



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**PAPEL ECOLÓGICO DE LOS BISNAFTOESPIROCETALES DEL HONGO ENDÓFITO  
*EDENIA GOMEZPOMPAE* EN LA INTERACCIÓN ANTAGÓNICA CON  
*GUIGNARDIA MANGIFERAE* Y *PHYTOPHTHORA CAPSICI***

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

MARIANO JORDI MURIÀ GONZÁLEZ



TUTORA: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava AÑO: 2010



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.

A Montserrat,  
Ariet y a mis padres.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACyT por el apoyo al proyecto 81017 que permitió el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de química y al Programa de maestría y doctorado en ciencias químicas, UNAM, por mi formación profesional.

Al CONACyT le agradezco el apoyo económico que recibí.

A mi tutora, la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, pues siempre buscó ayudarme y sacar adelante este proyecto que a veces pareció zozobrar. Le agradezco también por su amistad y los gratos momentos que compartimos.

A la Q.A. Blanca Estela Hernández Bautista le agradezco su continuo apoyo y el buen humor con el que alegra el ambiente de trabajo.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada del Instituto de Química, UNAM y a la Dra. Norma Macías Ruvalcaba de la Facultad de Química, UNAM; ambos por permitirme trabajar en sus laboratorios y brindarme su ayuda cuando de ella tuve necesidad.

A Carmen Loyola del Instituto de Biología, UNAM, por las magníficas fotografías de los hongos y por las agradables pláticas que aderezaron nuestras sesiones de trabajo.

A mi jurado, los Drs. Leovigildo Quijano, Manuel Jiménez Estrada, Ricardo Reyes Chilpa, Mamadou Moustapha Bah y José Fausto Rivero Cruz por las aportaciones que hicieron al revisar este trabajo.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang por los comentarios y sugerencias realizadas durante la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Aurora Saucedo García, a la Dra. Teresa Romero Romero y, en general, a todos los que forman parte del laboratorio de Aleopatía del Instituto de Ecología, UNAM, pues siempre sentí su apoyo

A todos los que forman parte del laboratorio de Aleopatía del Instituto de Ecología, UNAM.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por todo lo que nos ofrece y que pocas veces podemos aprovechar completamente, por ser como un segundo hogar.

A mis amigos del laboratorio: Claudio, Lety, Paulette y Rosita con los que he disfrutado tanto trabajar y divertirme, por su apoyo y por momentos que me gustaría recordar toda la vida.

A mi familia por su cariño y por ser un inestimable soporte bajo el cual he podido ir construyendo mi vida.

Finalmente quiero agradecer a Montserrat por estar siempre en los momentos más difíciles con un cariño pronto y en los mejores con una gran sonrisa, por ser mi aliciente para seguir adelante.

## A. ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>Prólogo</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>III.</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>5</b>
	1. Ecología de los hongos endófitos de plantas leñosas	6
	2. Antagonismo (interacciones interespecíficas)	9
	3. Nicho ecológico y antagonismo: dos aspectos muy importantes en los estudios bioprospectivos con hongos	12
	4. Metabolismo secundario y hongos endófitos	13
	5. Endófito <i>Edenia gomezpomape</i>	14
	6. Endófito <i>Guignardia mangiferae</i>	17
	7. <i>Callicarpa acuminata</i> , la hospedera de <i>E. gomezpomape</i> y <i>G. mangiferae</i>	18
	8. Fitopatógeno <i>Phytophthora capsici</i>	19
	9. Bisnaftoespirocetales	20
<b>IV.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>27</b>
<b>V.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>29</b>
	1. Objetivo general	29
	2. Objetivos particulares	29
<b>VI.</b>	<b>Procedimiento experimental</b>	<b>31</b>
	1. Material Fúngico	31
	<i>Edenia gomezpomape</i>	31
	<i>Guignardia mangiferae</i>	31
	<i>Phytophthora capsici</i>	31
	2. Medio de cultivo	31
	3. Bioensayos	31
	Bioensayos de antagonismo directo	31
	Análisis microscópicos de las hifas en la zona de interacción antagónica	33
	Determinación del potencial antifúngico	34
	4. Perfiles cromatográficos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de los extractos orgánicos en la interacción antagónica	35
	Obtención de los extractos orgánicos	35
	Optimización de los métodos de separación	35
	Análisis de los perfiles metabólicos	35

<b>VII. Resultados y análisis</b>	<b>38</b>
1. Bioensayos de antagonismo directo y potencial antifúngico	39
Bioensayo de antagonismo directo	39
Rendimiento de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los bioensayos de antagonismo	46
Determinación del potencial antifúngico por dilución en agar	49
2. Análisis por CLAR de los perfiles metabólicos	51
Perfiles metabólicos de <i>Edenia gomezpompae</i>	55
Perfiles metabólicos de <i>Guignardia mangiferae</i>	59
Perfiles metabólicos de <i>Phytophthora capsici</i>	64
3. Evaluación biológica de las preusomerinas EG1 y EG4	67
<b>VIII. Conclusiones</b>	<b>71</b>
<b>IX. Perspectivas</b>	<b>73</b>
<b>I. Epílogo</b>	<b>75</b>
<b>II. Referencias</b>	<b>77</b>
<b>Anexo A</b>	<b>85</b>

## B. LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos del genero <i>Guignardia</i> y su actividad biológica	16
<b>Cuadro 2.</b> Principales cultivos susceptibles a <i>Phytophthora capsici</i>	20
<b>Cuadro 3.</b> Algunas preusomerinas y palmarumicinas bioactivas	23
<b>Cuadro 4.</b> Gradientes de flujo y sistemas de elución utilizados para la separación óptima de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de <i>E. gomezpompae</i> , <i>G. mangiferae</i> y <i>P. capsici</i>	36
<b>Cuadro 5.</b> Características macroscópicas en cultivos sobre agar papa dextrosa (APD) de <i>E. gomezpompae</i> , <i>G. mangiferae</i> y <i>P. capsici</i>	40
<b>Cuadro 6.</b> Intervalos de grosor de hifa y dimensiones de las vacuolas en el bioensayo de antagonismo entre <i>E. gomezpompae</i> y <i>P. capsici</i>	44
<b>Cuadro 7.</b> Intervalos de grosor de las hifas y dimensiones de las vacuolas en el bioensayo de antagonismo entre <i>E. gomezpompae</i> y <i>G. mangiferae</i>	45
<b>Cuadro 8.</b> Rendimiento de los extractos orgánicos	47
<b>Cuadro 9.</b> Tiempos de retención de los bisnaftoespirocetales producidos por <i>E. gomezpompae</i> bajo distintas condiciones de análisis	53
<b>Cuadro 10.</b> Resumen de los picos de los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAR de los extractos de <i>E. gomezpompae</i>	57
<b>Cuadro 11.</b> Resumen de los picos de los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAR de los extractos de <i>G. mangiferae</i>	61
<b>Cuadro 12.</b> Resumen de los picos de los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAR de los extractos de <i>P. capsici</i>	65
<b>Cuadro 13.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto del control de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. gmz G)	89
<b>Cuadro 14.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. gmz NI G)	91
<b>Cuadro 15.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. gmz I G)	93
<b>Cuadro 16.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de <i>E. amarilla</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. am NI G)	95
<b>Cuadro 17.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción de <i>E. amarilla</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. am I G)	97

<b>Cuadro 18.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de el control de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>P. capsici</i> (E. gmz P)	99
<b>Cuadro 19.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>P. capsici</i> (E. gmz NI P)	101
<b>Cuadro 20.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción del bioensayo de antagonismo entre <i>E. gomezpompae</i> y <i>P. capsici</i> (E. y P. I) bajo las condiciones de análisis para <i>E. gomezpompae</i>	103
<b>Cuadro 21.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del APD bajo las condiciones de análisis para <i>E. gomezpompae</i>	105
<b>Cuadro 22.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto del control de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. gomezpompae</i> (G. mang E)	107
<b>Cuadro 23.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. gomezpompae</i> (G. mang NI E)	109
<b>Cuadro 24.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. gomezpompae</i> (G. mang I E)	111
<b>Cuadro 25.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. amarilla</i> (G. mang NI E. am)	113
<b>Cuadro 26.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. amarilla</i> (G. mang I E. am)	115
<b>Cuadro 27.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de <i>G. mangiferae</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 125 µg/mL (G 125)	117
<b>Cuadro 28.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de <i>G. mangiferae</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 250 µg/mL (G 250)	119
<b>Cuadro 29.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de <i>G. mangiferae</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 500 µg/mL (G 500)	121
<b>Cuadro 30.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del APD bajo las condiciones de análisis para <i>G. mangiferae</i>	123
<b>Cuadro 31.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto del control de <i>P. capsici</i> de los bioensayos de antagonismo (P. cap)	125
<b>Cuadro 32.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de <i>P. capsici</i> de los bioensayos de antagonismo (P. cap NI)	127
<b>Cuadro 33.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción del bioensayo de antagonismo entre <i>E. gomezpompae</i> y <i>P. capsici</i> (E. y P. I) bajo las condiciones de análisis para <i>P. capsici</i>	129
<b>Cuadro 34.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de <i>P. capsici</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 125 µg/mL (P 125)	131

<b>Cuadro 35.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de <i>P. capsici</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 250 µg/mL (P 250)	133
<b>Cuadro 36.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de <i>P. capsici</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 500 µg/mL (P 500)	135
<b>Cuadro 37.</b> Datos obtenidos en el análisis por CLAR del APD bajo las condiciones de análisis para <i>P. capsici</i>	137

**C. LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Interacciones presentes en la relación endófito planta hospedera	8
<b>Figura 2.</b> Tipos de interacciones no nutritivas entre microorganismos	10
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético donde se muestra la diferencia evolutiva entre hongos y oomicetos	19
<b>Figura 4.</b> Estructura química general de las espiroxinas (A), palmarumicinas (B) y preusomerinas (C)	21
<b>Figura 5.</b> Disposición de los inóculos en los bioensayos de antagonismo y de potencial antifúngico	32
<b>Figura 6.</b> Zonas recortadas para la obtención de extractos orgánicos y radios en los bioensayos de antagonismo	33
<b>Figura 7.</b> Variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> en cultivos en APD	40
<b>Figura 8.</b> Bioensayos de antagonismo directo	42
<b>Figura 9.</b> Microorganismos en interacción antagónica	43
<b>Figura 10.</b> Espectros en el UV de la palmarumicina CP <sub>18</sub> y la preusomerina EG <sub>3</sub>	53
<b>Figura 11.</b> Comparación del perfil cromatográfico (CLAR) del control de crecimiento de <i>E. gomezpompae</i> con el de cuatro variantes fenotípicas de este hongo	54
<b>Figura 12.</b> Cromatograma (225 nm) del extracto obtenido de un cultivo de <i>E. gomezpompae</i> de 45 días de cultivo en APD	56
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas de los bioensayos de potencial antifúngico de las preusomerinas EG <sub>1</sub> (1) y EG <sub>4</sub> (4)	70
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas de las muestras conocidas de los bisnaftoespirocetales de <i>Edenia gomezpompae</i> , analizadas bajo las condiciones determinadas para los extractos de <i>E. gomezpompae</i>	86
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas de las muestras conocidas de los bisnaftoespirocetales de <i>Edenia gomezpompae</i> , analizadas bajo las condiciones determinadas para los extractos de <i>G. mangiferae</i>	87
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas de las muestras conocidas de los bisnaftoespirocetales de <i>Edenia gomezpompae</i> , analizadas bajo las condiciones determinadas para los extractos de <i>P. capsici</i>	88
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas del extracto del control de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. gmz G)	90
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. gmz NI G)	92

---

<b>Figura 19.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de interacción de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. gmz I G)	94
<b>Figura 20.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de <i>E. amarilla</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. am NI G)	96
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de interacción de <i>E. amarilla</i> de los bioensayos con <i>G. mangiferae</i> (E. am I G)	98
<b>Figura 22.</b> Cromatogramas del extracto de el control de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>P. capsici</i> ( E. gmz P)	100
<b>Figura 23.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de <i>E. gomezpompae</i> de los bioensayos con <i>P. capsici</i> (E. gmz NI P)	102
<b>Figura 24.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de interacción del bioensayo de antagonismo entre <i>E. gomezpompae</i> y <i>P. capsici</i> (E. y P. I) bajo las condiciones de análisis para <i>E. gomezpompae</i>	104
<b>Figura 25.</b> Cromatogramas del APD bajo las condiciones de análisis para <i>E. gomezpompae</i>	106
<b>Figura 26.</b> Cromatogramas del extracto del control de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. gomezpompae</i> (G. mang E)	108
<b>Figura 27.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. gomezpompae</i> (G. mang NI E)	110
<b>Figura 28.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de interacción de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. gomezpompae</i> (G. mang I E)	112
<b>Figura 29.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. amarilla</i> (G. mang NI E. am)	114
<b>Figura 30.</b> Cromatogramas del extracto de la zona I de <i>G. mangiferae</i> de los bioensayos con <i>E. amarilla</i> (G. mang I E. am)	116
<b>Figura 31.</b> Cromatogramas del extracto <i>G. mangiferae</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 125 µg/mL (G 125)	118
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas del extracto <i>G. mangiferae</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 250 µg/mL (G 250)	120
<b>Figura 33.</b> Cromatogramas del extracto <i>G. mangiferae</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 500 µg/mL (G 500)	122
<b>Figura 34.</b> Cromatogramas del APD bajo las condiciones de análisis para <i>G. mangiferae</i>	124
<b>Figura 35.</b> Cromatogramas del extracto del control de <i>P. capsici</i> de los bioensayos de antagonismo (P. cap)	126
<b>Figura 36.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de <i>P. capsici</i> de los bioensayos de antagonismo (P. cap NI)	128

<b>Figura 37.</b> Cromatogramas del extracto de la zona de interacción del bioensayo de antagonismo entre <i>E. gomezpompa</i> e y <i>P. capsici</i> (E. y P. I) bajo las condiciones de análisis para <i>P. capsici</i>	130
<b>Figura 38.</b> Cromatogramas del extracto <i>P. capsici</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 125 µg/mL (P 125)	132
<b>Figura 39.</b> Cromatogramas del extracto <i>P. capsici</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 250 µg/mL (P 250)	134
<b>Figura 40.</b> Cromatogramas del extracto <i>P. capsici</i> del bioensayo de potencial antifúngico a 500 µg/mL (P 500)	136
<b>Figura 41.</b> Cromatogramas del APD bajo las condiciones de análisis para <i>P. capsici</i>	138

## D. LISTA DE GRÁFICAS Y ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Determinación del porcentaje de inhibición en los bioensayos de antagonismo	33
<b>Gráfica 1.</b> Actividad antifúngica de los extractos de <i>E. gomezpomape</i> a 125, 250 y 500 µg/mL, sobre el crecimiento de <i>G. mangiferae</i> y <i>P. capsici</i> y sobre sí misma	49
<b>Gráfica 2.</b> Actividad antifúngica de las preusomerinas EG <sub>1</sub> (1) y EG <sub>4</sub> (4) sobre el crecimiento <i>G. mangiferae</i> y <i>Phytophthora capsici</i> a 100 µg/mL	67

## E. TABLA DE ABREVIATURAS Y FORMULAS

APD	Agar papa dextrosa
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Cloruro de metileno
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
°C	Grados centígrados
g	Gramos
H <sub>2</sub> O	Agua
hrs	Horas
I	Zona de interacción antagónica directa
Inh%	Porcentaje de inhibición
MeCN	Acetonitrilo
µg/mL	Microgramos por mililitro
min	Minutos
mL/min	Mililitros por minuto
mm	Milímetros
µm	Micrómetros
NI	Zona de no interacción antagónica directa
r <sub>e</sub>	Radio externo de las colonias creciendo en antagonismo
r <sub>i</sub>	Radio interno de las colonias creciendo en antagonismo
UA	Unidades de absorbancia
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México



## I. PRÓLOGO

*“Estos hombres siempre serán unos desconocidos para el resto de la población; no tienen poder, fortuna u honores; ni siquiera hay alguien que entienda el placer que les procura su pequeña actividad. Sin embargo son la potencia más grande del mundo, y lo son por un motivo muy simple, un motivo muy pequeño: detentan las claves de la certeza racional.”*

MICHEL HOUELLEBECQ  
*Las Partículas elementales*

Se dice que la curiosidad mató al gato, sin embargo, si hay un animal curioso es el ser humano y en nuestra fiebre por conocer lo que nos es ajeno nos envolvemos en fantasías y justificaciones. No podemos negar que la fascinación por lo desconocido es lo que nos incita a la investigación científica, sin embargo nos afanamos en disfrazar con velos de altruismo nuestras actividades. Efectivamente requerimos de la investigación para enfrentar los retos que la sociedad actual, construida sobre los pilares de nuestra curiosidad, nos demanda; cierto es que las enfermedades, los problemas ecológicos, la insuficiencia o más bien la ineficiencia agraria junto con muchas otras contrariedades nos encaminan hacia un oscuro futuro. Mentiría si dijera que no me enorgullece pensar que como científicos tenemos la responsabilidad y la posibilidad de repercutir positivamente en la senda que la humanidad está trazando, no obstante, el camino que he elegido no lo tomo por sus consecuencias ulteriores si no porque siento placer al pensar que comprendo un poco más mi entorno con cada paso que doy.

Jordi Muria González, 2010

## II. INTRODUCCIÓN

Los endófitos son microorganismos que infectan a las plantas sin que se manifiesten síntomas de dicha infección y parecen ayudar al organismo vegetal a mejorar su adaptabilidad ecológica. Las interacciones establecidas entre huésped y hospedero son todavía poco claras sobre todo en lo que respecta a los endófitos de plantas leñosas; no obstante, dicha relación dista mucho de ser una interacción neutra y los organismos involucrados se afectan mutuamente. Un aspecto de suma importancia en las relaciones bióticas involucradas en la asociación planta endófito, es la producción de sustancias químicas, ya sean metabolitos primarios o secundarios, por parte de los individuos involucrados. Estas sustancias desempeñan un papel importante en las interacciones que los endófitos establecen con microorganismos patógenos y herbívoros que atacan a su hospedera. Por lo anterior, y considerando la variación en el metabolismo secundario entre los miembros del reino Fungi y el desconocimiento de la mayoría de las especies endófitas, estos organismos representan una fuente atractiva de sustancias bioactivas novedosas de las cuales la humanidad se encuentra ávida por su posible aplicación en distintas áreas como la medicina y la agronomía (Schulz y Boyle, 2005; van Bael *et al.*, 2005; Azevedo y Welington, 2006).

En la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural con posible aplicación práctica, se han generado diversas metodologías de análisis y selección (“screening”), las cuales difieren por los criterios aplicados. Algunos de los aspectos que se toman en cuenta para dichos análisis, son: el nicho ecológico de los organismos en estudio, el potencial antagónico que poseen o los perfiles metabólicos de los mismos. El papel que desempeña un organismo en el ambiente está relacionado íntimamente con el tipo de metabolitos que produce, por lo que la elección adecuada del nicho es primordial para incrementar las posibilidades de encontrar compuestos que posean actividades biológicas específicas. Al tomar en cuenta el potencial antagónico, la búsqueda está dirigida hacia sustancias involucradas en la antibiosis, un mecanismo importante durante el antagonismo interespecífico entre microorganismos. Por último, los perfiles metabólicos, usados tanto en metabolómica como en el análisis y selección químico, permiten, a través de estudios cromatográficos, la identificación de nuevos compuestos en el metaboloma. El conjunto de

estas técnicas conduce a un mejor entendimiento de la función que desempeñan los metabolitos en los ecosistemas y al descubrimiento de nuevas sustancias que puedan tener aplicación en diversas áreas del conocimiento (Fiedler, 1993; Gloer, 1995; Schulz *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2004).

