980. La Flora Del Valle De México. Herrero. México. 519 pp.
- Siegel, M. R. y Sisler, H. D. (1964). Site of action of cycloheximide in cells of Saccharomyces pastorianus. Biochim. Biophys. Acta. **87**: 70-82.
- Smith, W. L., Miller, H. y Bassett, D. R. (1965). Effects of temperature and relative humidity on germination of Rhizopus stolonifer and Monilinia fructicola spores. Phytopathol. **55**: 604 - 606.
- Ulloa, M. y Hanlin, R. 1978. Atlas De Micología Básica Concepto. México. 158 pp.
- Van Luyk, A. (1938) Antagonism between various microorganisms and different species of the genus Pythium, parasitizing upon grasses and lucerne. Mededel Phytopathol. **14**: 43 - 83.
- Waksman, S. A. y Lechevalier, H. A. (1962). The Actinomycetes. Antibiotics of Actinomycetes. Williams y Wilkins Co., Baltimore. Vol **3**: 480 pp.
- Waksman, S. A. (1956). The role of antibiotics in natural processes. Giorn. Microbiol. **2**: 1-14.
- Webster, J. 1980. Introduction To Fungi. Cambridge. Oxford. 669 pp.
- Wendling, R. (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of Trichoderma lignorum on Rhizoctonia solani and other soil fungi. Phytopathol. **24**: 1153 - 1179.
- Whitaker, A. (1970). Amino acid transport into fungi: An assay. Trans. Br. Mycol. Soc. **67**: 365-376.
- Williams, T. S. y Vickers, C. J. (1986). The ecology of antibiotic production. Microb. Ecol. **12**: 1153 - 1179.

APÉNDICE**Apéndice 1.**

Los medios de cultivo que se utilizaron en el presente trabajo fueron los siguientes.

Papa Dextrosa Agar (PDA)

Trozos de papas peladas y lavadas	450g
Dextrosa	20g
Agar	15g
Agua destilada	1000ml

Extracto de Malta Agar (EMA).

Extracto de Malta	20g
Peptona	1g
Dextrosa	20g
Agar	20g
Agua destilada	1000ml

Czapek

(Czapek-Dox), medio líquido al 5% de Glucosa.

Sacarosa Difco	50.0g
Nitrato de Sodio (Na NO_3)	3.0g
Fosfato de dipotasio ($\text{K}_2 \text{HPO}_4$)	1.0g
Sulfato de Magnesio ($\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.5g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.5g
Sulfato Ferroso ($\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.01g
Agua destilada	1000ml

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave a 120 °C y 15 Lb. de presión por 15 minutos.

Apéndice 2.

Fórmulas que se usaron para relizar el náalisis estadístico.

Análisis de varianza (**ANDEVA**), Cosiste en separar de la variación total observada las causas o factores parciales de variación.

-Término de corrección (C).

$$C = \frac{(\sum X)^2}{rn} =$$

Donde:

r = número de repeticiones

n = número de tratamientos

- Suma de Cuadrados y Cuadrados Medios.

Tratamiento. SCT y CMT. $SCT = \frac{\sum (T_t)^2}{r} - C$

Donde T_t = Totales del tratamiento y r = número de repeticiones en cada tratamiento.

El cuadrado medio para el tratamiento (CMT), se obtiene, dividiendo la Suma de Cuadrados Totales, SCT entre el (gl), grados de libertad para el tratamiento.

- $CMT = SCT / gl (T) =$

- Total SC.

$$SC = \sum (X)^2 - C =$$

- Error. SCE, CME: Suma de cuadrados del error y Cuadrado medio del error.

$$SCE = SC - SCT = \quad Y \quad CME = SCE / gl(E) =$$

- Valor de F.

Se calcula un valor F para tratamientos, mediante la división del CMT entre el CME:

$$F = \text{CMT}/\text{CME} =$$

- Prueba de Tukey.

Se emplea para hacer todas las comparaciones múltiples que son posibles con (a) muestras o tratamientos.

$$\text{Número de comparaciones o diferencias} = \frac{a(a-1)}{2} =$$

El método consiste en el siguiente proceso:

- A) Ordenar los promedios por su magnitud creciente o decreciente.
- B) Calcular un valor teórico común o diferencia significativa mínima mediante la aplicación de la fórmula: $W = q\alpha S x$, donde:

S_x = error estandar de la media = $\frac{S^2}{n}$

S_2 = CM o varianza del error experimental.

n = Número de observaciones, repeticiones o valores para calcular las medias.

$q\alpha$ = valor tabular.

- D.S.M. = Diferencia Significativa Mínima.

$$D.M.S._{(1,05)} = t \frac{2 S^2}{r} =$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA