



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

## Evaluación de un hongo asociado a *Magnolia dealbata* Zucc. en búsqueda de compuestos con actividad biológica

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

**Allan Espinosa Gómez**

**Director de Tesis**

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Comité Tutorial

Dr. Andrés Navarrete Castro

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Facultad de Química

Programa de Maestría y

Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

MÉXICO, D. F. enero, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

# AGRADECIMIENTOS

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la grandiosa formación que me ha brindado, tanto académica como humana, dándome la capacidad de abrir puertas en el porvenir; y al posgrado de Ciencias Bioquímicas por todo el conocimiento facilitado, pero más aún, por el crecimiento profesional

Asimismo, le agradezco profundamente al Dr. Sergio Sánchez Esquivel su constante tutoría en este proyecto, sus atenciones y la confianza depositada. En verdad muchas gracias por su amistad y su ejemplo.

A la M. en B. Beatriz Ruíz Villafán por la asesoría técnica recibida en todos los campos prácticos durante la realización de este trabajo, por los conocimientos y aportaciones tan asertivas, por su paciencia y el tiempo dedicado en cualquier asunto que se necesitara. Muy agradecido por su cariño y guía.

Al Comité Tutoral, el cual estuvo formado por el Dr. Andrés Navarrete Castro y el Dr. Ricardo Reyes Chilpa; por su valiosa colaboración y sugerencias, siguiendo así la evolución de esta investigación.

A la M. en C. Silvia Margarita Guzmán Trampe por la colecta del material biológico empleado, estableciendo de esta manera las bases de este proyecto; por sus recomendaciones, tiempo, paciencia y asistencia en los momentos que lo necesité. Gracias por todas las enseñanzas y su amistad incondicional.

Agradezco la colaboración de la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcaba, por todas las facilidades para la realización de los bioensayos para la búsqueda de actividad herbicida y antifúngica; así como a todo su grupo de trabajo, especialmente a las QFB. Rosa Elvira Sánchez Fernández, la M. en C. Brenda Lorena Sánchez Ortiz y el M. en C. Álvaro Ulloa Benítez por su cordial apoyo y ayuda en la obtención de los extractos orgánicos probados y las evaluaciones subsecuentes.

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, y a todo su grupo de trabajo, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los bioensayos parasiticidas; particularmente, gracias al M. en C. Ignacio Martínez Martínez por su asesoría en el manejo del parásito *Trypanosoma cruzi*,

También agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por su apoyo para la asistencia en un congreso nacional.

Esta investigación fue financiada por la beca CONACyT número 333536.

# DEDICATORIAS

---

A todos, MUCHAS GRACIAS.

Para mi familia, que con sus esfuerzos me han facilitado el camino que recorro. A mis Madres, que hacen hasta lo imposible para apoyarme, sus atenciones, cariño y lucha me han impulsado a dar los primeros pasos; a mi Padre, tu ánimo, interés, dedicación y trabajo me han puesto un horizonte a la vista; a mis Hermanos, porque gracias a su ejemplo se ha encendido una flama que no hará otra cosa que crecer en mí; a Mike, por tu esmero y apoyo incondicional que han puesto en marcha los engranes; y todos, en conjunto son responsables de este logro... y de los que seguirán.

A ti Ale, te dedico esta conquista, porque más que nunca estuviste involucrada en ella, y aún hoy día a día me enseñas que la fortaleza y perseverancia son vitales para seguir adelante, y este es el resultado de ponerlo en práctica. Tu apoyo, extrema paciencia y cariño facilitaron esta empresa, gracias por estar ahí para mí y por todo lo demás. Por eso y mucho más te amo con todas mis fueras y un poco más. Es un gusto enorme caminar a tu lado corazón... YRMU!!

Para ellos, que a lo largo de los años siguen estando a mi lado, compartiendo los éxitos y caídas, haciendo de las cargas un poco más livianas y volviendo inmejorables los grandes momentos. Chucho, Amilcar, Alegre, Octavio, Juan he aquí un vicio más. Chema, Nano, Pere, gracias por seguir apoyándome y recordándome lo importante de la autenticidad y perseverancia.

A mi familia los Sánchez, la piedra angular de esta conquista, por estar siempre ahí cuando lo necesité, ayudándome directamente, por sus opiniones y reflexiones que me hicieron crecer, por las risas y el *mood* constantes; en pocas palabras, por animarme diariamente para llegar al laboratorio para hacer mi mejor esfuerzo. Pirata (Silvia), Bety, MaryAnn, Alba, Tere, Miriam, Diana Colombiana, Dianita Socha, Mone, Brenda, Diana Lemus, Sara, Karol, Ivonne, Adán, Víctor, BrunOmars y el Dr. Sergio; de todo corazón, GRACIAS.

# ÍNDICE

---

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
1. ANTECEDENTES .....	5
1.1 La importancia de los metabolitos secundarios o productos naturales microbianos.....	5
1.2 Asociación Endófito-Planta.....	9
1.3 Los hongos endófitos y su importancia en la actualidad .....	13
1.4 <i>Magnolia dealbata</i> Zucc. ....	17
1.5 El género <i>Geomyces</i> .....	22
2. JUSTIFICACIÓN .....	25
3. HIPÓTESIS .....	25
4. OBJETIVO .....	26
Objetivos Particulares .....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.1 Aislamiento de poblaciones de microorganismos asociados a la especie <i>Magnolia dealbata</i> Zucc. ..	27
5.2 Corroboración de la actividad antimicrobiana con pruebas de antibiosis .....	28
5.3 Caracterización del hongo 31A-Ba.....	28
5.4 Microcultivo.....	29
5.5 Cinética de crecimiento del hongo 31A-Ba .....	29
5.6 Pruebas bioquímicas para la caracterización del hongo .....	29
5.7 Identificación de la cepa 31A-Ba.....	30
5.7.1 Extracción y aislamiento del DNA genómico.....	30
5.7.2 Amplificación por PCR de la región del DNA ribosomal 5.8S .....	30
5.8 Búsqueda de actividad biológica.....	33
5.8.1 Obtención del extracto total del hongo 31A-Ba.....	33
5.8.2 Bioensayo de Potencial Antifúngico .....	34
5.8.2.1 Por difusión del extracto total.....	34
5.8.2.2 Por antagonismo de <i>Geomyces</i> sp.....	35

5.8.3 Bioensayo de Potencial Herbicida.....	35
5.8.4 Bioensayo de Potencial Tripanocida .....	36
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
6.1 Selección del hongo de trabajo .....	38
6.2 Caracterización morfológica.....	39
6.3 Pruebas amilolíticas, celulolíticas y API .....	41
6.4 Identificación molecular.....	43
6.5 Cinética de crecimiento .....	50
6.6 Obtención de Extractos Orgánicos.....	51
6.7 Evaluación del potencial del hongo para producir algún tipo de actividad biológica diferente a la antibacteriana.....	54
6.7.1 Bioensayo de Potencial Antifúngico.....	54
6.7.2 Bioensayo de Potencial Herbicida.....	58
6.7.3 Bioensayo de Potencial Tripanocida .....	60
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>65</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>66</b>
<b>10. APÉNDICE.....</b>	<b>77</b>
Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones empleados.....	77
Anexo 2: Técnicas Moleculares .....	79
10.2.1 <i>Extracción del DNA genómico</i> .....	79
10.2.2 <i>Purificación del DNA genómico</i> .....	80
10.2.3 <i>Preparación de geles de agarosa al 0.8 %</i> .....	80

# LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

---

<b>Figura 1.</b> Interpretación Esquemática de las Interacciones Químico-Ecológicas entre la Planta y el Hongo Asociado (adaptado de Kusari <i>et al.</i> , 2012). .....	10
<b>Figura 2.</b> Fórmula química del Taxol o paclitaxel. ....	15
<b>Figura 3.</b> Proporción de hongos endófitos biológicamente activos aislados de diferentes fuentes con actividad antimicrobiana (Tomado de Selim <i>et al.</i> , 2012; adaptado de Yu <i>et al.</i> , 2010). ....	17
<b>Figura 4.</b> Propiedades farmacológicas de la corteza de Magnolia (Tomado de Watanabe <i>et al.</i> , 2002). .....	19
<b>Figura 5.</b> Estructuras del Honokiol y Magnolol. ....	20
<b>Figura 6.</b> Moléculas obtenidas de <i>Geomyces</i> sp., aislado de la Antártida (Tomado de Li <i>et al.</i> , 2008). (1) Ácido astérico, (2) Metil asterrato, (3) Etil asterrato, (4) n-butyl asterrato, (5) Bisdiclorogeodina, (6) Geomicina A, (7) Geomicina B, (8) Geomicina C. .....	24
<b>Figura 7.</b> Fotografía de uno de los individuos del árbol <i>Magnolia dealbata</i> Zucc. .....	27
<b>Figura 8.</b> Región 5.8S junto con los ITS1 e ITS2, delimitado por 18S (SSU) y 28S (LSU). En el recuadro rojo se marca la secuencia amplificada con los oligos ITS1F e ITS4A. ....	31
<b>Figura 9.</b> Diagrama de la colocación de las muestras para la prueba de 96 pozos. Amarillo: Medio LIT y Medio LIT + DMSO, Verde: controles positivos (Benznidazol y Nifurtimox), Naranja: extracto orgánico de medio de cultivo (SN) a 75 y 150 µg/mL, Azul: controles negativos de PDB a 75 y 150 µg/mL, Naranja: extracto orgánico de cultivo en arroz a 75 y 150 µg/mL, Azul: controles negativos de arroz a 75 y 150 µg/mL. ....	37
<b>Figura 10.</b> Pruebas de antibiosis en agar nutritivo a diferentes días de la fermentación. A) Contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . B) Contra <i>Micrococcus luteus</i> . ....	38

<b>Figura 11.</b> El Hongo 31A-Ba en medio PDA. A) Micelio aéreo blanquecino. B) Micelio profundo y el pigmento rojizo producido. ....	40
<b>Figura 12.</b> El hongo 31A-ba creciendo en PDA con tinción azul de algodón. A) Conidióforos en objetivo 40x. B) Micelio pequeño donde se pueden ver los arthroconidios dentro del mismo, y esporas cuasi esféricas a 100x. C) Estructura conidiogénica con micelio hialino y septado a 100x. ....	40
<b>Figura 13.</b> <i>Geomyces</i> sp. A) En medios con almidón: soluble, maíz, arroz, papa y soya (de abajo hacia arriba), a 3 temperaturas diferentes: 4 °C (izquierda), 20-25 °C (centro) y 29 °C (derecha). B) Prueba amilolítica en medio con almidón de papa casero. C) Prueba amilolítica en medio con almidón de papa comercial Difco®. ....	41
<b>Figura 14.</b> Pruebas celulolíticas en Czapek sin sacarosa y papel filtro como fuente de carbono. A) Papel filtro (control negativo). B) <i>Penicillium chrysogenum</i> (control positivo). C) <i>Fusarium</i> sp. (control positivo). D) <i>Geomyces</i> sp. ....	42
<b>Figura 15.</b> Geles de agarosa 0.8%. A) Obtención del DNA genómico de la cepa 31A-ba. B) Amplificación del gen 5.8S de la cepa 31A-ba. ....	44
<b>Figura 16.</b> A) Plásmido pJET1.2/blunt (Thermo Scientific®). B) Digestiones del plásmido pJET1.2/blunt con <i>Xba</i> I (Promega ®). ....	44
<b>Figura 17.</b> El hongo 31A-ba creciendo en PDA con tinción azul de algodón. A) <i>Pseudogymnoascus</i> (antes <i>Geomyces</i> ) relacionado al WNS (Blehert <i>et al.</i> , 2009). B) Estructura conidiogénica con micelio hialino y septado a 100x. C) Gel de agarosa 0.8% con amplicones realizados con oligos específicos de <i>P. destructans</i> . En el recuadro rojo se debería ver una banda si la especie estudiada se tratara de la misma especie. ....	47
<b>Figura 18.</b> Árbol de máxima parsimonia del alineamiento de ITS1-5.8S-ITS2 hecho con el programa MEGA 6, Bootstrap de 1000. El número en cada nodo indica el porcentaje de Bootstrap (Secuencias tomadas de los árboles de Rice y Currah, 2006; Gargas <i>et al.</i> , 2009; Minnis y Lindner, 2013). ....	49
<b>Figura 19.</b> Variación del pH y la biomasa obtenida en la cinética de crecimiento del hongo 31A-ba. A) Medio de cultivo resultante de la fermentación en medio Sabouraud Dextrosa (SD) 0.5 %. B) Medio de cultivo resultante de la fermentación en caldo Papa Dextrosa (PDB). ....	50

**Figura 20.** Fotografía de las cromatografías en capa fina corridas en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MetOH (95:5) de las muestras: A) Muestras: 1. Medio de cultivo (SN), 2. Micelio macerado (Met Mic), 3. Fracción Hexánica de arroz (Hx Arroz), 4. Fracción Hexánica micelio macerado (Hx Mic), 5. Fracción metanólica del extracto en arroz (Met Arroz). B) Perfil visto a 254 y 366 nm. Muestras: 1. Medio de cultivo (SN), 2. Fracción metanólica del extracto en arroz (Met Arroz).  
..... 53

**Figura 21.** Fotografía de las cromatografías en capa fina corridas en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MetOH (95:5). Muestras: 1. Estándar de Honokiol (Sigma®), 2. Estándar de Magnolol (Sigma®), 3. Estándar de Ac. Astérrico (Santa Cruz®), 4. Medio de cultivo (SN), 5. Micelio macerado (Met Mic), 6. Fracción Hexánica del micelio macerado (Hx Mic), 7. Fracción Hexánica de la fermentación proveniente de arroz (Hx Arroz), 8. Fracción metanólica del extracto en arroz (Met Arroz), 9. Blanco PDB, 10. Blanco Arroz. A) Perfil visto a 254 nm B) Perfil visto a 366 nm.  
..... 53

**Figura 22.** Antibiosis por el método de Kirby-Bauer en agar nutritivo A) En los primeros 5 días de una fermentación líquida contra *Micrococcus luteus* muestran efecto bacteriostático alrededor de todos los sensibilizados. B) Extractos orgánicos obtenidos de *Geomyces* sp. 31A-Ba contra *M. luteus* muestran efecto bactericida de la muestra proveniente del hongo crecido en arroz (flecha roja).  
..... 54

**Figura 23.** Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos obtenidos de *Geomyces* sp. sobre eumicetos (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*) y oomicetos (*Phytium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*).  
..... 55

**Figura 24.** Inhibición de los extractos orgánicos obtenidos de *Geomyces* sp. en eumicetos (*A. solani* y *F. oxysporum*) y oomicetos (*Phytium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*) fitopatógenos. .... 56

**Figura 25.** Pruebas de antagonismo en caja de *Geomyces* sp.: Control (1), a 7 días de incubación (2), a más de 3 meses de incubación (3). A) *Alternaria solani*, B) *Fusarium oxysporum*, C) *Phytium aphanidermatum*, D) *Phytophthora capsici*. .... 56

**Figura 26.** Inhibición de los extractos orgánicos frescos obtenidos de *Geomyces* sp en semillas de *Lycopersicon esculentum* (jitomate) y *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto). .... 59

<b>Figura 27.</b> Inhibición de los extractos orgánicos con vida de anaquel de 6 meses obtenidos de <i>Geomyces</i> sp en semillas de <i>Lycopersicon esculentum</i> (jitomate) y <i>Amaranthus hypochondriacus</i> (amaranto). .....	59
<b>Figura 28.</b> Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos de <i>Geomyces</i> sp sobre cultivos de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	62
<b>Figura 29.</b> TLC, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (95:5). Muestras: 1. SN, 2. Blanco PDB, 3. Extracto proveniente de la fermentación en arroz, 4. Blanco arroz. A) Perfil visto a 254nm. B) Perfil visto a 366 nm. ....	63
<b>Tabla 1.</b> Productos Naturales Microbianos (Bérdy, 2012). .....	8
<b>Tabla 2.</b> Reactivos y concentraciones usados para realizar el PCR. ....	31
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la prueba API 20C (Biomérieux ®) para la asimilación de fuentes de carbono. ....	43
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la comparación de secuencias de la cepa 31A-ba utilizando el programa BLAST. ....	46

# RESUMEN

---

Los microorganismos generan metabolitos secundarios, los cuales constituyen aproximadamente la mitad de los productos farmacéuticos que se encuentran en el mercado hoy en día, y que han sido aislados de diferentes fuentes naturales incluyendo el suelo, el agua (de río y de mar), el aire, las esponjas y las plantas.

En lo que respecta a las plantas, hasta hace unos años se habían estudiado únicamente sus extractos, sin tomar en cuenta a los microorganismos presentes en ellas; los cuales, recientemente han probado ser de gran importancia para el descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos. Es de esta forma que nos propusimos evaluar la posible actividad biológica de los hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc., planta importante en la medicina tradicional mexicana, en búsqueda de compuestos bioactivos benéficos para el humano.

De este árbol se aislaron 45 hongos, de los cuales 11 inhibieron principalmente a las bacterias Gram-positivas *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*. De éstos, se seleccionó un hongo que llamó la atención por sus diferentes capacidades bioquímicas, pigmentos y morfología para su identificación utilizando la región 5.8S (con sus ITS colindantes) del DNA ribosomal, y para su estudio químico enfocado en la búsqueda de compuestos de interés.

Las secuencias obtenidas al ser comparadas por BLAST mostraron que el hongo elegido parece ser una especie no reportada perteneciente al género *Geomyces*. Extractos orgánicos de este hongo han mostrado actividad contra semillas de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) y jitomate (*Lycopersicon esculentum*), así como inhibición contra *Trypanosoma cruzi* (cepa Querétaro), y efecto no significativo contra hongos fitopatógenos (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Phytium aphanidermatum*).

# INTRODUCCIÓN

---

Actualmente, nos enfrentamos a diversos problemas socioeconómicos en el ámbito sanitario y de salud que están relacionados con organismos patógenos. Por otra parte, dentro de las actividades agroindustriales existen numerosas pérdidas económicas provocadas por malezas, insectos y microorganismos fitopatógenos como los hongos, bacterias, virus y oomicetos. Éstos últimos son particularmente problemáticos en agricultura, ya que se caracterizan por ser de rápido crecimiento con elevada patogenicidad y alta especificidad para atacar cultivos de importancia comercial. Sin embargo, existe un limitado número de compuestos químicos para tratar las enfermedades, haciendo urgente el desarrollo de nuevos agentes agroquímicos específicos con menor impacto ambiental y baja toxicidad para los seres humanos (Meléndez-González, 2012).

Por otro lado, en el tema de salud, las enfermedades infecciosas son actualmente una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Baltz, 2005). Con el paso del tiempo, la resistencia de los microorganismos patógenos amenaza con aumentar este número, que es agravado por el retraso en los métodos de control sanitarios y terapéuticos. Más aún, el abuso de antibióticos, así como la automedicación (un hábito todavía común entre la población mundial, incluido México) ha contribuido a los elevados índices de resistencia (Amábile-Cuevas, 2010).

Por otro lado, los patógenos resistentes no son el único problema de salud. Existen padecimientos crónicos que aminoran la calidad de vida, tales como el cáncer, o la enfermedad de Chagas. Éste último, durante mucho tiempo se consideró un padecimiento endémico de América, por ello fue llamado “tripanosomiasis americana”, y afecta a más de 10 millones de individuos latinoamericanos (WHO, 2010),

particularmente en México la infección está presente en prácticamente todo nuestro territorio (Martínez, *et al.*, 2013).

Para abordar estos problemas, se ha propuesto la búsqueda de nuevos compuestos naturales, y se han investigado las propiedades antimicrobianas de derivados de antibióticos ya existentes con resultados positivos (Wright, 2000). Asimismo, la exploración de compuestos naturales ha constituido un fuente basta de compuestos químicos con potencial de aplicación en el control de plagas y enfermedades, ya que poseen una diversidad química incluso superior a la obtenida por la química combinatoria y tienen un tiempo de residencia menor en el ambiente por lo que sus efectos dañinos son menores (Dubey, *et al.*, 2011). Muchos descubrimientos se han hecho recientemente en el aislamiento de una clase especial de microorganismos, comúnmente llamados endófitos (principalmente hongos, pero también bacterias) que han demostrado tener el potencial natural para la acumulación de diversos metabolitos bioactivos que directa o indirectamente podrían utilizarse como agentes terapéuticos contra una plétora de enfermedades (Kusari y Spiteller, 2011).

Las relaciones simbióticas entre hongos y organismos fotosintéticos son antiguas y ubicuas. Sin embargo, estas interacciones han sido descritas en menos del 5% de las 1.5 millones de especies de hongos que se estima que existen (Hawksworth, 2001). Se ha encontrado que las plantas tropicales contienen una gran diversidad de microorganismos asociados, muchos de ellos todavía sin clasificar y posiblemente pertenecientes a nuevos géneros y especies. Estos hongos asociados están conformados por una gran variedad de micromicetos que colonizaron los tejidos de su planta hospedera sin causar síntomas aparentes de enfermedad, desarrollando una relación de antagonismo, comensalismo o mutualismo que está equilibrada por la virulencia del hongo y las defensas de la planta. De esta forma, los hongos encuentran un hábitat y alimento dentro de su hospedera y, a cambio algunos de ellos, gracias a los metabolitos

secundarios que producen, suelen disminuir la probabilidad de que ésta se vea afectada por microorganismos patógenos competidores y factores ambientales adversos (Arnold *et al.*, 2003; Schulz y Boyle, 2005; Charepraset *et al.*, 2006; Gunatilaka, 2006).

Los estudios de microorganismos asociados a plantas se han incrementado radicalmente desde el descubrimiento de Stierle *et al.* (1993), donde se encontró que un hongo huésped producía taxol al igual que la planta anfitriona, lo que ha llevado a que muchos más compuestos hayan sido encontrados en recientes años. Tomando en cuenta todos estos datos, en este trabajo el potencial químico obtenido de un hongo presente en el árbol *Magnolia dealbata* Zucc., con el fin de encontrar productos naturales potencialmente útiles para el humano.

# 1. ANTECEDENTES

---

## 1.1 La importancia de los metabolitos secundarios o productos naturales microbianos

Los microorganismos son indispensables para todos los aspectos de la vida humana, de hecho, para toda la vida en la Tierra. Desde tiempos inmemoriales todos los procesos de la biosfera se han visto afectados por la capacidad aparentemente interminable de los microbios para modificar el mundo que les rodea (Kusari y Spiteller, 2010). De esta forma, mantenemos un contacto íntimo con ellos, influyendo en nuestras actividades diarias en todo momento; un claro ejemplo son los metabolitos secundarios obtenidos a partir de ellos.

En un inicio, dicho término denominaba a compuestos como productos finales del metabolismo primario que presentan modificaciones secundarias y son de baja abundancia (<1%). En la actualidad se sabe que son moléculas en su mayoría, de bajo peso molecular <3000 Da (aunque no necesariamente), que poseen una amplia variedad estructural y funcional, no son indispensables para el crecimiento del microorganismo en un cultivo puro, y que son moléculas de adaptación, resultado de la evolución en respuesta a las necesidades y adversidades del entorno natural. Aquéllos que presentan alguna actividad biológica notable son generalmente referidos como productos naturales bioactivos (Bourgaud, 2001; Demain, 1981; Demain, 2009). Los cuales se definen como aquellos que poseen un efecto biológico sobre otro organismo, sean: antibacterianos, insecticidas, fungicidas, herbicidas, antiparasitarios, antihistamínicos, antitumorales y antidepressivos, y pueden obtenerse a partir de plantas, animales y microorganismos (Bérdy, 2005).

En general, las principales funciones de los metabolitos secundarios son de defensa, regulación y comunicación. Por ejemplo, modulan la transcripción celular, la multiplicación, la transferencia de genes, la inducción de fagos, actividad de respuesta de la célula anfitrión, e inducen resistencia y virulencia (Bérdy, 2012).

Los pesos moleculares de los metabolitos microbianos son muy variados, por ejemplo 70 Da (acrilamidina), 2539 Da (ramoplanina), 3354 Da (nisina), 7457 Da (microcina-24), hasta un máximo de 12 524 Da (actinohivina). El peso molecular promedio de los productos derivados de actinomicetos es de  $\sim 550$  Da, mientras que los productos de hongos tienen un peso molecular medio de  $\sim 380$  Da. En general, los productos naturales microbianos tienen una alta complejidad estérica con muchos centros quirales, tienen menos nitrógeno y más contenido de oxígeno, menos aromáticos y más enlaces éter (Bérdy, 2012)

Éstos compuestos han sido la inspiración para el desarrollo de aproximadamente el 80 % de fármacos comerciales (Newman y Cragg, 2012). Cabe señalar que ni los avances en química combinatoria, la creación o modificación de nuevas moléculas y otras técnicas diversas, han podido llegar a compararse con la naturaleza, la cual continúa diseñando nuevos compuestos con actividades mejoradas y efectos secundarios reducidos, beneficiando así a la salud humana.

Se estima que el número de compuestos naturales reportados ronda al medio millón, de los cuales casi el 70% son producidos por plantas y solamente el 10% por microorganismos (45% por actinomicetos, 37% por hongos y 10% por bacterias). Es necesario denotar que cerca de la mitad de todos los metabolitos microbianos conocidos (47%) presentan algún tipo de actividad biológica, mientras que esta cifra es menor en las plantas (7%), y solamente un 3% para compuestos de origen animal (Bérdy, 2012; Demain y Sánchez, 2009).

A través de la historia los mayores productores de metabolitos secundarios han sido los hongos y los actinomicetos. Se han descrito aproximadamente 8600 compuestos bioactivos de hongos, de los cuales 4900 son antibióticos y 3700 presentan otras actividades (Ganguli y Deshmukh, 2007). En particular, los metabolitos aislados de hongos asociados a plantas poseen una gran diversidad química, incluyendo esteroides, xantonas, fenoles, isocumarinas, derivados del perileno, quinonas, furandionas, terpenoides, depsipéptidos y citocalacinas. Los hongos son usados en varios procesos industriales tales como la producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, alcoholes, pigmentos, lípidos y glicolípidos, son extremadamente importantes para nuestra salud así como nuestra nutrición, y tienen un tremendo impacto económico (Shulz y Boyle, 2005; Adrio y Demain, 2003).

La situación ha cambiado actualmente (Tabla 1), y desde los años noventa, el número de compuestos bioactivos aislados de hongos filamentosos aumentó continuamente a más del 50%, el interés hacia las bacterias se incrementó ligeramente; y donde se dio el mayor descenso fue en los productos obtenidos de actinomicetos, disminuyendo su número en un 25% (Bérdy, 2005; Bérdy, 2012).

Más del 85% de todos los metabolitos microbianos bioactivos conocidos presentan actividad antibacteriana, antifúngica o antiprotozoaria, y de éstos, más de la mitad (51%) exhiben otras bioactividades. Por otro lado, más del 50% de los metabolitos fúngicos presentan actividad fitotóxica, herbicida y/o pesticida (Bérdy, 2012).

**Tabla 1.** Productos Naturales Microbianos (tomado de Bérdy, 2014)

Microorganismos productores	Antibióticos	Bioactivos restantes	Productos Naturales conocidos
Actinobacteria	14 500	16 000	20 - 21 000
<i>Streptomyces</i> sp.	11 000	12 400	17 00
Otras actinobacterias	3 400	3 600	4 400
Eubacterias	3 500	4 700	11 - 12 000
( <i>Bacillus</i> sp.	1 400		
<i>Pseudomonas</i> sp.)	950		
Myxobacterias	450	750	1 200
Cyanobacterias	400	1 800	4 500
Otras incl. proteobacteria	800	2 000	5 000
Hongos	10 500	1 800	40 - 45 000
Microscópicos	9 000	14 000	32 000
( <i>Aspergillus</i>	2 200		
<i>Penicillium</i> )	1 650		
Basidiomicetos	2 900	4 100	9 000
Otros (incl. levaduras, mucilaginosos, etc.)	110	340	3 000
Total	~ 28 500	~ 38 500	75 - 80 000

Los compuestos microbianos bioactivos conllevan a un mercado sólido y promisorio, constituyendo casi el 50% de los nuevos medicamentos introducidos en el mercado entre 1981-2010; aproximadamente el 75% de los agentes anti-infecciosos son productos naturales o derivados de productos naturales (Newman y Cragg, 2010), y los productos naturales *per se*, representan más de \$ 40 mil millones de dólares en ventas (Demain, 2009).

## 1.2 Asociación Endófito-Planta

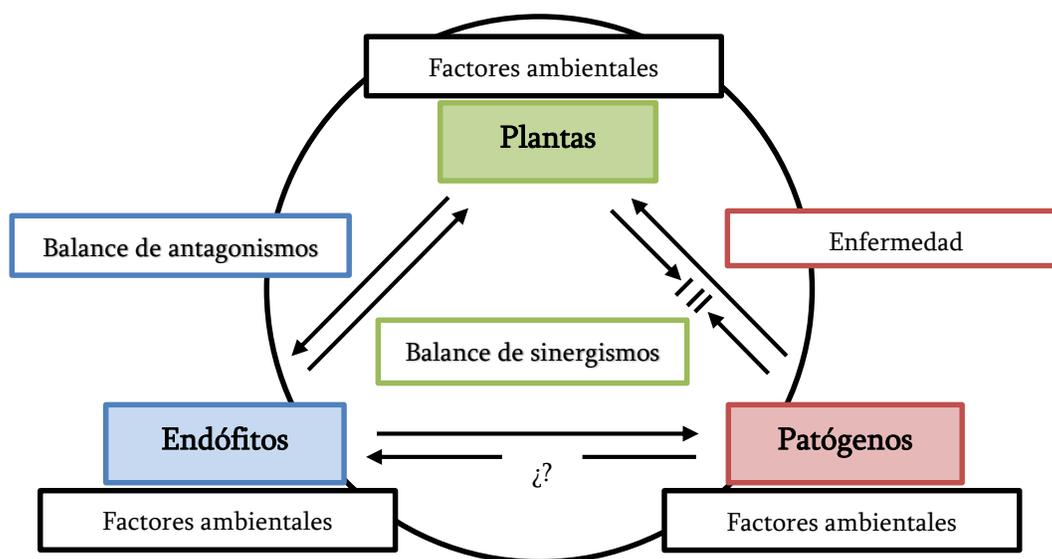
Como ya se mencionó, hace muchos años que se conocían microorganismos que viven dentro de los tejidos vasculares de las plantas, de forma diferente a las relaciones epífitas o parásitas ya conocidas. Luego de observar hifas en diferentes semillas de trigo en 1886, de Bary los denominó como microorganismos “endófitos” (Hyde y Soyong, 2008; Skusari y Spiteller, 2012), y desde entonces dicha definición ha sido muy discutida y modificada.

Actualmente, se pueden definir a los endófitos como microorganismos asociados a plantas que residen en sus tejidos internos, viviendo sin causar efectos negativos evidentes inmediatos (Bacon y White 2000), pero pueden volverse patógenos durante la senescencia del hospedero (Rodríguez y Redman 2008).

La mayoría de los endófitos se transmiten horizontalmente a sus plantas anfitrión por dispersión de sus esporas por el aire; pero también puede darse el caso de una transmisión vertical a las próximas generaciones a través de las semillas (Hartley y Gange 2009). Los estudios han mostrado que la transmisión vertical o sistémica, en donde los microorganismos crecen dentro de las semillas, tienen más probabilidades de ser mutualistas, mientras que los transmitidos horizontalmente (no sistémicos), a través de esporas, tienden a ser antagonicos al hospedero (Schardl *et al*, 1991; Saikkonen *et al*. 1998).

Las plantas ofrecen una gran diversidad de hábitats para los microorganismos y ésta es una razón importante por la cual los microorganismos y las plantas interactúan frecuentemente. Además, es necesario señalar que las plantas son también productoras de metabolitos secundarios, lo que suma complejidad a la interacción con sus microorganismos, dando como resultado una fuente abundante de moléculas bioactivas (Strobel *et al.*, 2004).

Schulz y Boyle (2005) mencionan que no existen interacciones neutras entre endófitos y hospederos, sino que estas interacciones incluyen un balance de antagonismos (Figura 1). Siempre hay al menos un grado de virulencia por parte del hongo habilitando de esta manera la infección, mientras que las defensas de la planta hospedera limitan el desarrollo de los invasores fúngicos así como la enfermedad (Isaac, 1992), como lo muestra de forma sencilla la Figura 1.



**Figura 1.** Interpretación Esquemática de las Interacciones Químico-Ecológicas entre la Planta y el Hongo Asociado (adaptado de Kusari *et al.*, 2012).

Cabe señalar que los microorganismos asociados a plantas que se encuentran con mayor frecuencia son hongos (Bacon y White, 2000; Staniek *et al.*, 2008), y suelen ser ascomicetos, u otros conidiogénicos (fase anamórfica) que viven de forma asintomática en los tejidos vegetales (Huang *et al.*, 2001). La interacción que entabla el hongo con la planta promueve una relación en la que se obtienen beneficios al menos para una parte (aunque para la otra pueda ser perjudicial); tal como la obtención de nutrientes a expensas del hospedero, o la mejora ecológica de la planta, o una posible acción

mutualista que puede ejercer el huésped sobre su hospedera. Pero en su ahora hábitat interno, el hongo debe enfrentar condiciones agresivas porque la planta puede contener ya varios endófitos previamente instalados con los cuales el nuevo microorganismo debe competir (Faeth, 2002; Tan y Zou, 2001).

Es generalmente aceptado que las plantas infectadas con endófitos son frecuentemente más sanas que aquéllas que no los tienen, porque las primeras suelen tener ventajas contra el estrés biótico y abiótico sobre sus contrapartes. Algunos endófitos incluso llegan a participar de forma directa o indirecta en la toma de nutrientes minerales para reducir o prevenir el estrés (Zhang *et al.*, 2006).

La mayoría de las especies de plantas que se han estudiado previamente presentan al menos un microbio endófito (Ryan *et al.*, 2008); y aquellas plantas que crecen en entornos ambientales únicos generalmente hospedan organismos endófitos no reportados o descubiertos (Strobel, 2003).

Antibióticos o enzimas pueden ser producidos por los microorganismos asociados para prevenir la fitocolonización de patógenos microbianos (Strobel, 2003; Berg y Hallmann, 2006), o evitar que los insectos (Azevedo *et al.*, 2000) y nemátodos (Hallmann *et al.*, 1998) infecten a las plantas.

En otros casos, los endófitos generan compuestos que activan el mecanismo de defensa del anfitrión frente a otros organismos patógenos, en un proceso conocido como resistencia sistémica inducida (Kloepper y Ryu, 2006), y también pueden promover el crecimiento de las plantas en un intento de compensar la apoptosis celular inducida por la infección de fitopatógenos (Berg y Hallmann, 2006; Alvin *et al.*, 2013).

La especie vegetal hospedera también se beneficia de los endófitos por su resistencia natural a los contaminantes del suelo (Siciliano *et al.*, 2001), su capacidad para degradar

compuestos xenobióticos, o ayudando sustancialmente en la fitorremediación (Ryan *et al.*, 2008).

Por un lado, los aspectos ecológicos de los hongos endófitos tales como la gama de anfitriones, parentesco evolutivo, la infección, la colonización, los patrones de transmisión, la especificidad tisular y aptitudes mutualistas benéficas han sido investigados en relación con una gran cantidad de plantas (Arnold *et al.*, 2003, 2007, Arnold, 2005, 2007; Stone *et al.*, 2004; Schulz y Boyle, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009). Por otro lado, muchos descubrimientos se han hecho en el aislamiento de hongos asociados a plantas, que han demostrado tener el potencial para la síntesis *de novo* de diversos metabolitos bioactivos que directa o indirectamente se pueden utilizar como agentes terapéuticos contra numerosas enfermedades (Strobel *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Gunatilaka, 2006; Staniek *et al.*, 2008; Suryanarayana *et al.*, 2009; Aly *et al.*, 2010; Kharwar *et al.*, 2011; Kusari y Spiteller, 2010, 2011, 2012).

El potencial metabólico que reside en los hongos endófitos es enorme, el número estimado de especies de hongos es más de cinco veces el número previsto de especies de plantas y cincuenta veces el número posible de especies bacterianas (Demain, 2009). Dreyfuss y Chapela (1994) especulan que existen al menos 1.3 millones de hongos endófitos por ser descubiertos; donde solamente se han identificado aproximadamente 25 000 especies (Bérdy, 2012). En México, según cálculos, análisis poblacionales y extrapolaciones, han determinado que contamos con aproximadamente 200,000 hongos, de los cuales sólo el 3.5 % son conocidos. Sin embargo, hay que recordar que la gran destrucción forestal que ocurre al parejo de la pérdida de la diversidad en el país está afectando seriamente la biodiversidad total, principalmente en los trópicos. Es por ello que debemos valorar mejor los recursos con los que contamos, y más sabiendo el beneficio que representan para el género humano (Hawksworth, 2001; Guzmán, 1998), ya que se estima que solamente un 40-50% de los bosques que existían hace 1000-2000

años, permanecen en la actualidad. Así que, cuando desaparezca una especie de planta, también lo hará un complejo entero de microorganismos asociados (Strobel, 2003).

### **1.3 Los hongos endófitos y su importancia en la actualidad**

Los microorganismos pueden ser aislados de casi todas partes en el planeta. A pesar de su pequeño tamaño, son una de las formas más abundantes de la vida en la Tierra, sobre todo porque se han adaptado a través de la evolución de los hábitats más extremos y están bien equipadas con arsenales químicos para mostrar cualquier tipo de interacciones ecológicas. A pesar de la gran diversidad de compuestos existentes, siempre habrá una búsqueda de nuevos nichos ecológicos para las fuentes potenciales de agentes bioactivos naturales procedentes de fuentes renovables, amigables ecológicamente y fáciles de obtener (Liu *et al.*, 2001).

Tal es el caso de las plantas, que han atraído la atención desde tiempos ancestrales gracias a sus propiedades medicinales, por lo que se han hecho grandes esfuerzos en torno a las plantas empleadas en la medicina tradicional debido a sus propiedades farmacológicas y al aislamiento de nuevas moléculas (Osman *et al.*, 2012). Entre las especies vegetales conocidas en la Tierra (más de 300 000 especies diferentes), sólo en una pequeña fracción se ha investigado la presencia de compuestos antimicrobianos, y solamente del 1 - 10% de las plantas son utilizados por los seres humanos (Shahid *et al.*, 2009; Osman *et al.*, 2012).

Es así que llegamos a los organismos endófitos, los cuales han recibido mucha atención debido a su indudable capacidad para generar productos naturales con potencial terapéutico (Kusari y Spiteller, 2011). Los hongos asociados han co-evolucionado durante millones de años con sus anfitriones, las plantas superiores, lo que representa un importante recurso de nuevos metabolitos secundarios. Han llegado a adaptarse a sus micro ambientes y han desarrollado la habilidad bioquímica para producir compuestos

similares o idénticos a aquéllos producidos por sus plantas hospederas como resultado de la recombinación génica al incluir el DNA de la planta dentro de su propio genoma (Photita et al., 2001; Zhang et al., 2006). Sin embargo, no necesariamente dicha co-evolución conlleva a la producción del mismo compuesto (Kusari y Spiteller, 2011).

En la última década, aproximadamente la mitad de los metabolitos de hongos recién descubiertos (unos 5000 compuestos) se aislaron de cepas endófitas. Y no sólo eso, se ha visto que el 80% de los hongos endófitos producen algún tipo de compuesto bioactivo (Kusari y Spiteller, 2011; Crawford y Clardy, 2011; Yu, *et al*, 2010; Simmons, *et al*, 2008).

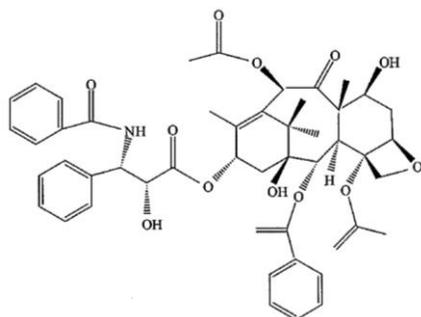
Como ya se mencionó, los hongos se consideran organismos de gran importancia en el mundo, no sólo por su rol vital dentro de los ecosistemas, sino también por su influencia en las actividades humanas (Mueller y Schmit, 2007). El mercado por áreas no farmacéuticas llegó a \$2 billones de dólares en el año 2000, en las que destacan: comida 45%, detergentes 34%, textiles 11%, pieles 3%, pulpa y papel 1.2% (Adrio y Demain, 2003). Además, considerando que 6 de 20 de los medicamentos más prescritos son de origen fúngico, y que aproximadamente sólo el 5% de los hongos han sido descritos, éstos representan un enorme potencial para la búsqueda de nuevos productos (Gloer, 1997; Hawksworth, 2001; Schulz *et al.*, 2002).

Diversos productos naturales bioactivos de diferentes clases, tales como alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanos y ácidos fenólicos, ya han sido aislados de hongos endófitos (Zhang et al., 2006). Hoy en día, la mayor parte de metabolitos microbianos es producido por varios hongos, que incluyen los basidiomicetos (11%) y micromicetos filamentosos (33%), incluyendo *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y cientos de otras especies. Estos géneros representan casi el 99% de todos los metabolitos fúngicos. Otros tipos de hongos, como las levaduras y

hongos mucilaginosos son productores muy pobres, con menos de 400 productos en total, que es ~ 1.5% de todos los metabolitos (Bérdy, 2012).

Entre los hongos microscópicos, la capacidad de producción de los ascomicetos y las especies endofíticas son las más significativas (Bérdy, 2005).

Los hongos asociados pueden producir los mismos metabolitos secundarios o muy similares que su anfitrión. Compuestos bioactivos que son co-producidos por las plantas y sus endófitos incluyen los fármacos anticancerígeno camptotecina (Puri *et al.*, 2005), la podofilotoxina (Puri *et al.*, 2006), y a la azadiractina, que es un insecticida natural (Kusari *et al.*, 2012), el famoso caso del taxol (paclitaxel), una molécula antitumoral (Figura 2), que fue aislado primeramente de árboles de tejo *Taxus brevifolia* (Wani *et al.*, 1971), y luego se descubrió que también es producido por uno de sus hongos endófitos *Taxomyces andreanae* (Stierle *et al.*, 1995), eliminando la necesidad de aislarlo a partir de los árboles de lento crecimiento (Strobel, 2003). Actualmente, hay más de 35 especies fúngicas endofíticas que lo producen (Bérdy 2012).



**Figura 2.** Fórmula química del Taxol o paclitaxel.

La búsqueda de nuevos productos para las industrias farmacéuticas y agroquímicas es un proceso constante que requiere optimización continua (Dreyfuss y Chapela, 1994). En este proceso es relevante considerar que: (1) los metabolitos secundarios que un hongo

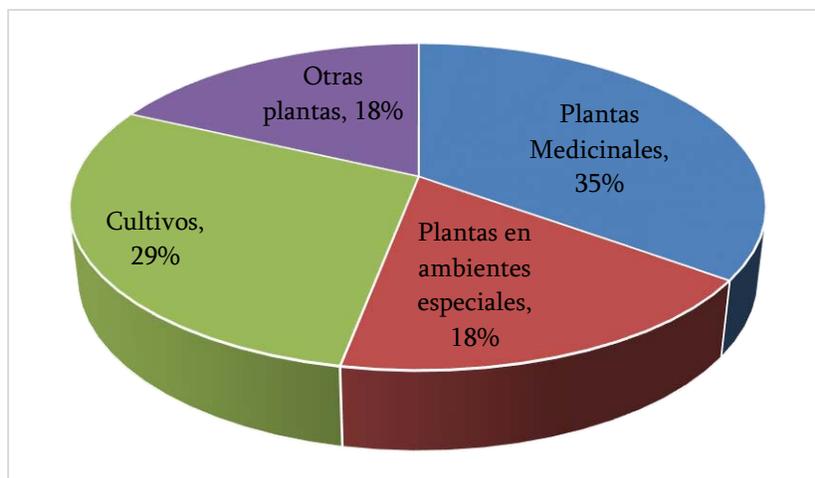
sintetiza corresponden con su nicho ecológico, y que (2) las interacciones metabólicas pueden mejorar la síntesis de dichos metabolitos secundarios (Schulz et al., 2002). Estos compuestos de origen fungal son ahora usados para varios fines, en su mayoría como antibióticos, aunque cabe recordar también que los inmunosupresores, como la ciclosporina, revolucionaron la medicina facilitando los trasplantes de órganos.

Teniendo presente lo anterior, Strobel *et al.* (2004) proponen las siguientes estrategias de selección de plantas hospederas a estudiar:

- ✓ Plantas que habitan ambientes únicos
- ✓ Plantas con historia etnobotánica (usada por indígenas).
- ✓ Plantas endémicas que suelen tener una longevidad inusual o que han ocupado ciertas masas de tierra desde la antigüedad.
- ✓ Plantas que crecen en áreas de gran biodiversidad, las cuales pueden alojar endófitos igualmente biodiversos.

Además de estas propuestas, con las cuales concuerdan Kusari y Spiteller (2011), ellos agregan una más: aquellas plantas que además de endémicas pueden estar amenazadas con su extinción, de las cuales es importante estudiar las interacciones endófito-planta. Aunque esto depende de que esté uno buscando en particular, es decir, no aplica para todo tipo de investigación y no deben tomarse como leyes sino como pautas a considerar.

La búsqueda de endófitos que pueden mostrar bioactividad necesita la selección adecuada de plantas que pueden ser de interés debido a su biología, la edad, el endemismo, historia etnobotánica, y/o el entorno ambiental. Yu *et al.* (2010) mostraron que las plantas medicinales y plantas en ambientes especiales son estudiados con frecuencia para la detección de microbios que producen agentes antimicrobianos (Figura 3).



**Figura 3.** Proporción de hongos endófitos biológicamente activos aislados de diferentes fuentes con actividad antimicrobiana (Tomado de Selim *et al.*, 2012; adaptado de Yu *et al.*, 2010).

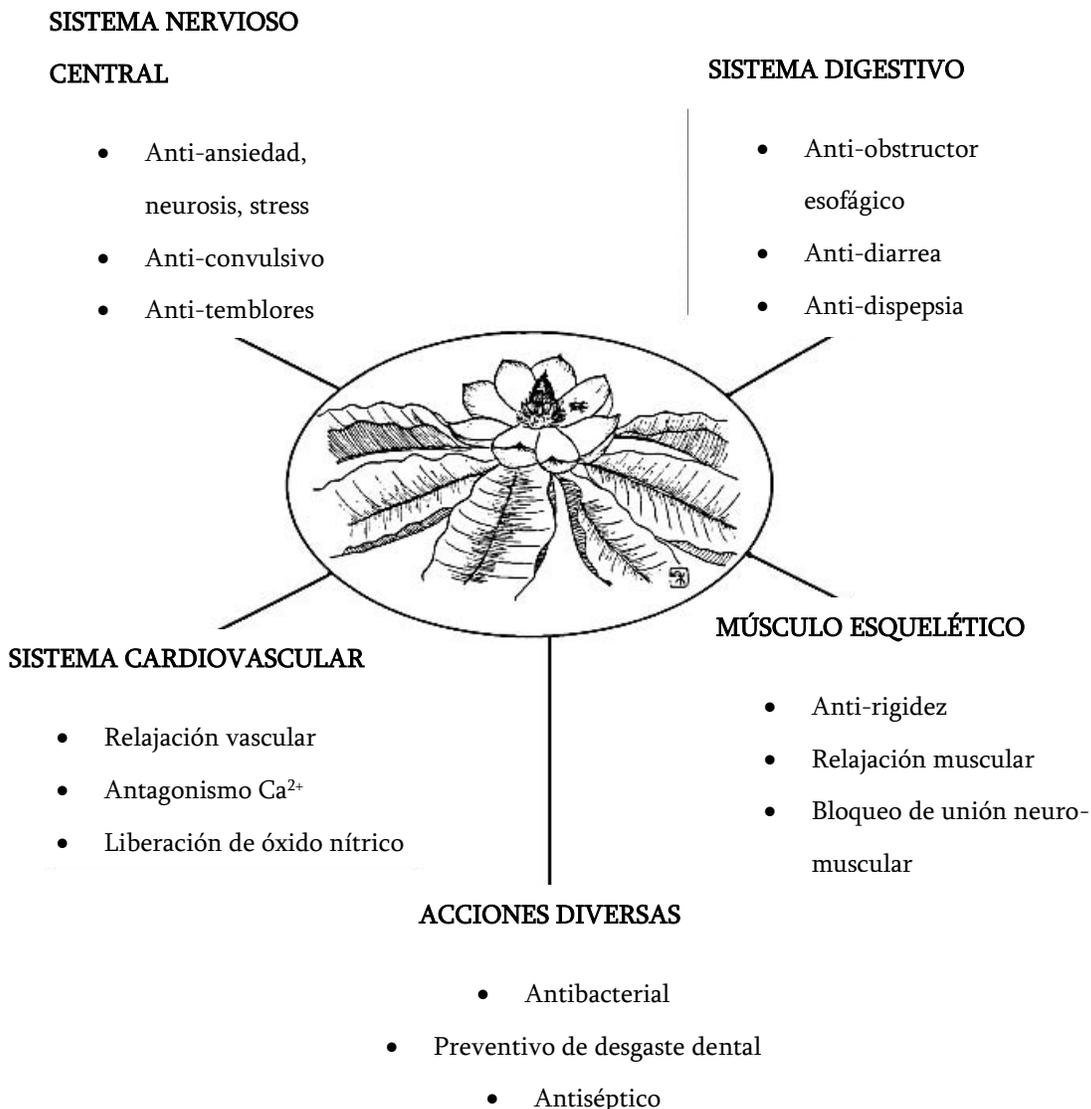
En general, los hongos endófitos son una fuente rica de diversidad genética y novedad biológica (Bacon y White, 2000), potencialmente útiles para aplicaciones medicinales y agrícolas (Tan y Zou, 2001); en este sentido, la experiencia ha demostrado que los nuevos microbios endófitos generalmente producen nuevos productos naturales (Strobel, 2002, 2003).

#### **1.4 *Magnolia dealbata* Zucc.**

La medicina tradicional ha empleado plantas desde hace miles de años y en la actualidad, aproximadamente el 80% de la población mundial, todavía depende de las plantas medicinales para el cuidado de la salud (Gurib-Fakim, 2006). Además, es fundamental en el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas. China cuenta con el mayor número de plantas medicinales registradas, con alrededor de 5,000 y México ocupa el quinto lugar en biodiversidad de plantas y el segundo lugar en cuanto a especies de plantas con antecedentes etnobotánicos con 4,500 especies (Cragg y Newman, 2007).

El árbol que fue seleccionado para el presente trabajo, y del cual se tomaron las muestras de tejido para la búsqueda de endófitos proviene de la familia Magnoliaceae, la cual es muy antigua, con fósiles remanentes que datan entre los 36 y 58 millones de años. Agrupa cerca de 220 especies de árboles caducifolios o perennes y arbustos nativos de Asia y América, posee grandes y ostentosas flores que contienen tanto las partes femeninas como las masculinas. Esta familia fue nombrada así en honor a Pierre Magnol (1638-1715), profesor de Botánica y Medicina en Montpellier, Francia (Watanabe *et al.*, 2002). Esta familia se encuentra ampliamente distribuida en climas tropicales o subtropicales. Aproximadamente, el 80% de las especies se encuentran al sureste de Asia, desde el Himalaya hasta Japón, y del Archipiélago Malayo hasta Nueva Guinea y Nueva Bretaña, mientras que en América se encuentra el 20% restante, desde el templado sureste de Norte América, y a través de la América tropical a Brasil. Todas las especies de América pertenecen a 3 géneros: *Magnolia*, *Talauma* y *Liriodendrom*. En México tenemos 12 especies y 3 subespecies de *Magnolia* (Watanabe *et al.*, 2002; Sánchez-Velásquez y Pineda-López, 2010).

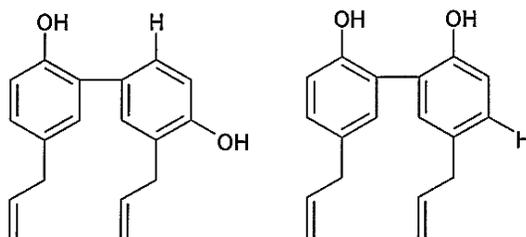
Entre las especies de *Magnolia*, *M. obovata* y *M. officinalis* han sido realmente importantes en la medicina herbal tradicional china y japonesa: su corteza se utiliza en casos de diarrea, flatulencia, amenorrea, pirosis y una variedad de enfermedades gastrointestinales gracias a sus diversas propiedades farmacológicas (Figura 4) (Stuart, 1969).



**Figura 4.** Propiedades farmacológicas de la corteza de Magnolia (Tomado de Watanabe *et al.*, 2002).

El género *Magnolia* es una fuente rica de compuestos con actividad biológica a los cuales se deben sus efectos farmacológicos. Éstos compuestos se agrupan en tres tipos: alcaloides, aceites esenciales y bifenoles. El honokiol y el magnolol (Figura 5) son los compuestos bifenólicos más comunes en *Magnolia*. Éstos son isómeros posicionales que exhiben actividad de relajación muscular, inhiben la movilización intracelular del calcio en plaquetas causada por el colágeno, así como su influjo en canales de calcio, tienen

efectos antihemostáticos, antitrombóticos, ansiolíticos y actividad antibacterial. El honokiol induce la movilización de calcio y muestra actividad neurotrófica en neuronas corticales, además de un efecto antagónico en la calmodulina. El magnolol, por su lado, tiene efectos analgésicos y anti-inflamatorios (Sarker *et al.*, 2002; Kotani, 2005; Martínez *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Estructuras del Honokiol y Magnolol.

La especie endémica de México, *Magnolia dealbata* Zucc., fue descubierta en el siglo XVI por Francisco Hernández, y formalmente descrita por Zuccarini (1837). Luego de ello, no se tiene ningún reporte de esta especie hasta 1948 y 1960, cuando Coneurse y Rzedowski colectaron especímenes (Gutiérrez y Vovides, 1997). Hernández también llegó a señalar el uso que los aztecas tenían de este árbol, al cual llamaban *Eloxóchitl*-del náhuatl- Elotl oreja y Xóchitl flor (Gutiérrez, 1993; Pattison, 1985).

Debido al desconocimiento que por muchos años existió sobre *M. dealbata*, existen escasos trabajos de esta especie. Pese a ser nativa y endémica de México, no está tan ampliamente analizada como el resto de las especies del mismo género. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones muestran que las Magnolias conservan estructuras primitivas, por lo que representan un gran interés desde el punto de vista evolutivo, taxonómico y ecológico (Gutiérrez, 1993).

*Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae), crece en los bosques nublados, y está distribuida en los estados de Oaxaca, Querétaro, Veracruz, Hidalgo, San Luis Potosí, y

Nuevo León (Sánchez-Velásquez *et al.*, 2010). Es usada en el centro de México como diurético, ansiolítico, anti-hipertensivo, contra la disentería, dolor de estómago, gripe, asma y cáncer (De la Cruz, 1964; Domínguez-Yescas, 2012) así como para combatir afecciones respiratorias y circulatorias (Pijoan, 2003).

En estudios recientes se ha encontrado que la sarcotesta (cubierta carnosa de las semillas) de *M. dealbata* contiene metabolitos secundarios con actividad insecticida contra adultos de *Anastrepha ludens* (mosca de la fruta mexicana), lo que sugiere que son igual de potentes que las piretrinas naturales, y representan un método potencial para controlar dicha plaga (Flores-Estévez *et al.*, 2013). Asimismo, el extracto etanólico de las semillas de *M. dealbata* ejerce actividad citotóxica, apoptótica y quimiopreventiva en células humanas cancerosas MDA-MB231 (Alonso-Castro *et al.*, 2014); además, sus principios activos, el honokiol y el magnolol estimulan la captación de glucosa en murinos insulina-sensibles y resistentes, y en los adipocitos humanos utilizando la vía de señalización de la insulina (Alonso-Castro *et al.*, 2011).

Esta especie está amenazada de extinción debido a la utilización de su madera para fabricación de utensilios, material de construcción y leña, así como por la colecta de su corteza y flores para su uso en medicina tradicional contra enfermedades del corazón, como ocurre en Veracruz y otros estados en los que crece. La amenaza más grave se debe a una intensa cosecha de flores por puros propósitos ornamentales, aunado a que la planta sufre de una pobre regeneración natural. Actualmente, la legislación mexicana la considera en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT-2001 (DOF, 2002) y se encuentra en el Red Data Book desde 1994, también está considerada en peligro por la International Union for Conservation of Nature (Gutiérrez y Vovides, 1997; Velasco-Macías, 2008; Sánchez-Velásquez y Pineda-López, 2010, Cicuzza *et al.*, 2007).

Dicho árbol cumple con ciertos puntos mencionados anteriormente para ser considerado un buen modelo de estudio: es endémico de nuestro país y cuenta con

historia etnobotánica relacionada a la medicina, además de encontrarse gravemente amenazada.

Nuestro grupo de trabajo ha encontrado microbios asociados de este árbol con diversas actividades biológicas. Inicialmente se aislaron 55 bacterias y 52 hongos, de los cuales se encontraron bacterias con actividad antimicrobiana, citotóxica y parasiticida (Manterola, 2011; Guzmán-Trampe, 2012; Lemus, 2013), así como hongos con actividad antibacteriana (Espinosa-Gómez, 2012).

### 1.5 El género *Geomyces*

Los hongos del género *Geomyces* están presentes en ecosistemas diversos, y se encuentran asociados a suelos del permafrost del Ártico, aunque muchos pueden crecer bien a temperatura ambiente. Son prevalentes en el aire de las viviendas domésticas y areneros de los niños, así como también pueden encontrarse en ambientes marinos. Son capaces de adaptarse a temperaturas muy frías cuando el agua líquida es escasa, y las bajas temperaturas ambientales provocan cambios fisiológicos que promueven la supervivencia, el crecimiento y la reproducción. Sus especies tienden a ser queratinofílicas y psicrófilas, halotolerantes y pueden tomar celulosa como fuente de alimento (Hayes 2012; Sigler y Charmichael 1976; Van Oorschot, 1980).

Traaen (1914) describió cuatro especies (*Geomyces auratus*, *Geomyces cretaceus*, *Geomyces sulphureus* y *Geomyces vulgaris*) cuando introdujo el género; de la cual sólo la cepa de *Geomyces auratus* permanece. A pesar del pequeño número de especies descritas, *Geomyces* tiene una distribución mundial, y las especies conocidas en este género están especialmente ubicados en los suelos de los ecosistemas templados y de alta latitud (Kirk *et al.*, 2008), siendo muy común en los suelos de las regiones más frías (Carmichael, 1962; van Oorschot, 1980; Rice y Currah, 2006; Domsch *et al.*, 2007; Loque *et al.*, 2009.; Goncalves *et al.*, 2012).

*Geomyces* spp. genera conidios pequeños, unicelulares, ovalados o en forma de pera (artroconidias) de hifas ramificadas, que existen en racimos en forma de árbol, con el apoyo de conidióforos (Sigler y Carmichael, 1976, Currah, 1985, Sigler *et al.* 2000, Rice y Currah 2005).

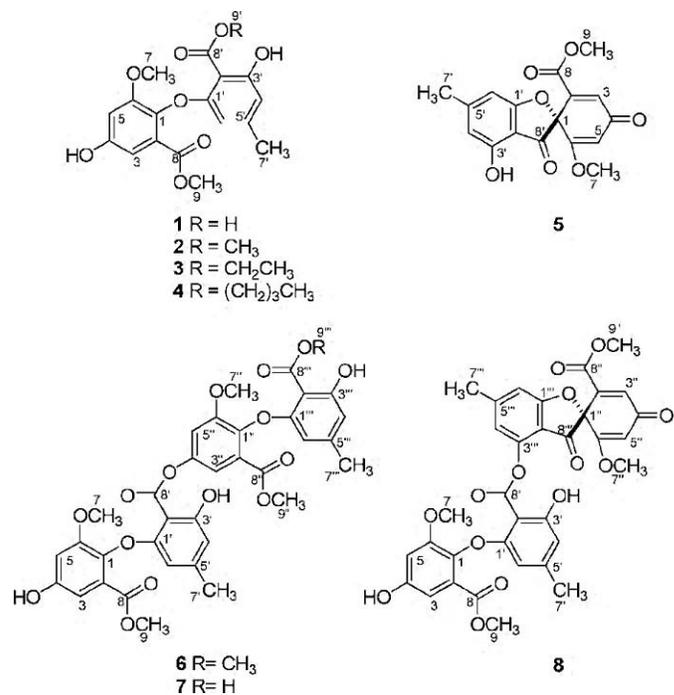
El proceso taxonómico en este grupo avanza lentamente, es por esto que *Geomyces* y *Chrysosporium*, se utilizan con frecuencia en la literatura (y erróneamente) como similares (Minnis y Lindner, 2013), cuando son morfológicamente diferentes. Actualmente, se incluye como parte de los Heliotales: *Ascomycota*; *Saccharomyceta*; *Pezizomycotina*; *leotiomyceta*; *sordariomyceta*; *Leotiomycetes*; *Leotiomycetes incertae sedis*; *Pseudeurotiaceae*; mitosporic *Pseudeurotiaceae*. Existe cierta discrepancia al respecto, ubicándolo también dentro de los Onygenales y con tanta polémica y recientes cambios todavía no ha llegado a consolidarse el género.

De acuerdo a las bases de Index Fungorum, *Mycobank* y NCBI, entre sus especies encontramos a:

- |                           |                         |                         |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ➤ <i>G. auratus</i> ,     | ➤ <i>G. cretaceus</i> , | ➤ <i>G. vinaceus</i> ,  |
| ➤ <i>G. asperulatus</i> , | ➤ <i>G. pulvereus</i> , | ➤ <i>G. lucifigus</i> , |
| ➤ <i>G. laevis</i> ,      | ➤ <i>G. sulphureus</i>  | ➤ <i>G. luteus</i>      |

Poco se sabe aún de este género, pero se ha visto que los *Geomyces* son productores de ácido astérico, el cual inicialmente mostró ser un inhibidor de la endotelina (Ohashi, *et al.*, 1992), y de hecho, hace poco se encontraron cinco nuevos derivados del mismo a partir de cultivos de *Geomyces* sp., aislado de la Antártida, donde el ácido astérico (Figura 6.1) y el metil asterrato (Figura 6.2) resultaron ser los componentes mayoritarios. Su extracto orgánico presentó actividad antifúngica significativa contra *Aspergillus fumigatus* (ATCC 10894) y actividades antibacterianas frente a

*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus pneumoniae* (CGMCC 1,1692), y *Escherichia coli* (CGMCC 1,2340) (Li *et al.*, 2008).



**Figura 6.** Moléculas obtenidas de *Geomyces* sp., aislado de la Antártida (Tomado de Li *et al.*, 2008). (1) Ácido astérico, (2) Metil asterrato, (3) Etil asterrato, (4) n-butil asterrato, (5) Bisdichlorogedina, (6) Geomicina A, (7) Geomicina B, (8) Geomicina C.

## 2. JUSTIFICACIÓN

---

Al ser las plantas reservorio de microorganismos potenciales para la producción de diversos compuestos de interés biomédico, y considerando las pautas propuestas por Strobel *et al.* (2004) para la elección de una planta de interés, en este trabajo nos enfocamos en especies endémicas de México de importancia etnomédica como *Magnolia dealbata* Zucc., ya que es un modelo de estudio interesante para la búsqueda de microorganismos asociados a la misma, con actividades biológicas potencialmente benéficas para el ser humano.

Además, en estudios recientes se han hallado bacterias asociadas a este árbol con actividad antimicrobiana, citotóxica y parasiticida (Manterola, 2011; Guzmán-Trampe, 2012; Lemus, 2013), así como hongos con actividad antibacteriana (Espinosa-Gómez, 2012).

## 3. HIPÓTESIS

---

El potencial sintético de los hongos y los estudios realizados en *M. dealbata* Zucc., permiten postular que sus hongos asociados serán capaces de producir compuestos con al menos una actividad biológica, diferente a la antimicrobiana.

## 4. OBJETIVO

---

Encontrar posibles actividades biológicas en un hongo asociado a *Magnolia dealbata* Zucc.

### Objetivos Particulares

- Seleccionar del hongo de trabajo
- Identificar y caracterizar el hongo elegido.
- Evaluar el potencial del hongo asociado a *M. dealbata* Zucc. para generar actividad antifúngica.
- Evaluar el potencial del hongo asociado a *M. dealbata* Zucc. para generar actividad herbicida.
- Evaluar el potencial del hongo asociado a *M. dealbata* Zucc. para generar actividad tripanocida.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1 Aislamiento de poblaciones de microorganismos asociados a la especie *Magnolia dealbata* Zucc.

A partir de muestras de tejido vegetal tomadas por la M. en C. Silvia Margarita Guzmán Trampe, de dos árboles de *Magnolia dealbata* Zucc. (Figura 7) localizados en las coordenadas 19° 21' 05.9'' N y 97° 03' 30.8'' W entre las localidades de Ixhuacán de



los Reyes y Coatepec, en el estado de Veracruz, Méx. a una altura aproximada de 1591 msnm (bosques de niebla) se aislaron cepas fungales que fueron conservadas a 4 °C en medio sólido en cajas Petri y en tubo inclinado, y las esporas en solución salina isotónica (SSI) (Guzmán-Trampe, 2012). El ejemplar de respaldo “voucher” colectado por el M. en C. Álvaro Campos se encuentra depositado en el Herbario de la Estación de Biología Tropical de los Tuxtlas con el número de colecta 6469.

**Figura 7.** Fotografía de uno de los individuos del árbol *Magnolia dealbata* Zucc.

Con anterioridad se había buscado actividad antimicrobiana generada por los hongos presentes en esta planta, y aquellos que inicialmente la mostraron comparten una gran similitud con el género *Penicillium* (*Penicillium chrysogenum*, *Penicillium commune*) y *Fusarium* sp., entre otros, debido a que no nos enfocamos en este proyecto en la actividad antibacteriana, se le puso mayor atención a uno que era morfológicamente

diferente y que tenía ciertas características de interés, como la producción de pigmentos, el hongo 31A-Ba.

## **5.2 Corroboración de la actividad antimicrobiana con pruebas de antibiosis**

Inicialmente se hicieron pruebas de antibiosis por el método Kirby-Bauer (Joklik *et al.*, 1999) con 4 cepas sensibles: la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 1129); las Gram-positivas *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), además de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), con las cuales se evaluó un amplio espectro antimicrobiano para corroborar que se mantuviera la actividad antimicrobiana por parte del hongo evaluado.

Otro método usado para verificar la actividad antimicrobiana, fue enfrentando las cepas sensibles contra el organismo fúngico en una misma caja, al estar todos los microorganismos estriados dentro de la misma.

## **5.3 Caracterización del hongo 31A-Ba**

Se realizó la cosecha y cuantificación de conidios como se reportó en un trabajo anterior de nuestro laboratorio (Espinosa-Gómez, 2012), con la diferencia de que los medios utilizados, en este caso fueron el PDA Merck® (Potato Dextrose Agar) y el PDB Difco® (Potato Dextrose Broth). Asimismo, se hizo una cuantificación de conidios viables, plaqueando 100 µL de aquellas diluciones superiores a la  $10^{-5}$  en cajas Petri con medio PDA; considerando como contables solamente las cajas que tengan de 25 a 250 colonias, de las cuales se multiplicarán por el factor de dilución respectivo para obtener el cálculo aproximado de conidios viables/mL.

A partir de las alícuotas obtenidas se realizaron los experimentos posteriores, y obtención de más esporas. Al mismo tiempo, se realizó la conservación de sus conidios en gel de sílice, luego de cosecharse de medio PDA y posteriormente lavarse (Espinosa-Gómez, 2012).

## **5.4 Microcultivo**

Para analizar la morfología microscópica (el micelio y la estructura) del hongo electo se realizaron microcultivos con portaobjetos en cámara húmeda como se describió en el trabajo previamente mencionado (Espinosa-Gómez, 2012).

## **5.5 Cinética de crecimiento del hongo 31A-Ba**

Con el fin de encontrar el medio más adecuado para la producción de compuestos con actividad biológica, se probaron los medios Sabouraud con 0.5 % glucosa y caldo de Papa Dextrosa en una cinética de crecimiento, resultando mejor el de papa, por lo que de aquí en adelante siempre se utilizó como medio preferente, tanto en sólido como líquido. Para lo anterior, se inocularon matraces de 250-mL con 50 mL del medio a probar, y se introdujeron en el cuarto de incubación a 29°C, 180 rpm en una agitadora orbital AGO 60-90 (Prendo ®) durante 15 días, tomando muestras de 1 mL de cada matraz diariamente para medir su biomasa por peso seco, y el pH generado con un potenciómetro Microprocessor pH Meter (HANNA Instruments).

El procedimiento con el cual se hizo dicha cinética está igualmente reportado anteriormente (Espinosa-Gómez, 2012).

## **5.6 Pruebas bioquímicas para la caracterización del hongo**

Al hongo 31A-Ba se le realizaron pruebas bioquímicas para complementar su estudio: API 20C (Biomerieux®), así como de asimilación de almidón y celulosa. Éstas últimas son rápidas y sencillas. Se realizan al inocular el hongo en tubos con un medio mineral sin fuente de carbono, sustituyéndolo por tiras de papel filtro, que es donde crecerá el microorganismo en caso de poder utilizar la celulosa presente (capacidad celulolítica); en el caso de la prueba amilolítica, se inocula el hongo en estría en un medio con almidón, PDA por ejemplo, y luego de un par de semanas de crecimiento se pone en

presencia de cristales de yodo, lo que teñirá al almidón presente en la caja, mostrando un halo incoloro en caso de que el hongo haya asimilado el almidón para su desarrollo.

El ensayo bioquímico API 20 C se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor Biomériux® y aunque dichas pruebas no están pensadas para hongos filamentosos hay reportes que demuestran que son útiles en tales casos (Spinel-Ingroff *et al.*, 1989; Chaturvedi *et al.*, 2010).

## **5.7 Identificación de la cepa 31A-Ba**

### **5.7.1 Extracción y aislamiento del DNA genómico**

El aislamiento del DNA genómico del hongo es necesario para las metodologías de biología molecular siguientes, así que se debe obtener en condiciones óptimas.

Esto se logró con base en un protocolo modificado de Akins y Lambowitz (1985), el cual consiste en una lisis mecánica en buffer TE (Tris EDTA) y extracciones con fenol-cloroformo y alcohol isoamílico a partir del micelio obtenido en su etapa de crecimiento exponencial, permitiendo la rápida obtención del DNA, para ser purificado (Anexo 2). Es necesario verificar que se haya obtenido DNA genómico íntegro, para lo que se realizaron geles de agarosa al 0.8% (Anexo 2).

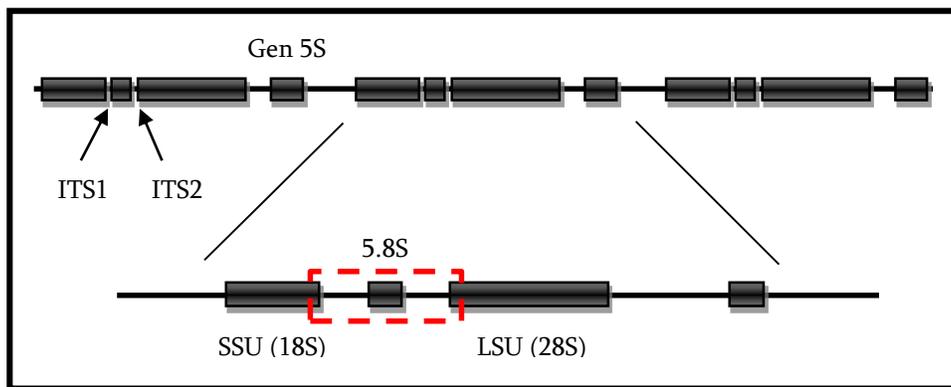
Una vez aislado, purificado y analizado por electroforesis, se determinó la concentración del DNA por espectrofotometría a 260 nm en un BioPhotometer plus (Eppendorf).

### **5.7.2 Amplificación por PCR de la región del DNA ribosomal 5.8S**

Para la identificación del hongo, se amplificó la región 5.8S del DNA r y los espaciadores transcritos colindantes (Figura 8) por PCR (kit BioTecMol®), con oligos universales (Invitrogen®) para eucariontes: ITS1-F Fwd (CTTGGTCATTTAAGAGGAAGTAA) e ITS4-A Rev (CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG), de acuerdo a la mezcla de reacción, en el orden y con las cantidades usadas reportadas en la Tabla 2.

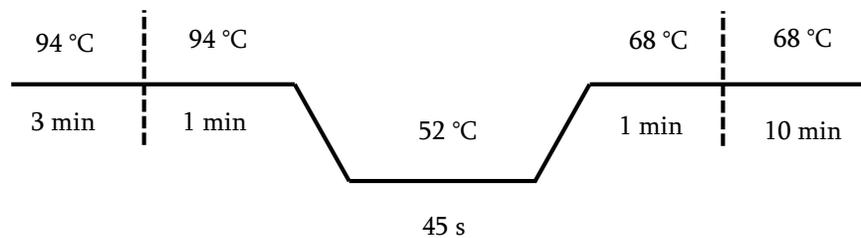
**Tabla 2.** Reactivos y concentraciones usados para realizar el PCR.

Reactivo	$\mu\text{L}/50 \mu\text{L}$ reacción
H <sub>2</sub> O	30.5
Buffer 10x	5
MgCl <sub>2</sub> [1.5 mM]	2.5
dNTPs [1.25 mM]	8
Oligo Fwd [20 pM]	1
Oligo Rev [20 pM]	1
DNA genómico [150 ng/ $\mu\text{L}$ ]	1
TaqAmplificasa	1



**Figura 8.** Región 5.8S junto con los ITS1 e ITS2, delimitado por 18S (SSU) y 28S (LSU). En el recuadro rojo se marca la secuencia amplificada con los oligos ITS1F e ITS4A.

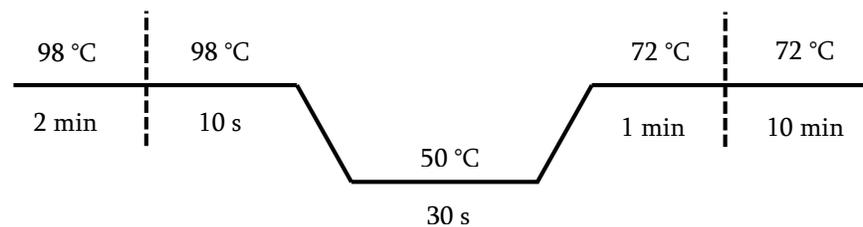
La reacción de PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos bajo las siguientes condiciones:



Para corroborar el tamaño del producto de PCR esperado (600 pb) se corrieron las muestras en un gel de agarosa, y luego se escaló la reacción bajo las mismas condiciones. Los amplicones resultantes fueron purificados de gel con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega Corporation (2800 Woods Hollow Road Madison, WI 53711-5399 USA), siguiendo las indicaciones del proveedor.

El amplicón se ligó al plásmido pJET1.2/blunt de Thermo Scientific® y se transformó en *E. coli* DH5α. Se verificó que el amplicón estuviera dentro del plásmido realizando una digestión con la enzima de restricción *Xba*I (Promega®) que corta una vez al plásmido, linearizándolo, con lo que se espera una banda de aproximadamente 3500 pb (Figura 3B).

Para descartar que estuviéramos trabajando con una especie patógena se realizó un PCR con los oligos específicos (1506)-184'-Gd y 5.8S-144-3'-Gd para *G. destructans*, siguiendo las indicaciones reportadas por Lorch *et al.* 2010:



Posteriormente se realizó un análisis en el programa de análisis filogenético MEGA 6 puesto en MUSCLE para alinear la secuencia resultante (516 nt) con 93 taxa de diversos estudios (Rice y Currah, 2006; Gargas *et al.*, 2009; Minnis y Lindner, 2013), comparando así las especies cercanas. Se construyó un árbol filogenético de máxima parsimonia utilizando como *outgroup* un grupo de heliotales, con 1000 repeticiones.

## 5.8 Búsqueda de actividad biológica

### 5.8.1 Obtención del extracto total del hongo 31A-Ba

Para la obtención del extracto total para los ensayos subsecuentes en búsqueda de actividades biológicas se llevaron a cabo a la par, una fermentación líquida en 1 L de PDB, partiendo de un pH de  $5.6 \pm 0.2$  en matraces Fernbach-2.8 L a 180 rpm en incubadora orbital AGO 60-90 (Prendo ®), y una sólida en 300 g de arroz con 500 mL de agua estéril, de igual forma en matraces Fernbach-2.8 L incubados durante 40 días, ambos a una temperatura de 29 °C. Se utilizó arroz, ya que en la mayoría de los hongos se mejora el rendimiento de los compuestos obtenidos.

Una vez transcurrido el periodo de incubación se separó el medio de cultivo del micelio, mediante una filtración utilizando gasa. El micelio húmedo obtenido se sometió a un proceso de maceración con Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (500 mL x 7). Inmediatamente después y con el mismo procedimiento se realizaron extracciones con Acetato de etilo (AcOEt) (500 ml x 7). Los extractos del medio de cultivo se obtuvieron realizando particiones sucesivas empleando también  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt como disolventes de extracción.

Las fases orgánica resultantes se filtraron y se concentraron al vacío con un rotavapor Buchi® R-215 a una temperatura de baño de 60 °C, teniendo agua como refrigerante a 8 °C y con un vacío de 240 mbar para el AcOET, y presión atmosférica para el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Cada uno de los extractos obtenidos a partir de ambos cultivos se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck) con una mezcla de elución diclorometano-metanol (95:5) (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

Finalmente, con éstos se hizo la búsqueda de actividades biológicas contra semillas de amaranto y jitomate, contra hongos fitopatógenos (en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava) así como contra el parásito

causante de la enfermedad de Chagas (en colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez).

## **5.8.2 Bioensayo de Potencial Antifúngico**

Para este experimento, previamente se crecieron en caja a temperatura ambiente al menos 10 días antes de la evaluación biológica 4 organismos fitopatógenos: 2 eumicetos (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*) y 2 oomycetos (*Phytium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*).

### **5.8.2.1 Por difusión del extracto total**

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 20 mg de cada extracto o fracción y se disolvieron en 0.1-0.3 mL de metanol, posteriormente, se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril y 40 mL de PDA al 2 %, para obtener una concentración final de 250 ppm. En cada caja de Petri se colocaron 5 mL de la disolución y se dejaron solidificar, enseguida, se colocó en el centro de cada caja un inóculo de 0.5 cm de diámetro del microorganismo de prueba. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

Las cajas se incubaron de 3 a 4 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad (12:12 hrs) con luz fluorescente. Como controles negativos se utilizaron PDA (1 %) y PDA 1 %/metanol (0.1-0.3 mL), y como se usaron los compuestos comerciales metalaxil y carbendazim a una concentración de 100 ppm como controles positivos, respectivamente.

Al final del bioensayo se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio de cada repetición y de cada especie de hongo de prueba (Sánchez-Fernández, 2010).

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD utilizando el programa GraphPad Prism 5 (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

#### **5.8.2.2 Por antagonismo de *Geomyces* sp.**

Cada microorganismo competidor se sembró utilizando inóculos de 5 mm de diámetro de los micelios de los microorganismos previamente incubados en PDA por 10 días.

Los inóculos se colocaron equidistantes ocupando sólo un extremo de la caja Petri, éstas se incubaron a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad naturales (12:12 hrs). Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar (Sánchez-Fernández, 2010). Se revisaron las colonias a los 2, 4 y 7 días de cultivo.

Los resultados de crecimiento se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes competidores, comparando su crecimiento con respecto a los controles de crecimiento de acuerdo con la siguiente fórmula:

$(a-b/b) \times 100$ , donde a y b son los radios de *Geomyces* sp. 31A-Ba y de los diferentes competidores.

#### **5.8.3 Bioensayo de Potencial Herbicida**

Para corroborar la eficacia de los compuestos obtenidos en los extractos del hongo 31A-Ba se hizo la determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y la longitud de la raíz de dos plantas modelo: *Lycopersicon esculentum* (jitomate) y *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto).

Los bioensayos de fitotoxicidad se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 7 mg de extracto o fracción y se disolvieron en 0.1-0.3

mL de metanol. Posteriormente, se agregaron 35 mL de agua destilada y 35 mL de agar al 2 %, para obtener una concentración final de 100 ppm. 5 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas de Petri y se dejaron solidificar por completo. A continuación, se sembraron 10 semillas por caja, de cada una de las especies modelo.

Las cajas de Petri se incubaron en la oscuridad a 27 °C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las raíces después de 24 hrs para el caso de amaranto y 72 hrs para el jitomate. Paralelamente, se evaluaron los controles negativos: agar-agua al 1 % y agar-agua al 1 %/metanol (0.1-0.3 mL). Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado bajo un diseño completamente al azar (Sánchez-Fernández, 2010).

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa GraphPad Prism 5 (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

Tanto las pruebas herbicidas y antifúngicas se realizaron gracias a la colaboración de la M. en C. Brenda Lorena Sánchez Ortiz y la QFB. Rosa Elvira Sánchez Fernández, dentro del grupo de trabajo de la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, en el Instituto de Química, UNAM.

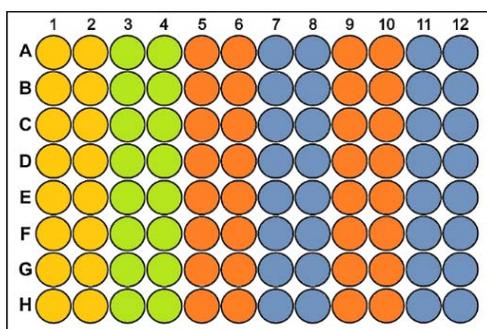
#### **5.8.4 Bioensayo de Potencial Tripanocida**

Para el ensayo tripanocida se utilizó la cepa Querétaro de *Trypanosoma cruzi*, que es endémica de México; se considera más infectiva y resistente que la cepa Brenner de Brasil. Inicialmente se preparó un stock de cada extracto obtenido, con una concentración de 20 mg en 1 mL de DMSO (Dimetil sulfóxido), que sirve como vehículo. Se realizó un conteo de epimastigotes de *T. cruzi* en cámara de Neubauer haciendo una dilución 1:50 con PBS 1X, de un cultivo previo en medio LIT (Liver Infusion Tryptose), el cual se incubó de 3-4 días, a 37 °C,.

En una placa de cultivo celular de 96 pozos (Figura 9) se agregaron 148.5 o 149.25  $\mu\text{L}$  de medio LIT, 1.5 o 0.75  $\mu\text{L}$  de muestra (para alcanzar concentraciones de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente), y 50  $\mu\text{L}$  de medio LIT con una densidad de parásitos de  $1 \times 10^6$  epimastigotes/ $\text{mL}$ , por triplicado para cada tratamiento, y se incubó a 37 °C durante 3 días. A las 48 y 72 h, se hicieron los conteos de epimastigotes en la cámara de Neubauer (dilución de 1:10 o 1:20 con PBS 1X, según se requiera) (Figura 9), observando la movilidad y la muerte de los parásitos. Como controles positivos se usaron las drogas comerciales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, el benznidazol (Radanil Roche®) y el nifurtimox (Lampit Bayer®), ambas a una concentración de [100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ( $\alpha = 0.05$ ) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa GraphPad Prism 5 (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

Dichas pruebas se realizaron en colaboración con la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez y el M. en C. Ignacio Martínez Martínez, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



**Figura 9.** Diagrama de la colocación de las muestras para la prueba de 96 pozos. Amarillo: Medio LIT y Medio LIT + DMSO, Verde: controles positivos (Benznidazol y Nifurtimox), Naranja: extracto orgánico de medio de cultivo (SN) a 75 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Azul: controles negativos de PDB a 75 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Naranja: extracto orgánico de cultivo en arroz a 75 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Azul: controles negativos de arroz a 75 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

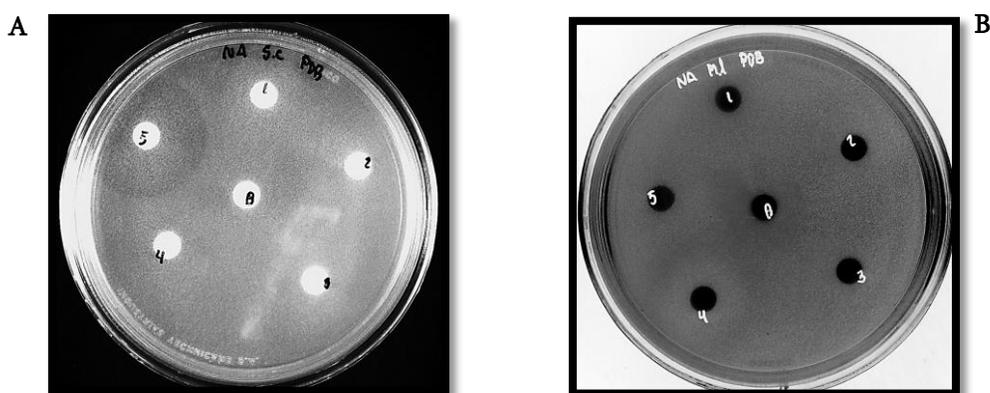
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 6.1 Selección del hongo de trabajo

Se aislaron 11 hongos de *Magnolia dealbata* Zucc. con actividad antibacteriana. De éstos, 9 eran parecidos entre sí, con morfología, esporas y color similares a las especies pertenecientes al género *Penicillium*; diferente a éstos, el hongo 31A-Ba además de tener ligera actividad antibiótica presentó una capacidad psicotolerante, actividad de agarasa y una producción abundante de un pigmento rojizo, por estas características fue elegido para ser nuestro modelo de estudio.

Se confirmó la presencia de su actividad antimicrobiana por difusión (Joklik *et al.*, 1999) con el medio de cultivo concentrado obtenido a partir de fermentaciones líquidas en PDB, y se probó contra las cepas microbianas sensibles, donde se encontró que inhibía a *Micrococcus luteus* y *Saccharomyces cerevisiae* (10 y 22 mm de halo inhibitorio, respectivamente) (Figura 10). Cuando el filtrado proviene del medio Sabouraud dextrosa, es menor la capacidad antibiótica mostrada (<10mm de halo de inhibición).



**Figura 10.** Pruebas de antibiosis en agar nutritivo en los primeros 5 días de la fermentación. A) Contra *Saccharomyces cerevisiae*. B) Contra *Micrococcus luteus*.

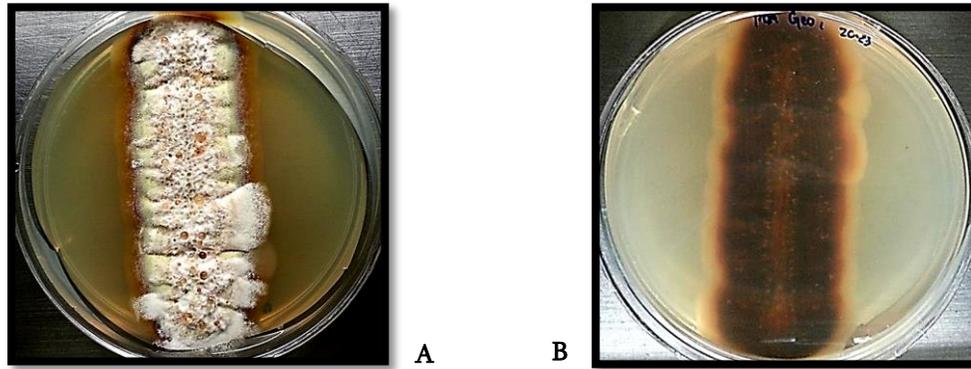
Posterior a esto se empezó la búsqueda de otras actividades biológicas y caracterización de las mismas.

## 6.2 Caracterización morfológica

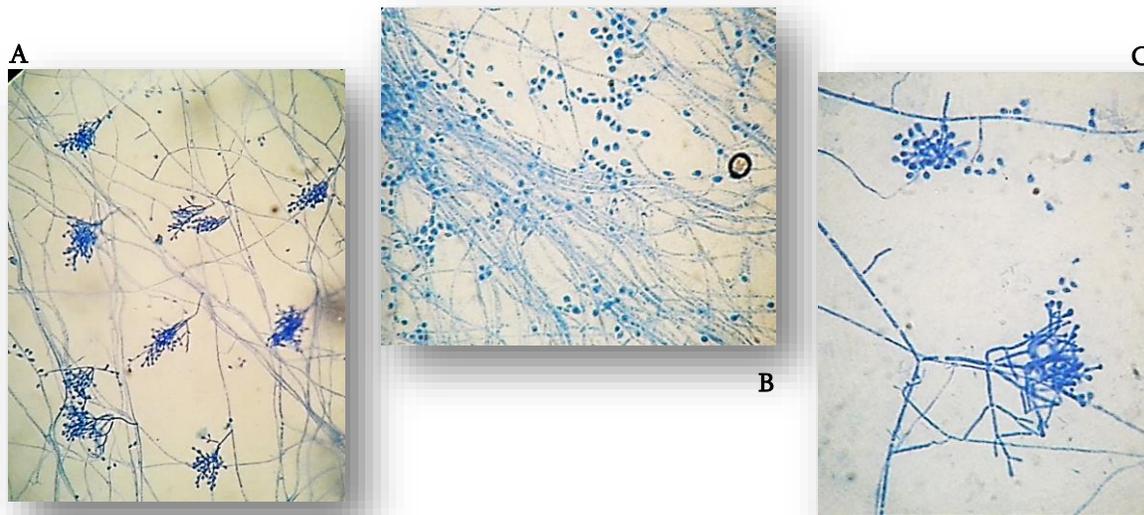
Para la caracterización del hongo se realizó primeramente una observación morfológica de las colonias. Con este fin, se cultivó al hongo 31A-ba en PDA donde se pudo observar un crecimiento amorfo limitado, de micelio aéreo blanco ligeramente rosado, con un micelio profundo oscuro y muy duro, el cual rompe el agar en el que se encuentra cultivado. Cabe mencionar que el hongo secreta una mezcla de pigmentos rojizos y amarillentos luego de varios días de crecido (Figura 11).

La siguiente prueba morfológica se hizo al microscopio para lo cual se hizo un microcultivo para apreciar las estructuras especializadas con sus conidios (Espinosa-Gómez, 2012). Se revisó la preparación a 40x y se encontró que el micelio es de menor tamaño que la mayoría de los hongos, aunque no lo suficiente para determinarse como microsifonado, por lo que se procedió a observarlo a 100x, donde fácilmente se comprobó que es hialino y septado, con conidios ligeramente ovalados (Figura 12B).

De acuerdo con las observaciones coloniales y microscópicas, luego de identificar al hongo 31A-ba como una especie indeterminada del género *Geomyces*, y ahondar en la literatura del mismo, se encontró que posee capacidad psicrotolerante por lo que se realizó nuevamente un microcultivo durante 15 días, ahora a una temperatura de 4 °C para verificar su morfología. De esta forma, se hace notable el aumento en la producción de conidios y se corrobora lo analizado anteriormente: micelio de diámetro pequeño, hialino, septado, y con conidios esféricos de gran tamaño, así como la existencia de conidióforos (Figura 12C); esto coincide con los reportes donde los describen con



**Figura 11.** El Hongo 31A-Ba en medio PDA. A) Micelio aéreo blanquecino. B) Micelio profundo y el pigmento rojizo producido.



**Figura 12.** El hongo 31A-ba creciendo en PDA con tinción azul de algodón. A) Conidióforos en objetivo 40x. B) Micelio pequeño donde se pueden ver los arthroconidios dentro del mismo, y esporas cuasi esféricas a 100x. C) Estructura conidiogénica con micelio hialino y septado a 100x.

conidios unicelulares pequeños ovalados o en forma de pera (arthroconidias) que existen en racimos en forma de árbol, con el apoyo de conidióforos, y con capacidad psicrófila o psicrotoletante (Hayes, 2012; Sigler y Carmichael, 1976, Currah, 1985, Sigler *et al.* 2000, Rice y Currah 2005).

### 6.3 Pruebas amilolíticas, celulolíticas y API

Con el fin de caracterizar las capacidades bioquímicas de la cepa 31A-ba, se realizaron la prueba API 20C y pruebas de actividad celulolítica y amilolítica. Para ello se probaron medios con cinco fuentes de almidón distintas (soluble, maíz, arroz, papa, y soya) y 3 temperaturas (4, 25 y 29 °C) como parte de su caracterización. Los de papa, soya y arroz fueron los mejores para su crecimiento y producción del pigmento rojizo, junto con la temperatura ambiente (25 °C), como se puede ver en la Figura 13A.

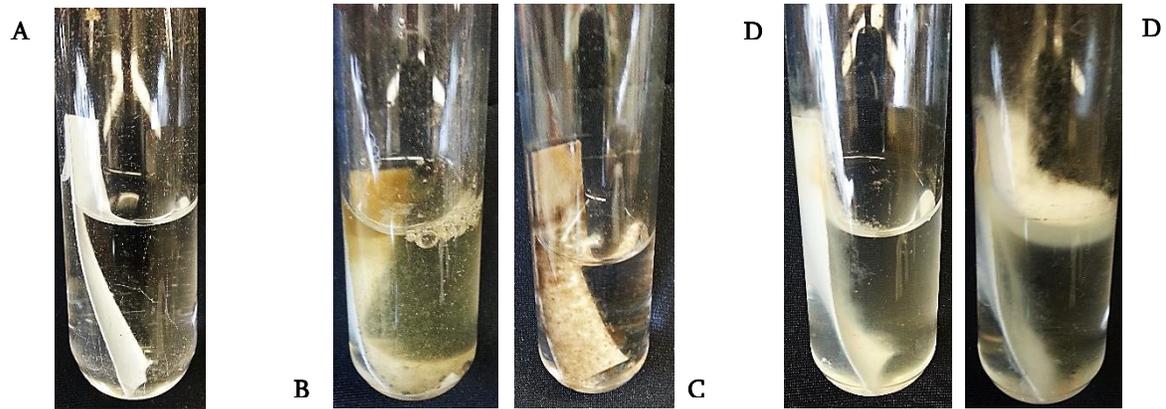
Posteriormente se comprobó la capacidad amilolítica que posee con una sencilla prueba, sublimando yodo en un medio con almidón de papa casero (Figura 13B), y un medio comercial (Difco®) (Figura 13C), siendo éste último el más fácilmente asimilable por el hongo, presentando el halo de mayor tamaño.



**Figura 13.** *Geomyces* sp. A) En medios con almidón: soluble, maíz, arroz, papa y soya (de abajo hacia arriba), a 3 temperaturas diferentes: 4 °C (izquierda), 20-25 °C (centro) y 29 °C (derecha). B) Prueba amilolítica en medio con almidón de papa casero. C) Prueba amilolítica en medio con almidón de papa comercial Difco®.

De acuerdo a la literatura (Hayes 2012; Sigler y Charmichael 1976; Van Oorschot, 1980), el género aquí trabajado suele presentar una actividad celulolítica, por lo que se realizaron pruebas para evaluar dicha capacidad (Figura 14), y se encontró que el hongo 31A-ba si manifiesta una actividad celulolítica, aunque debido a su lento crecimiento

puede apreciarse mejor luego de un mes transcurrido, a diferencia de los controles positivos (*Penicillium chrysogenum* y *Fusarium* sp.) en donde se nota en menos de una semana.



**Figura 14.** Pruebas celulolíticas en Czapek sin sacarosa y papel filtro como fuente de carbono. A) Papel filtro (control negativo). B) *Penicillium chrysogenum* (control positivo). C) *Fusarium* sp. (control positivo). D) *Geomyces* sp.

Como su crecimiento es más lento que las levaduras, para las cuales está pensada la prueba API 20C, las pruebas bioquímicas se dejaron más tiempo que el sugerido por los fabricantes (4h), y se incubó el hongo estudiado durante 7 días a 29 °C.

Aunque no hay reportes de la asimilación de fuentes de carbono por otras especies de *Geomyces* con las cuales se pueda comparar, en la Tabla 3 se presentan las fuentes de carbono que fue capaz de utilizar el hongo 31A-Ba, lo cual va acorde con su capacidad de adaptación y supervivencia ya mencionadas (Carmichael, 1962; van Oorschot, 1980; Rice y Currah, 2006; Domsch *et al.*, 2007; Loque *et al.*, 2009.; Goncalves *et al.*, 2012).

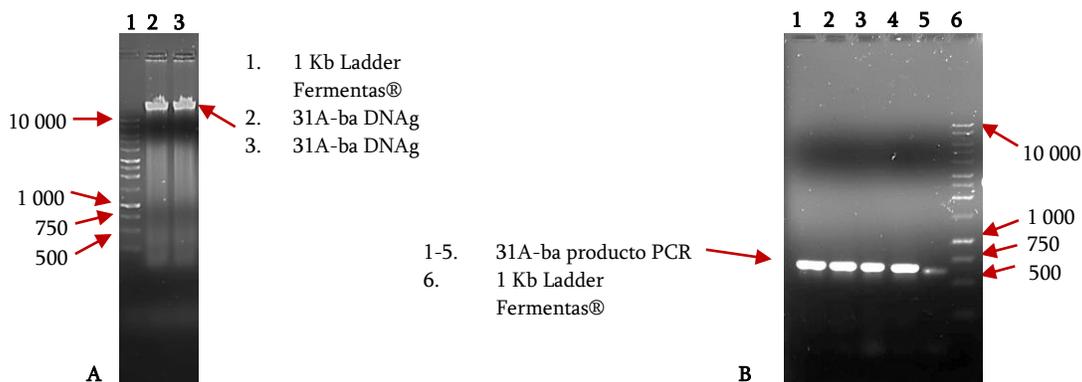
**Tabla 3.** Resultados de la prueba API 20C (Biomérieux ®) para la asimilación de fuentes de carbono.

Ensayo	Sustrato	Resultado
0	Ninguno	-
GLU	D-Glucosa	+
GLY	Glicerol	-
2KG	2-ceto-Gluconato cálcico	-
ARA	L-Arabinosa	+
XYL	D-Xilosa	+
ADO	Adonitol	+
XLT	Xilitol	-
GAL	D-Galactosa	+
INO	Inositol	-
SOR	D-Sorbitol	+
MDG	Metil- $\alpha$ D-Glucopiranosida	+
NAG	N-Acetil-Glucosamina	+
CEL	D-Celobiosa	+
LAC	D-Lactosa	-
MAL	D-Maltosa	+
SAC	D-Sacarosa	+
TRE	D-Trehalosa	+
MLZ	D-Melezitosa	-
RAF	D-Rafinosa	+

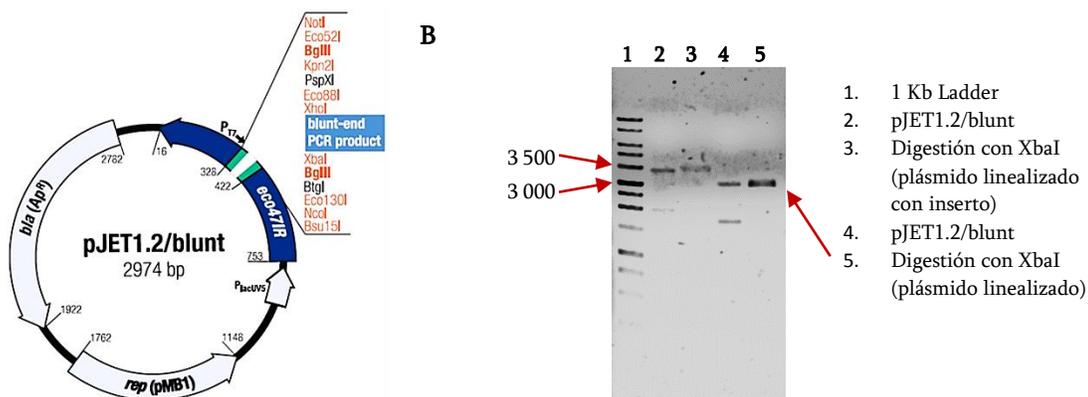
## 6.4 Identificación molecular

Con el fin de respaldar la identificación morfológica y bioquímica, se hizo un análisis a nivel molecular de la secuencia 5.8S del DNA ribosomal junto con los ITS1 e ITS2, ya que dicha región es considerada el código de barras de ADN formalmente utilizado en la identificación de las hongos (Schoch et al., 2012). Para ello se realizó la extracción del DNA genómico del hongo (Figura 15A), seguido de la amplificación del gen 5.8S con

los oligos ITS1 (CTTGGTCATTTAAGAGGAAGTAA) e ITS4A (CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG) con lo que esperamos una banda aproximada de 600 bp (Figura 15B), que es la región que abarca el ITS1F, el gen 5.8S y el ITS4A, junto con un poco de los genes 18S y 28S (Figura 8).



**Figura 15.** Geles de agarosa 0.8%. A) Obtención del DNA genómico de la cepa 31A-ba. B) Amplificación del gen 5.8S de la cepa 31A-ba.



**Figura 16.** A) Plásmido pJET1.2/blunt (Thermo Scientific®). B) Digestiones del plásmido pJET1.2/blunt con *XbaI* (Promega®).

La secuencia obtenida se presenta a continuación:

```
CATTACAGTAGTCGCCCCGGGTTGCCGCAAGGCTCCCGGGTAACCTACCACCCTT
TGTTTATTACACTTTGTTGCTTTGGCAAGCCTGCCCTCGGGCTGCTGGCTCCGGCC
GGCGAGCGCTTGCCAGAGGACCTAAACTCTGTTTGTCTATACTGTCTGAGTACTA
TATAATAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGT
CATTACAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGGCCCCGCGCCCCGGCGGGCCCT
AAAGTCAGTGGCGGTGCCGTCCGGCTCCGAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTCTGGA
GGTCCGGTCGTGTGCTCGCCAGCAACCCCCAATTTTTTTCAGGTTGACCTCGGAT
CAGGTAGGGATACCCGCTGAA.
```

El amplicón del tamaño esperado se clonó en el plásmido pJET1.2/blunt (Thermo Scientific®) (Figura 16A) y se digirió con la enzima de restricción *Xba*I (Promega®) el cual lo corta una vez, linearizándolo, con lo que se espera una banda de aproximadamente 3500 bp (Figura 16B), que es lo que corresponde a la región amplificada dentro del plásmido pJET1.2/blunt (Thermo Scientific®).

Tanto el simple producto de PCR como el plásmido con la región clonada fueron secuenciados y los resultados fueron sometidos a una búsqueda en la base de datos BLAST lo que arrojó una especie de *Geomyces* no reportada (Tabla 4). Esta clona nos ayuda a confirmar el resultado, ya que la secuencia está completa porque en el amplicón faltan los extremos, mientras que dentro del plásmido se amplifican hasta regiones parciales de los genes 18S y 28S.

Aunque usualmente está en suelos y ambientes fríos, no es tan raro encontrar a *Geomyces* en plantas, ya que se ha visto en semillas (Dalpe *et al.*, 1989) o formando asociaciones en raíces de éstas (Bacon y White, 2000; Ganley y Newcombe, 2006). Se propaga por las corrientes de aire, filtraciones en agua subterránea dentro de cuevas y

suelo, gracias a los artrópodos, en las plumas de las aves, pieles de los mamíferos, etc. (Hayes, 2012).

**Tabla 4.** Resultados de la comparación de secuencias de la cepa 31A-ba utilizando el programa BLAST.

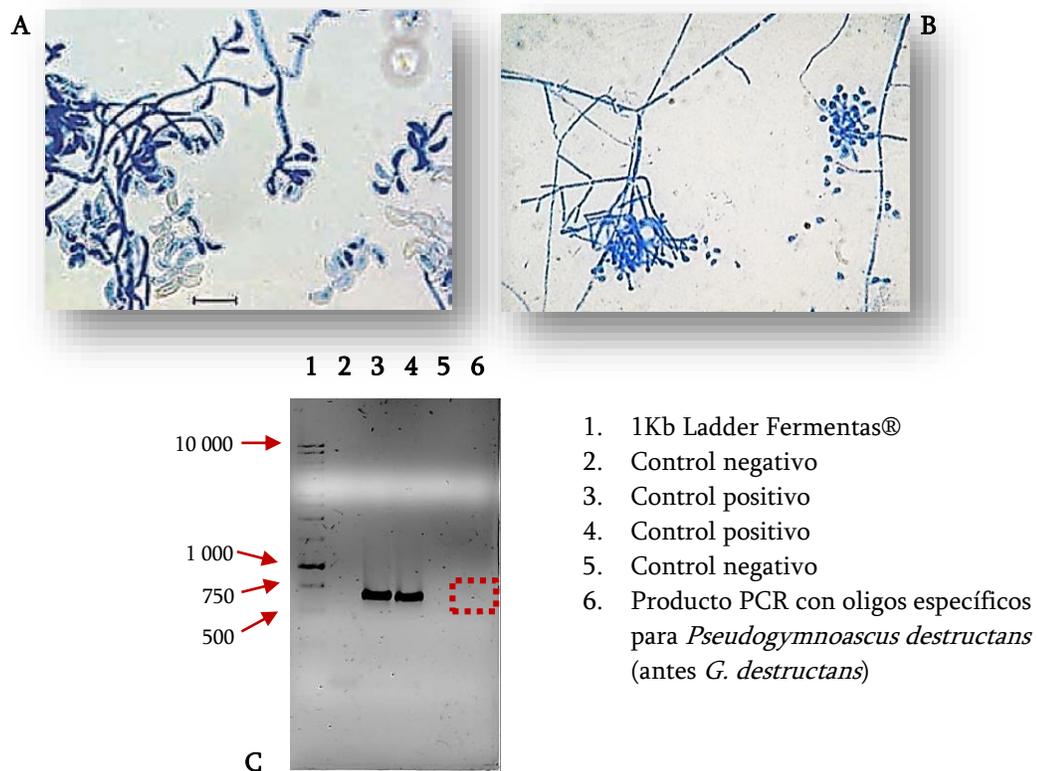
Hongo 31A-Ba	Query Length	Description	Max Score	Query coverage	E value	Max ident.
PCR	516	<i>Geomyces</i> sp.	1032	99%	0.0	99%
Clona	636	<i>Geomyces</i> sp.	1081	94%	0.0	99%

Miembros del género *Geomyces* son capaces de modificar su metabolismo en respuesta a condiciones abióticas desafiantes, incluyendo temperaturas muy frías y los bajos niveles de agua biológicamente disponible, y aparte de la capacidad queratinolítica se han reportado otras bioactividades, entre las que se encuentran la proteolítica, celulolítica, antimicrobiana y citotóxica (Hayes 2012; Li *et al.*, 2008; Sigler y Charmichael 1976; Van Oorschot, 1980) en algunos casos, las cuales son causadas en su mayoría por los compuestos derivados del ácido astérico (Figura 6.1) (Li *et al.*, 2008) péptido de 21 aminoácidos con propiedades vasoconstrictoras (Ohashi *et al.*, 1992).

Cuando se empezó este proyecto, la especie más estudiada era *G. destructans*, ahora anotado como *Pseudogymnoascus*, por ser la especie causante del Síndrome de Nariz Blanca (SWN), problema que aqueja las poblaciones de murciélagos en todo el planeta, ya que presenta actividad queratinolítica, disminuyendo así la población de murciélagos de forma notable (Blehert *et al.*, 2009). Se prosiguió con la caracterización del hongo 31A-Ba para poder hacer una exclusión con la especie patógena; y se ha encontrado que *P. destructans*, la especie responsable del Síndrome de la Nariz Blanca (WNS por sus

siglas en inglés), no son morfológicamente similares ya que sus conidios son curvos y de mayor tamaño (Figura 17A), además de no tener el micelio tabicado (Bleher *et al.*, 2009), pero es psicrotolerante al igual que el hongo aquí estudiado.

Por otro lado, se hizo una comparación a nivel molecular con los oligos (1506)-184'-Gd y 5.8S-144-3'-Gd, específicos para *P. destructans* porque amplifican el intron conservado 1506 y ciertos elementos de los ITS (Lorch, *et al.*, 2010), y así corroborar el parecido entre estas especies. Como se aprecia en la Figura 17C no hubo amplificación de la región buscada, lo que nos indica que no se tratan del mismo microorganismo.



**Figura 17.** El hongo 31A-ba creciendo en PDA con tinción azul de algodón. A) *Pseudogymnoascus* (antes *Geomyces*) relacionado al WNS (Bleher *et al.*, 2009). B) Estructura conidiogénica con micelio hialino y septado a 100x. C) Gel de agarosa 0.8% con amplicones realizados con oligos específicos de *P. destructans*.

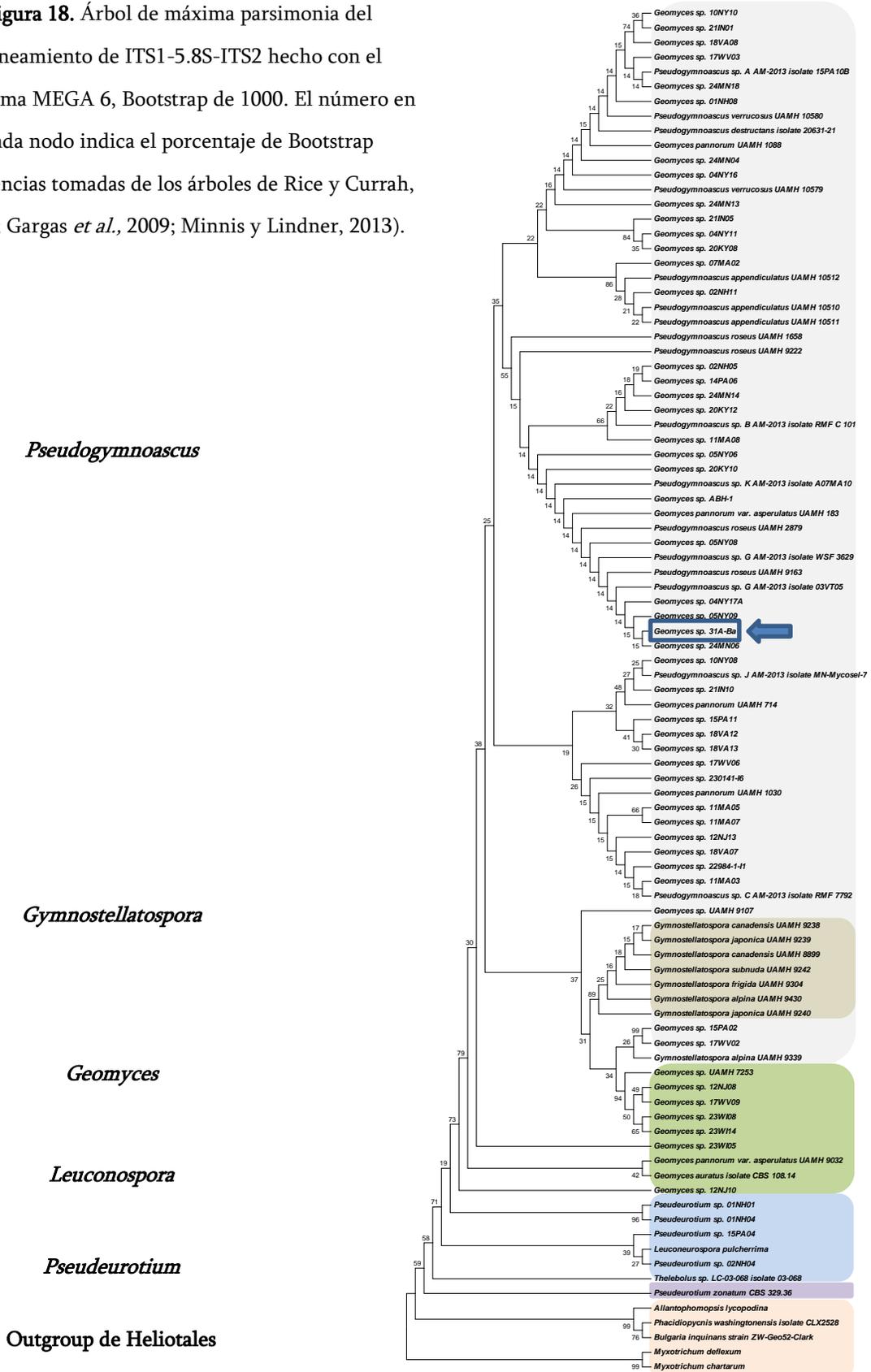
En el recuadro rojo se debería ver una banda si la especie estudiada se tratara de la misma especie.

Tras la extracción del DNA genómico del hongo y la amplificación del gen 5.8S e ITS alelaños con los oligos ITS1 (CTTGGTCATTTAAGAGGAAGTAA) e ITS4A (CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG), se elaboró un árbol (Figura 18) para ubicar al hongo elegido con todas las secuencias similares almacenadas en el GenBank según los estudios de Rice y Currah (2006), Gargas *et al.* (2009), Minnis y Lindner (2013); donde se describió a *Pseudogymnoascus destructans*, y demás especies relacionadas con *Geomyces*.

Este análisis permitió ubicar al hongo 31A-Ba dentro del clado de *Pseudogymnoascus* (Figura 18), aunque en el GenBank se encuentran varias secuencias de este clado anotadas como *Geomyces*, en el trabajo de Minnis y Lindner (2013) los describen como *Pseudogymnoascus*. Éstos 2 géneros suelen confundirse, y de hecho comparten muchas similitudes, como su morfología o ciertas capacidades bioquímicas, pero profundizando un poco, en la morfología pueden encontrarse diferencias en el tamaño y forma de los conidios así como en el micelio.

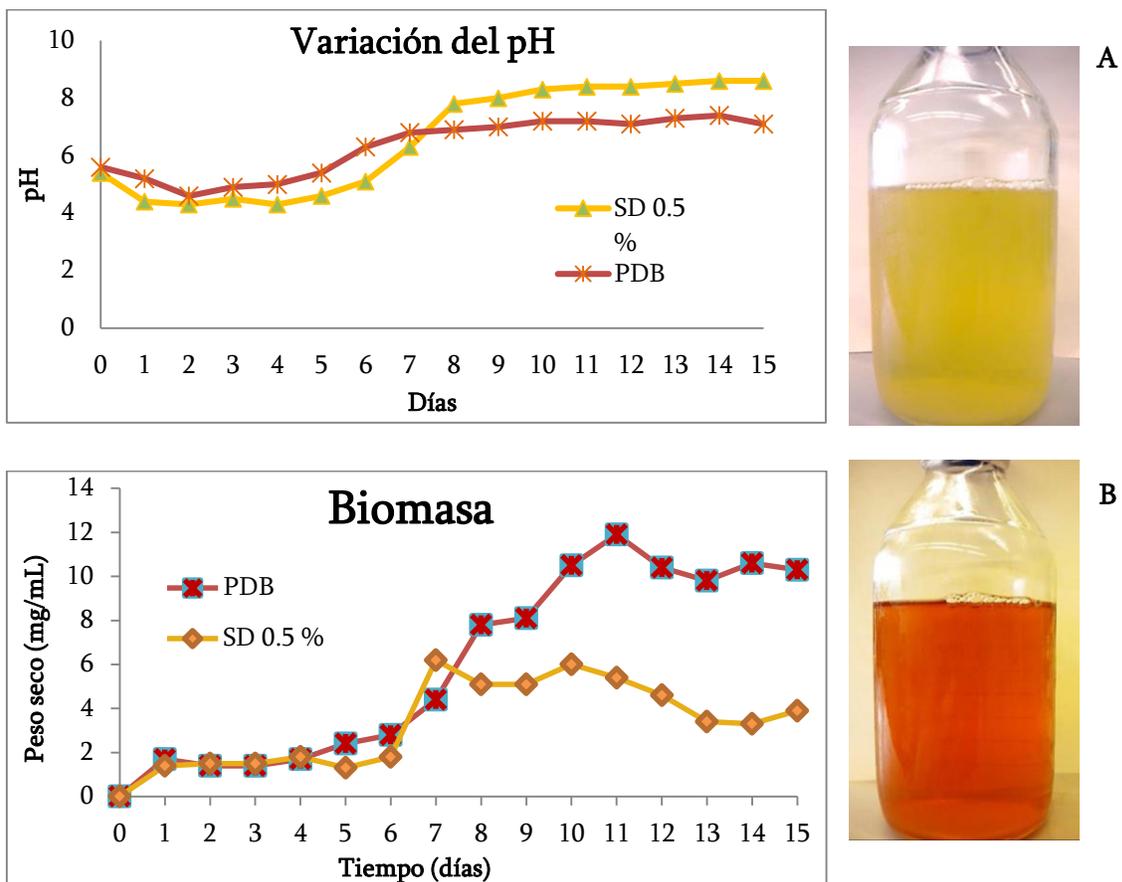
Este trabajo en primera instancia, al evidenciar la diferencia entre *Geomyces*, *Pseudogymnoascus* y las especies cercanas, da la idea de que probablemente, estamos trabajando con un hongo nuevo o no reportado, aunque faltaría hacer más pruebas al respecto para confirmar esta afirmación, como Minnis y Lindner (2013), utilizando otros genes.

**Figura 18.** Árbol de máxima parsimonia del alineamiento de ITS1-5.8S-ITS2 hecho con el programa MEGA 6, Bootstrap de 1000. El número en cada nodo indica el porcentaje de Bootstrap (Secuencias tomadas de los árboles de Rice y Currah, 2006; Gargas *et al.*, 2009; Minnis y Lindner, 2013).



## 6.5 Cinética de crecimiento

Con el fin de hacer una descripción del crecimiento del hongo se realizó una cinética de crecimiento de 50 mL en medio líquido a 29 °C y 180 rpm en una agitadora orbital AGO 60-90 (Prendo®) durante 15 días. Se inició trabajando con el medio SDA 0.5 % (Sabouraud Dextrosa), pero como su crecimiento se ve favorecida en medios con almidón, se eligió también el caldo PDB (Potato Dextrose Broth Difco®) para determinar su biomasa y pH.



**Figura 19.** Variación del pH y la biomasa obtenida en la cinética de crecimiento del hongo 31A-ba. A) Medio de cultivo resultante de la fermentación en medio Sabouraud Dextrosa (SD) 0.5 %. B) Medio de cultivo resultante de la fermentación en caldo Papa Dextrosa (PDB).

*Geomyces* sp. 31 A-Ba tiene un crecimiento lento, alcanza la fase estacionaria después del décimo día, mientras que en otros hongos se alcanza antes (Espinosa-Gómez, 2012). En medio líquido y agitación se llega a la fase estacionaria después del día 10 de fermentación, con la presencia de un tono rojizo que se genera luego del día 20, acentuándose con el pasar de los días; en caja, estos tiempos se ven desplazados al día 30 en el mejor de los casos, un poco más generalmente. Aunque la biomasa obtenida es poca, es notoria la diferencia de que en PDB se obtiene el doble durante la cinética (12 mg/mL) (Figura 19).

En ambos casos se aprecia un comportamiento similar en la curva de pH, en la que se observa una ligera acidificación de medio en los primeros días, lo que puede deberse a que al inicio el hongo consume la glucosa del medio produciendo ácidos orgánicos; después de este tiempo, éste se alcaliniza hasta 8 aproximadamente (Figura 19).

En los dos medios ocurre la producción de pigmentos, ya sea en SD 0.5% de un color amarillento (Figura 19A) o en PDB con un tono rojizo (Figura 19B), éste último se torna más oscuro conforme van pasando días de fermentación. Esto es relevante porque es solamente cuando se presenta el pigmento rojizo cuando encontramos actividad antimicrobiana.

## **6.6 Obtención de Extractos Orgánicos**

Al final se eligió la fermentación líquida en PDB porque al ser donde crecía más el hongo se podría obtener una mayor cantidad de compuestos, además de que es donde se presentaba la actividad antimicrobiana; también en arroz se realizó una fermentación sólida, de la cual obtuvimos más extracto, ya que el crecimiento del hongo se ve favorecida en medios con almidón.

Luego del fraccionamiento primario con hexano y metanol, se obtuvieron varios extractos: medio de cultivo filtrado (SN), micelio de medio líquido (Met Mic), fracción

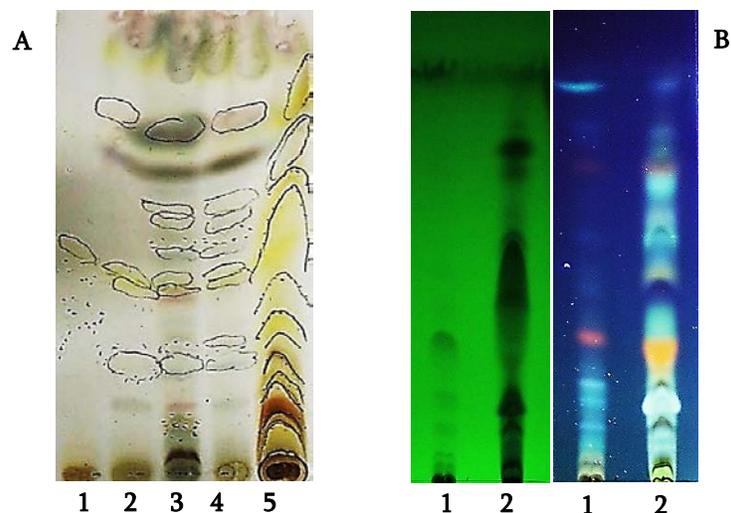
hexánica del micelio del medio líquido (Hx Mic), el extracto proveniente del hongo crecido en arroz (Met Arr) y su fracción hexánica (Hx Arr), los cuales se probaron en los ensayos subsecuentes, con los blancos de sus sustratos respectivos: medio líquido comercial de papa (PDB) y del arroz (Arr).

En la Figura 20A se aprecia el perfil químico producido por *Geomyces* sp., donde se observan compuestos de diversas polaridades, esto da una idea de la riqueza y el potencial que posee este hongo, en especial en la fermentación del arroz, donde se aprecian más compuestos en la cromatoplaque, así como una mayor cantidad de extracto total (Figura 20B).

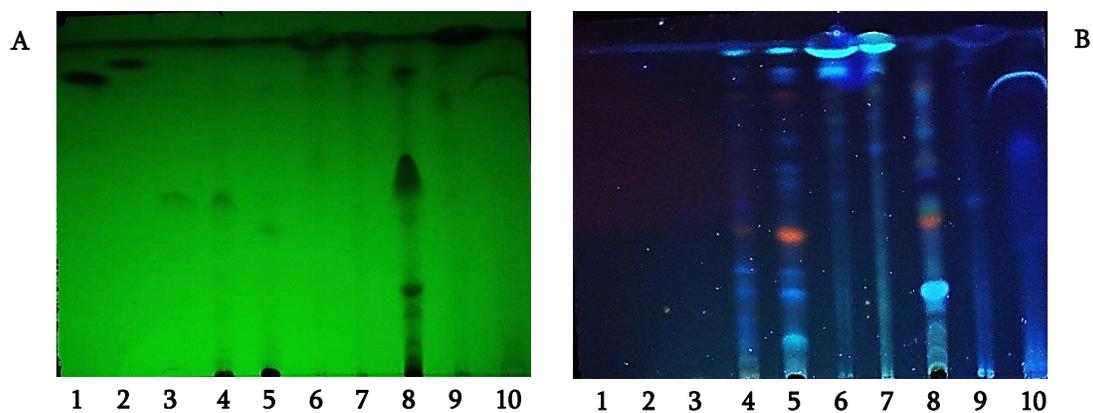
Recordemos que se ha reportado en la literatura que el género *Geomyces* produce ácido astérrico, y como ya se mencionó, recientemente se encontraron también derivados bioactivos de este compuesto, igualmente producidos por una cepa de *Geomyces* (Li, *et al.* 2008). Por ello, se hizo una búsqueda preliminar de compuestos en una cromatoplaque comparando con el estándar del ácido astérrico (Santa Cruz®). Del mismo modo, para saber si *Geomyces* sp., produce los mismos compuestos formados por el árbol de *M. dealbata* Zucc. se agregaron como controles los estándares de honokiol (Sigma® H4917-10MG), y magnolol (Sigma® H4917-10MG y M3445-10MG), compuestos bifenólicos producidos por el árbol (Figura 21).

La Figura 21A sugiere que tal vez *Geomyces* sp. 31A-Ba produce ácido astérrico, ya que existen bandas que así lo muestran en la cromatoplaque, pero pareciera no ser el caso para el magnolol, y del honokiol aún no puede descartarse por la cercanía de las bandas presentes.

Los extractos de las fracciones hexánicas muestran más compuestos de baja polaridad, como era de esperarse, pero las fracciones metanólicas también presentan compuestos poco polares, así como de gran polaridad que se mantienen retenidos en el punto de aplicación, lo cual corrobora la riqueza que produce el hongo elegido.

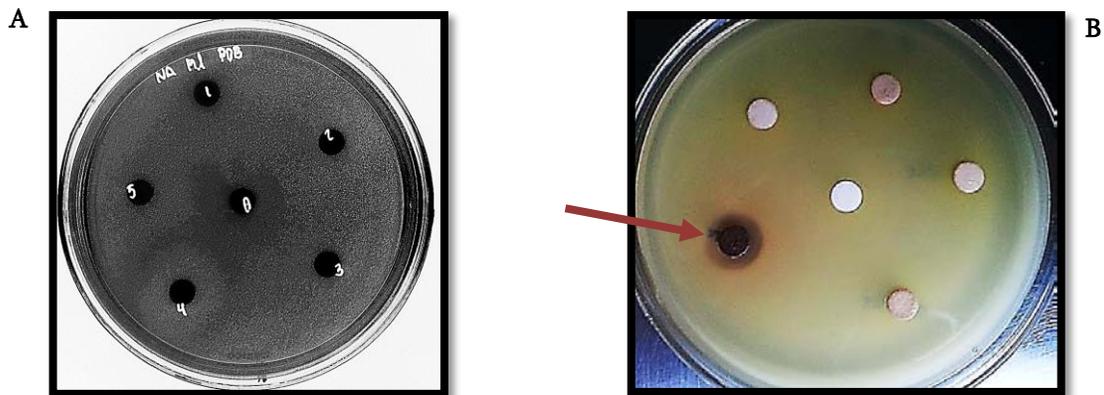


**Figura 20.** Fotografía de las cromatografías en capa fina corridas en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MetOH (95:5) de las muestras: A) Muestras: 1. Medio de cultivo (SN), 2. Micelio macerado (Met Mic), 3. Fracción Hexánica de arroz (Hx Arroz), 4. Fracción Hexánica micelio macerado (Hx Mic), 5. Fracción metanólica del extracto en arroz (Met Arroz). B) Perfil visto a 254 y 366 nm. Muestras: 1. Medio de cultivo (SN), 2. Fracción metanólica del extracto en arroz (Met Arroz).



**Figura 21.** Fotografía de las cromatografías en capa fina corridas en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MetOH (95:5). Muestras: 1. Estándar de Honokiol (Sigma®), 2. Estándar de Magnolol (Sigma®), 3. Estándar de Ac. Astérrico (Santa Cruz®), 4. Medio de cultivo (SN), 5. Micelio macerado (Met Mic), 6. Fracción Hexánica del micelio macerado (Hx Mic), 7. Fracción Hexánica de la fermentación proveniente de arroz (Hx Arroz), 8. Fracción metanólica del extracto en arroz (Met Arroz), 9. Blanco PDB, 10. Blanco Arroz. A) Perfil visto a 254 nm B) Perfil visto a 366 nm.

En un inicio se había encontrado actividad bacteriostática en el medio de cultivo de fermentaciones líquidas de *Geomyces* sp. en medio PDB (Fig 22A). Las muestras obtenidas de la extracción con disolvente dilucidaron una mejor actividad antimicrobiana, por ser ahora bactericida, en la extraída del hongo crecido en arroz.



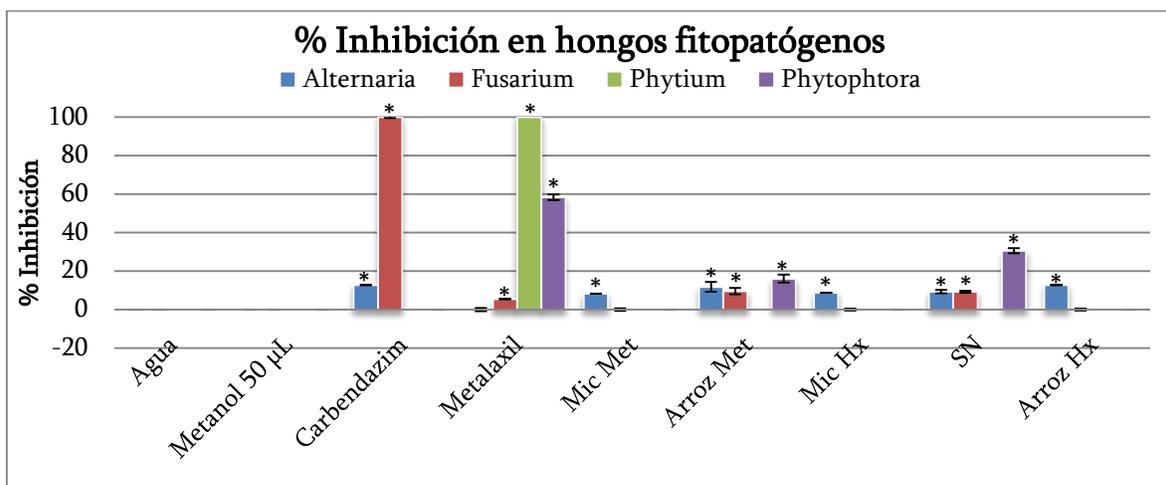
**Figura 22.** Antibiosis por el método de Kirby-Bauer en agar nutritivo A) En los primeros 5 días de una fermentación líquida contra *Micrococcus luteus* muestran efecto bacteriostático alrededor de todos los sensibilizadores. B) Extractos orgánicos obtenidos de *Geomyces* sp. 31A-Ba contra *M. luteus* muestran efecto bactericida de la muestra proveniente del hongo crecido en arroz (flecha roja).

## 6.7 Evaluación del potencial del hongo para producir algún tipo de actividad biológica diferente a la antibacteriana

### 6.7.1 Bioensayo de Potencial Antifúngico

En la prueba que se realizó con los extractos obtenidos se encontró que no hay diferencia significativa entre el blanco y el control negativo (metanol), además todas las muestras tienen un efecto significativo (15%) similar al carbendazim (fungicida comercial) contra *A. solani*, y solamente el medio de cultivo (SN) y la fermentación en arroz (Met Arroz) contra *F. oxysporum* (Gráfica 2). Mientras que en el caso de los oomicetos, ningún extracto logró inhibir a *P. aphanidermatum*, aunque una vez más, los extractos orgánicos provenientes de la fermentación del arroz (Met Arroz) y del

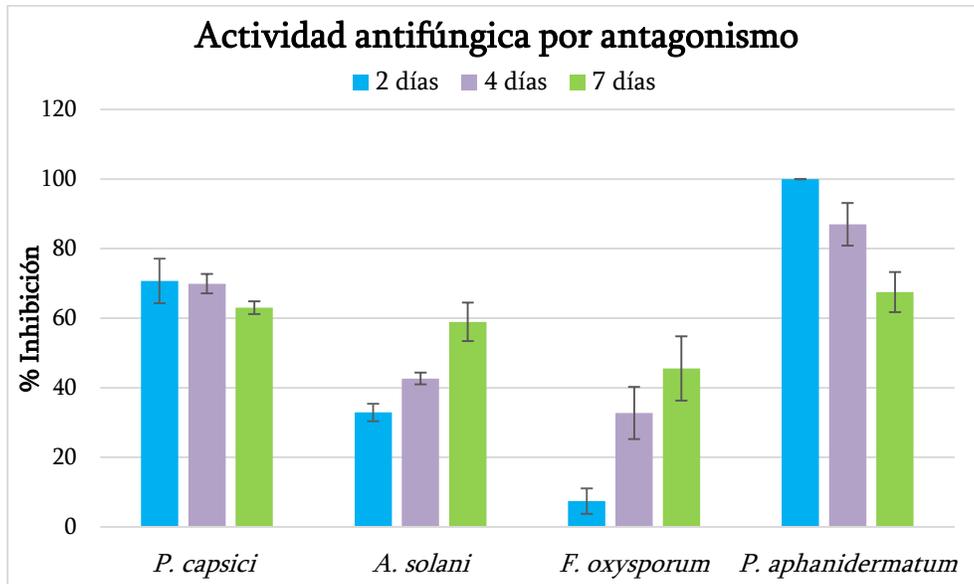
medio de cultivo (SN) resultaron ser efectivos contra *P. capsici*, pero significativamente menor al metalaxil (fungicida comercial) siendo el del medio de cultivo (SN) el de mayor actividad (Figura 23). Los controles positivos se utilizaron a una concentración final de 100 ppm, y los extractos a 250 ppm.



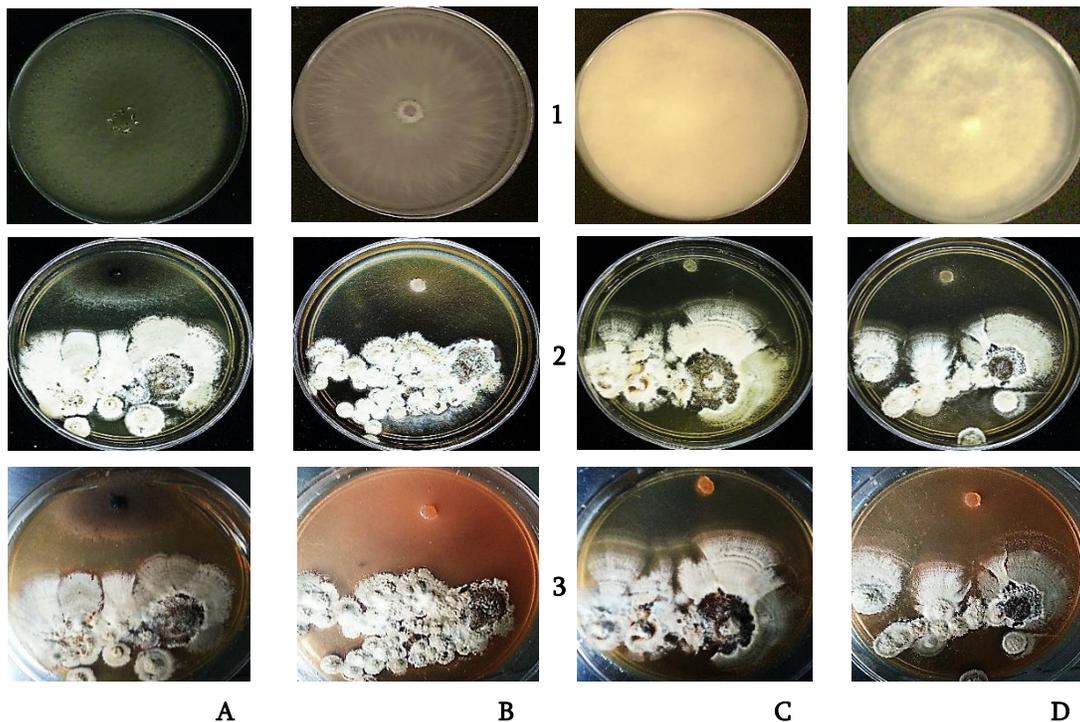
**Figura 23.** Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos obtenidos de *Geomyces* sp. sobre eumicetos (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*) y oomicetos (*Phytium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*).

\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA n=4 (P < 0.05) comparado contra Metanol.

En los antagonismos se ha visto que *Geomyces* sp., actúa de manera notable contra los hongos competidores, inhibiendo a los oomicetos en más de un 60 % (Figura 24), pero un poco menos contra los hongos *F. oxysporum* y a *A. solani* en los primeros días de prueba (10 - 30 %). Conforme pasaba el tiempo, se vio mejorado el efecto inhibitorio contra los eumicetos hasta un 30% más, mientras que disminuía ligeramente contra *Phytium* y *Phytophthora* (Figura 24); solamente *P. capsici* no mostró diferencia significativa a lo largo de los días de evaluación. Estos resultados sugieren que probablemente se traten de diferentes compuestos los que afectan a los microorganismos probados, ejerciendo un efecto fungistático contra los oomicetos.



**Figura 24.** Inhibición de los extractos orgánicos obtenidos de *Geomyces* sp. en eumicetos (*A. solani* y *F. oxysporum*) y oomicetos (*Phytium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*) fitopatógenos



**Figura 25.** Pruebas de antagonismo en caja de *Geomyces* sp.: Control (1), a 7 días de incubación (2), a más de 3 meses de incubación (3). A) *Alternaria solani*, B) *Fusarium oxysporum*, C) *Phytium aphanidermatum*, D) *Phytophthora capsici*.

De acuerdo con las observaciones podríamos especular que el o los compuestos que afectan a *Alternaria* y *Fusarium* son inducidos por la presencia de éstos en co-cultivo con el hongo productor, ya que en los extractos no se encontró esta actividad, es decir, se estarían produciendo en respuesta a un estrés biótico generado por la competencia entre ellos. Es necesario señalar también que afectan su proceso de esporulación, porque los eumicetos disminuyen su esporulación, así como su pigmentación en aquellas cajas donde se puso a competir contra *Geomyces* sp. (Figura 25). Esto podría deberse a mecanismo físicos o por compuestos difundidos en el medio o volátiles presentes, igual producidos por *Geomyces* sp. 31A-Ba, pero quedan descartados las posibles acciones mecánicas porque al revisar en el microscopio estereoscópico se ve que no hay ningún contacto entre los microorganismos. Así que se puede asegurar que tiene actividad antifúngica notoria por la forma en que actúa contra sus competidores, ya que altera tanto su crecimiento como sus capacidades fisiológicas.

Cabe denotar que los oomycetos no son hongos verdaderos, pues pertenecen al reino Stramenopila junto con algunas diatomeas y algas. Su pared difiere al ser compuesta principalmente por celulosa en vez de quitina como en los “eumicetos”, y pueden tener esporas tanto reproductivas como zoosporas, éstas últimas no se encuentran en los hongos (Kamoun, 2003; Latinjhouwers *et al.*, 2003). Además, su ritmo de crecimiento suele ser más rápido que la mayoría de los macro y micromicetos, es por esto que son una amenaza relevante al causar pérdidas notorias en la industria agrícola y afectaciones de reservas forestales (Meléndez-González, 2012), es por ello que se usaron también para esta evaluación.

Para combatir a los organismos fitopatógenos se encuentran fungicidas comerciales que actúan de forma efectiva contra los mismos ya sea de manera preventiva o curativa. Entre los más usados tenemos al carbendazim, un benzimidazol que actúa como antifúngico sistémico que se absorbe a través de las raíces y tejidos con translocación

acropétala (ascendente) y que inhibe la síntesis de la  $\beta$ -tubulina, impidiendo la formación del huso acromático y deteniendo así el desarrollo micelial (Kemdacin Barpem®).

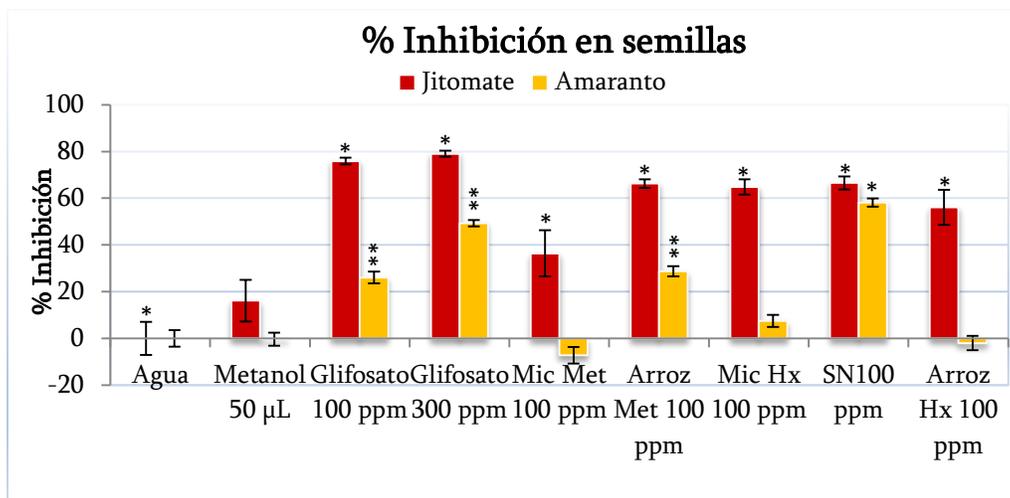
Por otro lado, tenemos al metalaxil, fungicida funcional y específico contra oomycetos. Es una fenilamida que inhibe el crecimiento del micelio y la formación de esporas al interrumpir la síntesis de rRNA y por lo tanto de proteínas, pero tiene poco efecto sobre la liberación de las zoosporas, su movimiento, enquistamiento, germinación, penetración y formación de haustorios (Folio Gold Syngenta®).

### **6.7.2 Bioensayo de Potencial Herbicida**

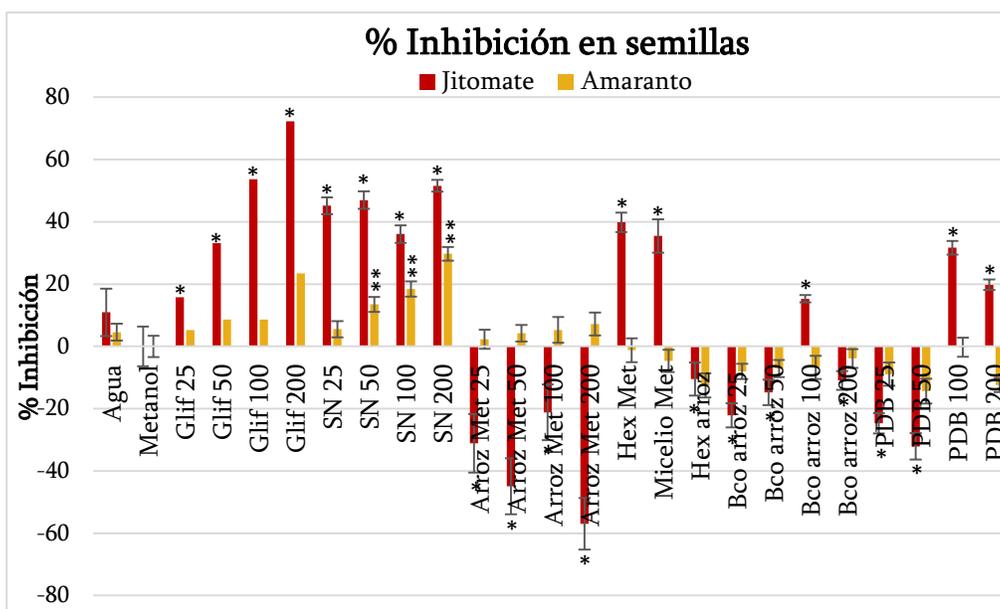
Las semillas usadas en esta prueba son de jitomate y amaranto, ya que el jitomate es un organismo relativamente susceptible, mientras que el amaranto es considerado maleza por su rápido crecimiento.

En el ensayo herbicida, se utilizó Glifosato como control positivo ya que es un herbicida no selectivo que actúa mediante la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina) a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), con lo que se reduce la producción de proteína y el desarrollo de la misma (Salazar López, *et al.* 2011), así como la biosíntesis de otros compuestos tales como tetrahidrofolato, ubiquinona y vitamina K (Eslava, *et al.*, 2007).

Inicialmente, se encontró que todas las muestras inhibían significativamente a las semillas de *L. esculentum*, la mayoría por encima del 50%, y en el caso de *A. hypocondriacus*, los extractos obtenidos del arroz (Met Arroz) y del medio de cultivo (SN) fueron los que presentaron mejor actividad (58 y 28%, respectivamente), (Figura 26). De hecho no existe una diferencia significativa entre el Glifosato y éstos extractos, aun cuando el producto comercial se encuentra 3 veces más concentrado que las muestras usadas.



**Figura 26.** Inhibición de los extractos orgánicos frescos obtenidos de *Geomyces* sp en semillas de *Lycopersicon esculentum* (jitomate) y *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto). \* Valores estadísticamente significativos, ANOVA n=40 (P< 0.05) comparado contra Metanol, en jitomate. \*\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA n=40 (P< 0.05) comparado contra Metanol, en amaranto.



**Figura 27.** Inhibición de los extractos orgánicos con vida de anaquel de 6 meses obtenidos de *Geomyces* sp en semillas de *Lycopersicon esculentum* (jitomate) y *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto). \* Valores estadísticamente significativos, ANOVA n=40 (P< 0.05) comparado contra Metanol, en jitomate. \*\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA n=40 (P< 0.05) comparado contra Metanol, en amaranto.

Se repitió el ensayo con los extractos totales con una vida de anaquel de 6 meses, y se encontró que el efecto herbicida disminuía hasta un 20 a 30% contra las semillas probadas (Figura 27), lo que sugiere una posible degradación del o los compuestos responsables de la actividad. El medio de cultivo (SN) nuevamente mostró el mejor efecto, mientras que el del cultivo de arroz afectó ligeramente solamente al amaranto, aunque no de forma significativa. De este experimento, se calculó la IC 50 para cada extracto probado, pero algunas concentraciones resultantes estaban por encima de los 200 µg/mL, mientras que en la mayoría de los casos se dio un efecto fitoestimulante sobre las semillas. El blanco de PDB estimula el crecimiento de las semillas a bajas concentraciones, pero en altas concentraciones suele ser nocivo contra las mismas.

Teniendo los extractos frescos encontraríamos probablemente que las concentraciones inhibitorias resultarían más bajas, como podemos deducir de la Figura 26, si esto es cierto, podemos deducir que los extractos poseen una actividad herbicida potencial y útil.

### **6.7.3 Bioensayo de Potencial Tripanocida**

Con el extracto total proveniente del medio de cultivo de la fermentación líquida se hizo la prueba antiparasitaria contra *T. cruzi* cepa Querétaro, donde se comparó con 2 drogas terapéuticas frecuentemente usadas para el tratamiento de la tripanosomiasis americana (Apt *et al.*, 2008; Rodríguez-Morales, 2005), el benznidazol (Radanil Roche®) y el nifurtimox (Lampit Bayer®), a una concentración final de 100 µg/mL en ambos casos.

Los fármacos control afectan al parásito de diferentes maneras: la acción del nifurtimox (NFX) está relacionada con la generación especies reactivas de oxígeno (ej: anión superóxido, peróxido de hidrógeno), contra los cuales el tripanosoma es deficiente en mecanismos de destoxificación, lo que lo hace susceptible al estrés oxidativo. Por otra parte el benznidazol (BNZ) se une covalentemente a los intermediarios de la

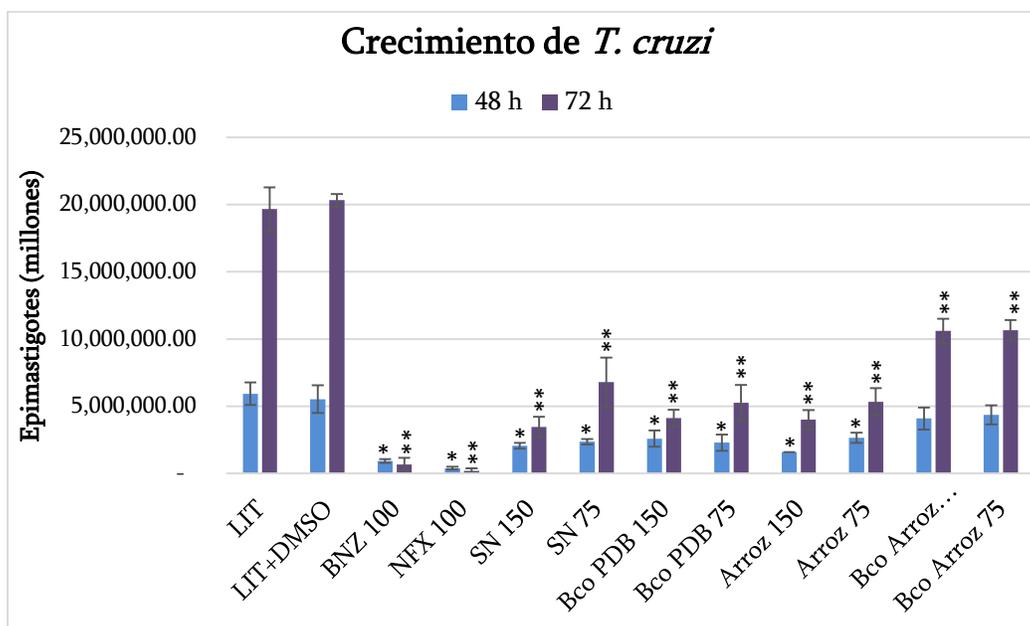
nitrorreducción con los componentes del parásito, ADN, lípidos y proteínas (Apt *et al.*, 2008; Rodríguez-Morales, 2005)

Se evaluó el efecto inhibitorio y/o mortal sobre el parásito así como alguna afectación sobre su movilidad a las 24, 48 y 72 h de aplicación. Se aplicaron dos diferentes concentraciones de las muestras (75 y 150 µg/mL) (Gráfica 6). Las muestras presentaron inhibición para ambas concentraciones, pero no mayor que los fármacos usados. A las 24 h no se observaron diferencias significativas entre las muestras (datos no reportados), por lo que se prefirieron los tiempos de 48 y 72 h de incubación.

Como se muestra en la Figura 28, existe una inhibición significativa sobre el parásito en todos los tratamientos, pero no hay ninguna diferencia estadística entre los controles negativos (LIT y LIT+DMSO). Es importante señalar que los extractos aun siendo de diferentes fermentaciones mostraron actividad similar contra *T. cruzi*, Sorprendentemente, el blanco de PDB también presentó actividad sobre el parásito, pero el blanco de arroz no mostró diferencia significativa a las 48 horas.

Los controles positivos afectan la supervivencia en un porcentaje mayor al 90%, mientras que los extractos orgánicos de *Geomyces* inhiben de 50 - 80%. Los blancos respectivos tienen una inhibición del 70% para el PDB y cerca del 40% para el arroz, lo que lleva a pensar que tal vez son las altas concentraciones las que afectan al parásito en sí.

Por otro lado, se revisó la movilidad del parásito durante el experimento y se encontró que al tercer día la muestra del medio de cultivo (SN) donde se creció al hongo, la disminuye hasta un 50 - 60%, mientras que el control negativo presenta una movilidad basal del 12%.



**Figura 28.** Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos de *Geomyces* sp. sobre cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro. \* Valores estadísticamente significativos, ANOVA n=3 (P< 0.05) comparado contra DMSO-LIT a las 48 horas. \*\* Valores estadísticamente significativos, ANOVA n=3 (P< 0.05) comparado contra DMSO-LIT a las 72 horas.

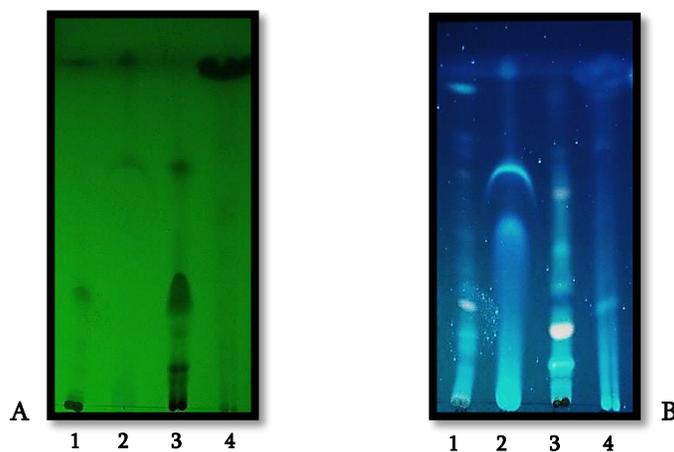
Posiblemente el efecto que puedan tener los extractos sobre el parásito hace pensar en un mecanismo similar al que tiene sobre los hongos, ya que actualmente está bien establecido que una vía metabólica importante en los hongos y en miembros de la familia de los tripanosomátidos es una que produce una clase especial de esteroides, incluyendo el ergosterol y otros metil esteroides, los cuales están presentes en la membrana de los organismos fúngicos, y que también son necesarias para el crecimiento y la viabilidad parasitaria (de Souza y Rodrigues, 2009).

Al estar trabajando con un extracto total, es decir, el o los compuestos que presentan alguna actividad están en una concentración mucho menor a lo establecido para las pruebas; y en la Figura 28 se ve que las concentraciones de 150 µg/mL tienen

ligeramente mejor actividad que las de 75  $\mu\text{g/mL}$ , lo que sugeriría de forma preliminar que la actividad se manifiesta en función de la concentración.

No se encontró nada en la literatura con respecto a los compuestos del arroz que pudiera afectar nuestros resultados. Por otra parte, la papa posee glicoalcaloides potencialmente tóxicos como la solanidina,  $\alpha$ -solanina o  $\alpha$ -chaconina, y su toxicidad se basa en su actividad anticolinesterasa en el sistema nervioso central, en la disrupción de membranas celulares al acomplejarse con los 3- $\beta$ -hidroxiesteroles, y en cambios causados por el transporte activo de iones a través de las membranas, dando lugar a alteraciones en el metabolismo en general (Friedman *et al.*, 1992; Keukens *et al.*, 1995; Blankemeyer *et al.*, 1992; Blankemeyer *et al.*, 1995). No podemos afirmar que el efecto encontrado en el extracto del blanco PDB se deba o no a estos compuestos.

Es por esto último que concluimos que el efecto tóxico de los blancos pueda deberse a la alta concentración del mismo ya que en la cromatopla de la Figura 24 se ve que no hay ninguna relación visible con los extractos de *Geomyces* sp. 31A-Ba y sus blancos respectivos, es decir, que las actividades encontradas en las pruebas biológicas se deben a los compuestos obtenidos del hongo y no al sustrato donde se creció.



**Figura 29.** Fotografía de las cromatografías en capa fina corridas en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MetOH (95:5) de las muestras: 1. SN, 2. Blanco PDB, 3. Extracto proveniente de la fermentación en arroz, 4. Blanco arroz.

A) Perfil visto a 254nm. B) Perfil visto a 366 nm.

## 7. CONCLUSIONES

---

En este trabajo seleccionamos al hongo 31A- Ba para iniciar la búsqueda de otras actividades biológicas benéficas para el humano con base en su actividad antibacteriana, su morfología colonial y microscópica, actividad de agarasa y una abundante producción de pigmento rojizo

El hongo 31 A- Ba fue identificado preliminarmente como *Geomyces* sp., y se confirmó con los análisis filogenéticos que no tiene similitud con *Pseudogymnoascus destructans*, antes *Geomyces destructans* (patógeno para los murciélagos) por amplificación de la región 5.8S, y comparación en BLAST.

El crecimiento de *Geomyces* sp. 31A-Ba se vio favorecido en medios con almidón, especialmente en papa, soya y arroz, y su temperatura óptima se encuentra en un rango de 20-25 °C, pero esporula mejor a 4 °C, ya que posee capacidad psicotolerante. Además, puede utilizar una gran gama de fuentes de carbono, lo que da una idea de su capacidad de adaptación y supervivencia.

*Geomyces* sp. 31A-Ba no produce magnolol, pero no podemos descartar la posibilidad de que genere honokiol, y ácido astérrico.

Los extractos orgánicos obtenidos de *Geomyces* sp. 31A-Ba, tanto del medio de cultivo como el de la fermentación en arroz mostraron actividad herbicida relevante contra *L. esculentum* (jitomate) y *A. hypochondriacus* (amaranto), y actividad fungicida similar al control positivo usado contra *A. solani* y *P. capsici*; siendo el del medio de cultivo el de mayor efecto en ambos bioensayos.

Dichos extractos mostraron también actividad inhibitoria significativa contra la cepa Querétaro de *T. cruzi*.

En las pruebas de antagonismo se encontró mejor inhibición que en las pruebas por difusión, lo que sugiere que se trate de más de un compuesto efectivo contra las cepas sensibles, y que su producción es inducida por el estrés biótico generado por la competencia entre los microorganismos.

Cabe señalar que de acuerdo a los resultados de la prueba herbicida, se puede afirmar que su potencial en dicho ámbito es enorme, ya que iguala el efecto del producto comercial, lo que supone un impacto económico notable mientras se pueda mantener la estabilidad del o los compuestos responsables de dicha actividad.

## 8. PERSPECTIVAS

---

- Separar los compuestos que presentaron alguna actividad biológica de interés por métodos cromatográficos.
- Dilucidar e identificar las moléculas bioactivas resultantes por métodos espectrométricos, ya que se podrían encontrar productos naturales con mejor eficiencia y/o un mayor valor económico.

## 9. REFERENCIAS

---

- Adrio LJ, Demain LA. (2003). Fungal biotechnology. *Int Microbiol.* 6: 191-199.
- Akins RA, Lambowitz AM. (1985). General method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. *Mol Cell Biol.* 5:2272-2278.
- Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers.*, 41: 1-16.
- Alonso-Castro AJ, Zapata-Bustosa R, Domínguez F, García-Carrancá A y Salazar-Olivo LA. (2011). *Magnolia dealbata* Zucc. and its active principles honokiol and magnolol stimulate glucose uptake in murine and human adipocytes using the insulin-signaling pathway. *Phytomedicine* 18: 926– 933.
- Alonso-Castro AJ, Domínguez F, García-Regalado A, González-Sánchez I, Cerbón MA y García-Carranca A. (2014). *Magnolia dealbata* seeds extract exert cytotoxic and chemopreventive effects on MDA-MB231 breast cancer cells. *Pharm Biol.* 52(5): 621-627.
- Alvin A, Miller KI, Neilan BA. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol Res.* 169: 483–495
- Amábile-Cuevas CF. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries.* 4(3): 126-131.
- Apt W, Heitmann I, Jersic MI, Jofré L, Muñoz P, Noemí I, San Martín AM, Sapunar J, Torres M y Sulantay I. (2008). Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas *Rev Chil Infect.* 25 (5): 384-389.
- Arnold AE. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.*, 21: 51-66.
- Arnold AE, Henk DA, Eells RA, Lutzoni F, Vilgalys R. (2007). Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, 99: 185–206.

Arnold AE. (2005). Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. In: Current trends in mycological research, Deshmukh D (ed.), pp. 49-68, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India.

Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100: 15649–15654.

Baltz RH. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? SIM News 55: 186-196.

Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. J Antibiot. 58(1): 1-26.

Bérdy J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading J Antibiot. 65, 385–395

Bérdy J. (2014). Microorganisms producing antibiotics, Sanchez, S., Demain, A.L. (Eds.), Antibiotics: Current Innovations and Future Trends. Caister Academic Press, 2014, In press. ISBN: 978-1-908230-54-6

Blankemeyer JT, Stringer BK, Rayburn JR, Bantle JA, Friedman M. (1992). Effect of potato glycoalkaloids, aconine and solanine on membrane potential of frog embryos. J Agric Food Chem 40: 2022-2025.

Blankemeyer JT, Atherton R, Friedman M. (1995). Effect of Potato Glycoalkaloids  $\alpha$ -Chaconine and  $\alpha$ -Solanine on Sodium Active Transport in Frog Skin. J Agric Food Chem 43: 636639.

Blehert DS, Hicks AC, Behr M, Metemeyer CU, Berlowski-Zier BM, Buckles EL, Coleman JTH, Darling SR, Gargas A, Niver R, Okoniewski JC, Rudd RJ y Stone, WB. (2009). Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? Science Vol. 323 pp. 227

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S y Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161: 839-851.

Cicuzza D, Newton A, Oldfield S. (2007). The Red List of *Magnoliaceae*. Project Report. Cambridge, England: Botanic Gardens Conservation International (BGCI) and Fauna & Flora International (FFI).

Charepraset S, Piapukiew J, Thienhirum S, Whalley AJS, Sihanonth P. (2006). Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samaca saman* Merr. *World J Microbiol Biotechnol.* 22: 481-486.

Chaturvedi V, Springer DJ, Behr MJ, Ramani R, Li X, Peck MK, Ren P, Bopp DJ, Wood Britta, Samsonoff WA, Butchkoski CM, Hicks AC, Stone WB, Rudd RJ, Chatuverdi S. (2010). Morphological and Molecular Characterizations of Psychrophilic Fungus *Geomyces destructans* from New York Bats with White Nose Syndrome (WNS). *PLoS ONE* 5(5): e10783.

Cragg G, Newman D. (2007). Anticancer drug discovery and development from natural products. *In: Colegate S y R Molyneux. (eds.) Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination.* pp. 323-371.

Crawford J, Clardy J. (2011). Bacterial symbionts and natural products. *Chem. Comm.* 47: 7559–7566.

Currah RS. (1985). Taxonomy of the Onygenales: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*. *Mycotaxon* 24: 1–216.

De la Cruz M. (1964). *Libellus de medicinalibus indorum heris*. México: IMSS.

De Souza W, Rodrigues JC. (2009). Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* doi:10.1155/2009/642502 19 pages.

Demain AL. (1981). Industrial Microbiology. *Science.* 214: 987-995.

Demain AL, Sánchez S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot.* 62: 5-16.

Demain AL. (2009). Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health. *Medicinal Research Reviews* Vol. 29 No. 6: 621-842.

Dreyfuss MM, Chapela IH. (1994). Potential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. *In: Gullo V (ed.). The discovery of natural products with therapeutic potential.* Butterworth Heinemann, London, pp: 49–80.

Domínguez-Yescas R. (2012). Estudio etnobiológico de *Magnolia dealbata* Zucc en San Juan Juquila Vijanos, Oaxaca. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la Sierra Juárez.

Dubey NK, Shukla R, Kumar A, Singh P, Prakash B. (2011). Global scenario on the application of natural products in integrated pest management programmes. *Natural Products in plant pest Management*. Ed. Nawal K Dubey. CABI, UK.

Domsch KH, Gams W, Anderson TH. (2007). *Compendium of Soil Fungi*, 2nd edn. IHW-Verlag, Eching, Germany 672

Eslava P, Ramírez W, Rondón I. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana. pp. 34-43.

Espinel-Ingroff A, McGinnis MR, Pincus DH, Goldson PR, Kerkering TM. (1989). Evaluation of the API 20C Yeast identification system for the differentiation of some dematiaceous Fungi. *J Clin Microbiol.* 27(11): 2565-2569.

Espinosa-Gómez A. (2012). Búsqueda de hongos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. productores de metabolitos con actividad antimicrobiana. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

Faeth SH. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualist? *Oikos* 98: 25-36.

Faeth SH, Fagan WF. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualist? *Integ. and Comp.* 42: 360-368.

Flores-Estévez N, Vasquez-Morales SG, Cano-Medina T, Sánchez-Velásquez LR, Noa-Carrazana JC, Díaz-Fleischer F. (2013). Insecticidal activity of raw ethanolic extracts from *Magnolia dealbata* Zucc. on a tephritid pest. *J Environ Sci Health., Part B.* 48: 582-586.

Friedman M, Rayburn JR, Bantle JA. (1992). Structural relationships and developmental toxicity of *Solanum* alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay *Xenopus*. *J Agric Food Chem* 40: 1617-1624.

Folio Gold 440 SC® Ficha Técnica. Registro PQUA No. 148 –SENASA, Syngenta S.A

Gargas A, Trest MT, Christensen M, Volk TJ, Blehart DS, (2009). *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. *Mycotaxon* 108: 147e154.

Ganguli BN, Deshmukh SK. (2007). *Fungi. Multifaceted Microbes*. Anamaya Publishers. New Deli.

Ganley RJ, Newcombe G (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycol Res* 110: 318–327

Gloer JB. (1997). Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In *The Mycota*. Vol. IV. Environmental and Microbial Relationships (D. T. Wicklow & B. E. Soderstrom, eds). Springer-Verlag, New York. pp: 249-268.

Gonçalves VN, Vaz AM, Rosa CA, Rosa LH. (2012). Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* 82: 459-471

Gutiérrez L. (1993). Estudio biológico de una especie forestal endémica (*Magnolia dealbata* Zucc.). (Tesis de Maestría) Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., México.

Gutiérrez L, Vovides AP. (1997). An *in situ* study of *Magnolia dealbata* Zucc. In Veracruz State: an endangered endemic tree of Mexico. *Biodivers Conserv.* 6, 89-97.

Gunatilaka LA. (2006). Natural Products from Plant-Associated Microorganism: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J Nat Prod* 69: 509-526.

Gurib-Fakim A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27: 1–93.

Guzmán G. (1998). Inventorying the fungi of Mexico. *Biodivers Conserv.* 7: 369-384.

Guzmán-Trampe SM. (2012). Evaluación de la capacidad de microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. para producir compuestos con actividad biológica. (Tesis de Maestría). Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Hawksworth DL. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105 (12):1422-1432.

Hyde KD, Soyong K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33:163–173

Isaac S. (1992). *Fungal-plant interactions*. Chapman & hall. Reino Unido.

Kamoun S. (2003). Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryot Cell*. 2(2):191-199

Kemdacin ® 500 SC y 50 WP. Ficha Técnica. DTF- 08. Barpen.

Keukens EAJ, de Vrije T, van den Boom C, de Waard P, Plasman HH, Thiel F, Chupin V, Jongen WMF, de Kruijff B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim Biophysica Acta* 1240: 216-228.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA, eds. (2008). *Dictionary of the Fungi*. CAB International.

Kharwar RN, Verma VC, Kumar A, Gond SK, Harper JK, Hess WM, Lobkovosky E, Ma C, Ren Y, Strobel GA. (2009). Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp. *Curr. Microbiol.*, 58: 233-238.

Kotani A, Kojima, S, Hakamata, H Jin, D, Kusu F. (2005). Determination of Honokiol and Magnolol by Micro HPLC with Electrochemical Detection and Its Application to the Distribution Analysis in Branches and Leaves of *Magnolia obovata*. *Chem. Pharm. Bull.* 53 (3) 319-322.

Kusari S, Spiteller M. (2010). Lessons from endophyte: peering under the skin of plants. *Biotechnology—Its Growing Dimensions*. New Delhi, India: Sonali Publications, 1-27.

Kusari S, Hertweckand H, Spiteller M. (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry and Biology*. 19, 792-798.

Kusari S, Spiteller M. (2011). Are we ready for industrial productions of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat. Prod. Rep.* 28, 1203-1207.

Kusari S, Spiteller M. (2012). Metabolomics of Endophytic Fungi Producing Associated Plant Secondary Metabolites: Progress, Challenges and Opportunities, *Metabolomics*, Dr Ute Roessner (Ed.), ISBN: 978-953-51-0046-1.

Latinjhouwers M, Wit P, Govers F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *TIM*. 11(10):462-469.

Lemus-Hernández D. (2013). Evaluación de una cepa de *Pseudomonas* asociada a *Magnolia dealbata* Zucc. por su capacidad para producir compuestos con actividad biológica. (Tesis de Licenciatura) Facultad de Química, UNAM.

Li Y, Sun B, Liu S, Jiang L, Liu X, Zhang H, Che Y. (2008). Bioactive Asterric Acid Derivatives from the Antarctic Ascomycete Fungus *Geomyces* sp. *J. Nat. Prod.*, 71, 1643–1646

Liu C, Wong Z, Hong L, Ren T. (2001). Antifungal activity of *Artemisa annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. J. Biotechnol. 88, 277-282.

Liu K, Ding X, Deng B, Chen W. (2010). 10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*. Biotechnol. Lett. 32, 689-693.

Lorch JM, Gargas A, Meteyer CU, Berlowski-Zier BM, Green D, Shearn-Bochsler V, Thomas NJ, Blehert DS. (2010). Rapid polymerase chain reaction diagnosis of white-nose syndrome in bats. J. Vet. Diagn. Invest. 22:224-230.

Loque CP, Medeiros AO, Pellizzari FM, Oliveira EC, Rosa CA, Rosa LH. (2010). Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. Polar Biology 33: 641-648.

Macías-Rubalcava, ML, Hernández-Bautista BE, Jiménez-Estrada M, González MC, Glenn AE, Hanlin RT, Hernández-Ortega S, Saucedo-García A, Muriá-González JM, Anaya AL. (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. Phytochemistry. 69. 1185-1196.

Martínez AL, Domínguez F, Orozco S, Chávez M, Salgado H, González M, González-Trujano ME. (2006). Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. Leaves in mice. J Ethnopharmacol. 106, 250-255.

Martínez I, Cervantes-Landín A, Espinoza B. (2013). Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. Gaceta Médica de México, Biología Molecular y Medicina. 149:363-5.

Manterola-Morales AM. (2011). Aislamiento e identificación de una cepa bacteriana asociada a *Magnolia dealbata* Zucc. por su capacidad para producir un antibacteriano (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Mead R. Curnow RN, Hasted AM. (eds.) (2002). Statistical Methods In Agriculture And Experimental Biology. 3rd Ed. Chapman And Hall. Crc, Boca Raton, Fl.

Meléndez-González C. (2009). Potencial aleloquímico del endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

Meléndez-González C. (2012). Policétidos diméricos bioactivos del hongo endófito *Acremonium* sp. aislado de *Bursera simaruba* (Burseraceae). (Tesis de Maestría). Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM.

Minnis AM, Linder DL. (2013). Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol.* 11: 638-649

Mueller GM, Schmit JP. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv.* 16: 1-5.

Muriá-González MJ. (2007). Búsqueda de actividad antifúngica y fitotóxica en algunos hongos endófitos aislados de hojas de árboles de la selva mediana subperenifolia de Quintana Roo. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

Ohashi H, Akiyama H, Nishikori K, Mochizuki J. (1992). Asterric Acid, A New Endothelin Binding Inhibitor. *J. Antibiot.* 45, 1684-1685.

Osman K, Evangelopoulos D, Basavannacharya C, Gupta A, McHugh TD, Bhakta S, Gibbons S. (2012). An antibacterial from *Hypericum acmosepalum* inhibits ATP-dependent MurE ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Intern. J. Antimicrob. Agents.* 39, 124-129.

Patisson G. (1985). *Magnolia dealbata*. *Magnolia J. Magnolia Society* 22:17-18.

Photita W, Lumyong S, Lumyong P, Hyde KD. (2001). Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycol. Res.* (12): 1508-1513.

Rice AV, Currah RS. (2005). *Oidiodendron*: A survey of the named species and related anamorphs of *Myxotrichum*. *Studies in Mycology* 53: 83-120.

Rice AV, Currah RS. (2006). Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora*. *Mycologia* 98 (2): 307-318.

Rodríguez RJ, White JFJ, Arnold AE, Redman RS. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.*, 182: 314-330.

Rodríguez-Morales AJ. (2005). Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. *Rev Peru Med Exp. Salud Pública* 22(2): 123-133

Salazar-López NJ, Aldana-Madrid ML. (2011). Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. *Biotecnia*. XIII (2): 23-28.

Sánchez-Fernández, RE. (2010). Potencial alelopático de extractos del micelio y medio de cultivo de un hongo endófito aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae). (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

Sánchez-Velásquez LR, Pineda-López MR. (2010). Comparative demographic analysis in contrasting environments of *Magnolia dealbata*: an endangered species from Mexico. *Popul. Ecol.* 52:203-310.

Sarker SD, Latif Z, Stewart M, Nahar L. (2002). *Magnolia*. Chapter 3: Phytochemistry of the Genus *Magnolia*. Taylor & Francis. Editado por Satyajit D. Sarker y Yuji Maruyama.

Schoch, CL, Seifert, KA, Huhndorf, S, Robert, V, Spouge, JL, Levesque, CA, Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internaltranscribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcodemarker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6241-6246.

Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A, Krohn K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106 (9) 996-1004.

Schulz B, Boyle C. (2005). The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109 (6) 661-686.

Selim KA, El-Beih AA, AbdEl-Rahman TM, El-Diwany AI. (2012) Biology of Endophytic Fungi. *Curr Res Environ Appl Mycol J Fungal Biol.* 2(1), 31-82

Shahid M, Shahzad A, Sobia F, Sahai A, Tripathi T, Singh A, Khan HM, Umesh. (2009). Plant natural products as a potential source for antibacterial agents: recent trends. *Anti-Infective Agents Med. Chem.* 8, 211-225.

Sigler L, Carmichael JW. (1976). Taxonomy of *Malbranchea* and some other hyphomycetes with anthroconidia. *Mycotaxon* 4: 349-488.

Sigler L, Lumley TC, Currah RS. (2000). New species and records of saprophytic ascomycetes (*Myxotrichaceae*) from decaying logs in the boreal forest. *Mycoscience* 41: 495-502.

Simmons TL, Coates RC, Clark BR, Engene N, Gonzalez D, Esquenazi E, Esquenazi E, Dorrestein PC, Gerwick WH. (2008). Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105:4587-94.

Staniek A, Woerdenbag HJ, Kayser O. (2008). Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *J. Plant Interact.*, 3: 75–93.

Stierle D, Strobel GA. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophyte fungus of pacific yew. *Science*. 260 (5105): 214-216.

Strobel GA. (2003). Endophytes as source of bioactive products. *Microb Infect.* 5, 535-544.

Strobel GA, Daisy B, Castillo U, Harper J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod.* 67: 257-268.

Strobel GA. (2012). Genetic diversity of microbial endophytes and their biotechnical applications. In *Genomics applications for the developing world*, K. Nelson, ed. (Berlin, Germany: Springer-Verlag), pp. 249-262.

Stone JK, Polishook JD, White JF Jr. (2004). Endophytic fungi. In: *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*, Mueller G, Bills GF, Foster MS (eds.), pp. 241-270, Elsevier, Burlington, MA, USA.

Stuart GA. (1969). *Chinese Materia Medica*, 2nd edition, pp. 254-256. Taipei: Ku T'ing Book House.

Suryanarayananana TS, Thirunavukkarasub N, Govindarajulub MB, Sasse F, Jansend R, Murali TS. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biol. Rev.*, 23: 9–19.

Tan, R. X. y Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep* 18: 448-459.

Velazco-Macías CG, Forughbakhch-Pournavab R, Alanís-Flores GJ, Alvarado-Vázquez MA. (2008). *Magnolia dealbata* en Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 79:459-463.

Watanabe K, Ikegami F, Horie S. (2002). *Magnolia*. Chapter 1: Introduction. The Genus *Magnolia*. Taylor & Francis. Editado por Satyajit D. Sarker y Yuji Maruyama.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. (1971). The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93:2325–7.

Wright GD. (2000). Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. *Chem Biol.* 7: R127-R132.

World Health Organization. (2010). First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva, Switzerland.

Yu HS, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, Sun P, Qin L. (2010). Recent development and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol. Res.* 165, 437–449.

Zhang WH, Song YC, Tan RX. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* 23, 753-771.

# 10. APÉNDICE

## Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones empleados

Para caracterización:

YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) (g/L)	
Extracto de levadura	10.0
Peptona	20.0
Dextrosa	10.0
Agar	15.0

Se esteriliza en autoclave.

SDA 0.5% glucosa (Sabouraud Dextrose Agar) (g/L)	
Triptona	5.0
Peptona	5.0
Dextrosa	5.0
Agar	15.0

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

Agar Nutritivo (g/L)	
Extracto de res	3.0
Peptona	5.0
Agar	15.0

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $6.8 \pm 0.2$

PDA (Potato Dextrose Agar) (g/L)	
Infusión de papa (sólidos)	4.0
Dextrosa	20.0
Agar	15.0

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

Medio A (Almidón) (g/L)	
Harina de arroz, o soya, o maíz, o papa o almidón soluble	40.0
SSI (Fosfatos)	40 mL
Agar	20.0

Se esteriliza en autoclave. pH final =  $5.6 \pm 0.2$

SSI (Fosfatos) (g/L)	
$K_2HPO_4$	13.48
$KH_2PO_4$	16.68
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
Elementos traza	1 mL

Se esteriliza en autoclave.

Elementos traza (mg/L)	
$ZnSO_4$	439.9
$Fe(NO_3)_2$	723.5
$MnSO_4$	203.0

Los medios aquí descritos fueron usados también en forma de caldo.

### Para ensayo tripanocida:

LIT (g/L)	
NaCl	4.0
KCl	0.4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.0
Glucosa monohidratada (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> -H <sub>2</sub> O)	2.0
Triptosa	5.0
Infusión de caldo de hígado	5.0

Se esteriliza en autoclave. Se complementa con hemina (25 µg/mL) y suero fetal bovino (SFB) inactivado (56°C por una hora) al 10%, filtrándolos por una membrana de 0.22 µm en esterilidad. Primero se adiciona el medio al filtro, luego la hemina y el suero.

### Para análisis molecular:

Buffer TE c/sacarosa	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	4 %
Sacarosa	25 %

Se esteriliza en autoclave. Llevar los componentes del buffer, menos la sacarosa a un pH = 8, antes de mezclarlos

LB (Luria Bertani) (g/L)	
NaCl	10.0
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Agar	15.0

Se esteriliza en autoclave.

Para la clonación se emplearon placas de agar LB con ampicilina [150 µg/mL].

Buffer PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) (g/L)	
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24

Se esteriliza en autoclave. pH final = 7.4 ± 0.2

Solución I	
Dextrosa	50 mM
Tris	25 mM
EDTA	10 mM

Se esteriliza en autoclave.

Solución II	
NaOH	0.2 N
SDS	1 %

Solución III	
CH <sub>3</sub> COOK	5 M (60mL)
CH <sub>3</sub> COOH	11.5 mL
H <sub>2</sub> O	28.5 mM

## Anexo 2: Técnicas Moleculares

### 10.2.1 *Extracción del DNA genómico*

1. Hacer fermentaciones en un matraz Erlenmeyer de 250-mL con 50 mL de medio PDB (Potato Dextrose Broth) con el hongo a probar. Inocular el matraz de la fermentación con una asada del hongo crecido en caja Petri o 500  $\mu$ L de un cultivo anterior, incubarlo a 29°C ,180 rpm, durante 3-5 días.
2. En un sistema al vacío (Millipore) con filtros Whatman 1 estériles, filtrar un matraz con el hongo ya crecido sin dejar secar, agregando 2 volúmenes de agua destilada estéril.
3. Dejar secar y añadir un volumen de acetona al Buchner; luego de que esté seco apagar el vacío y retirar el filtro con pinzas. Pesarlos y guardarlos en una caja Petri a -20°C. A estos filtrados secos se les conoce como polvos de acetona.
4. Triturar 100 mg de polvos de acetona en un mortero estéril con ayuda de un poco de hielo seco hasta que quede un polvo fino. Dejar sublimar el hielo seco.
5. Mezclar el triturado con buffer TE (Tris EDTA) en una relación de 20 mL por cada gramo de polvo de acetona, y seguir moliendo hasta obtener una solución homogénea.
6. Pasar la solución a un tubo de centrifuga y realizar 2 extracciones con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se centrifuga 15 min a 12 000 rpm en una centrifuga Beckman a 4°C (Rotor F15-6x100y) para cada extracción y se recupera la fase acuosa evitando tomar la interfase.
7. Para precipitar el DNA, agregar 10 % de 1 volumen de NaCl 1N y 2.5 volúmenes de etanol absoluto o 1 volumen de isopropanol.
8. Almacenar a -20°C.
9. Este material puede mantenerse durante varias semanas.

### **10.2.2 Purificación del DNA genómico**

1. Centrifugar la muestra con el DNA obtenido del hongo a 12 000 rpm en una centrífuga Beckman a 4°C (Rotor F15-6x100y) por 15 min a 4°C.
2. Decantar el etanol absoluto y lavar con 5 mL de etanol al 70%.
3. Centrifugar nuevamente a 12 000 rpm en una centrífuga Beckman a 4°C (Rotor F15-6x100y) por 10 min a 4°C.
4. Decantar el etanol, quitar el excedente con pipeta y dejar secar el botón a temperatura ambiente.
5. Resuspender el botón en buffer TE (Tris EDTA) ( $\pm$  5 mL).
6. Adicionar RNAsa a una concentración final de [50  $\mu$ g/mL] (SIGMA® R4875-100MG). Incubar a 37 °C por 30 min.
7. Agregar una alícuota en tubos de 1.5 mL con 500  $\mu$ L y extraer con 500  $\mu$ L de fenol-clorofomo-isoamílico.
8. Recuperar la fase acuosa y precipitar el ADN con 2.5 volúmenes de etanol absoluto (20 min a -20°C) o con 1 volumen de isopropanol.
9. Repetir del paso 1 al 4.
10. Disolver el botón en agua destilada estéril si se va a utilizar para PCR o en buffer TE (Tris EDTA) para conservar.

### **10.2.3 Preparación de geles de agarosa al 0.8 %**

1. Pesar 0.32 g de agarosa (Vivantis®) y disolver en 40 mL de buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x.
2. Calentar 1 min para solubilizar la agarosa, y vaciar en el molde para el gel previamente nivelado.
3. Con cuidado adicionar 1  $\mu$ L de bromuro de etidio [20 mg/mL], homogeneizando con la punta de la pipeta el gel aún líquido, colocar un peine para la formación de los pozos evitando que se formen burbujas y dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Luego que haya solidificado el gel, introducirlo en la cámara de electroforesis y cubrirlo por completo con buffer TAE 1x.
5. Mezclar 1-5  $\mu$ L de muestra o 1  $\mu$ L del marcador de peso molecular [0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L] (1 kb Ladder, Thermo Scientific®) con 1  $\mu$ L de buffer de carga (Thermo Scientific®) homogeneizando con la pipeta.
6. Cargar las muestras en sus respectivos pozos y correr el gel a 80V durante 70 min.