En este proyecto se estudió la especie endófito *Edenia gomezpompae* en su interacción antagónica con *Guignardia mangiferae*, un endófito de la misma planta, y *Phytophthora capsici*, un fungoide fitopatógeno que afecta varios cultivos importantes en nuestro país como el chile y la calabaza. *E. gomezpompae* es un hongo endófito de *Callicapa acuminata* (Verbenaceae) productor de diversos compuestos conocidos como bisnaftoespirocetales que presentan actividad antibacteriana, fungitóxica, antiparasitaria y antitumoral (Krohn, 2003; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008;). Considerando que la interacción antagónica entre hongos puede tener un componente alelopático muy importante, se partió del supuesto que los bisnaftoespirocetales producidos por *E. gomezpompae* están involucrados en la interacción de éste con otros microorganismos y en la respuesta química de estos últimos, por lo que el objetivo primordial de esta investigación fue determinar la relevancia de los bisnaftoespirocetales en la interacción antagónica de *Edenia gomezpompae* con *Phytophthora capsici* y *Guignardia mangiferae*, y en la producción de metabolitos secundarios por estos dos microorganismos. Para evaluar el papel de estos compuestos, se realizaron bioensayos que abarcaron tres niveles: organismo completo (antagonismo directo), extractos orgánicos y compuestos puros producidos por *E. gomezpompae*. En dichos bioensayos se analizaron cromatográficamente los perfiles metabólicos de los tres microorganismos.

### III. ANTECEDENTES

El reino Fungi es enorme, cálculos conservadores de los expertos mencionan que la diversidad mundial de estos organismos es de 1.5 millones de especies, de los cuales sólo se conoce aproximadamente un 5%. Sin embargo existe la posibilidad de que tan sólo los hongos asociados a plantas podrían llegar a 1.62 millones. En México se calcula que se desconoce el 96.5% de las especies de hongos (Guzmán, 1998). Dentro del grupo de los hongos asociados a plantas se encuentran los hongos endófitos que, considerando la relación promedio entre el número de éstos y las plantas a las que se encuentran asociados, contribuyen a un cálculo más aproximado del total de especies fúngicas (Hawksworth, 2001).

La palabra endófito quiere decir “dentro de la planta” y ha sido utilizada para referirse a bacterias, hongos, algas e insectos, sin importar la relación que los huéspedes guardan con su planta hospedera. Actualmente, el término se utiliza para referirse a los microorganismos que en algún periodo de su ciclo vital habitan dentro de las plantas colonizando sus tejidos sin causar perjuicio aparente y, más específicamente, la palabra endófito ha sido utilizada por los micólogos para referirse a los hongos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida dentro de su planta hospedera. A pesar de que algunos hongos endófitos son fitopatógenos potenciales, no causan síntomas evidentes de enfermedad (Arnold, 2005, Schulz y Boyle, 2005; Azevedo y Welington, 2006).

Los hongos endófitos guardan relación tanto con los hongos fitopatógenos como con los saprófitos. Se ha propuesto que algunos hongos endófitos pueden ser fitopatógenos que se encuentran en un estado latente y que en situaciones de estrés o senescencia de la planta pueden manifestar su patogenicidad. Desde el punto de vista evolutivo, se piensa que los hongos endófitos han perdido sus factores de virulencia o que la planta hospedera ha desarrollado las defensas necesarias que controlan el desarrollo del huésped. También se ha visto que algunos hongos que colonizan los tejidos de una planta nativa de alguna zona, se comportan como endófitos, sin embargo, pueden comportarse como fitopatógeno en plantas ajenas a dicho lugar. Con respecto a la relación que guardan los hongos endófitos con los saprófitos se ha especulado que podrían ser los endófitos los primeros en comenzar la

descomposición de los tejidos vegetales cuando comienza la senescencia de la planta hospedera, lo cual significaría que son saprófitos latentes (Promputtha, *et al.*, 2007; Sieber, 2007).

### **1. Ecología de los hongos endófitos de plantas leñosas**

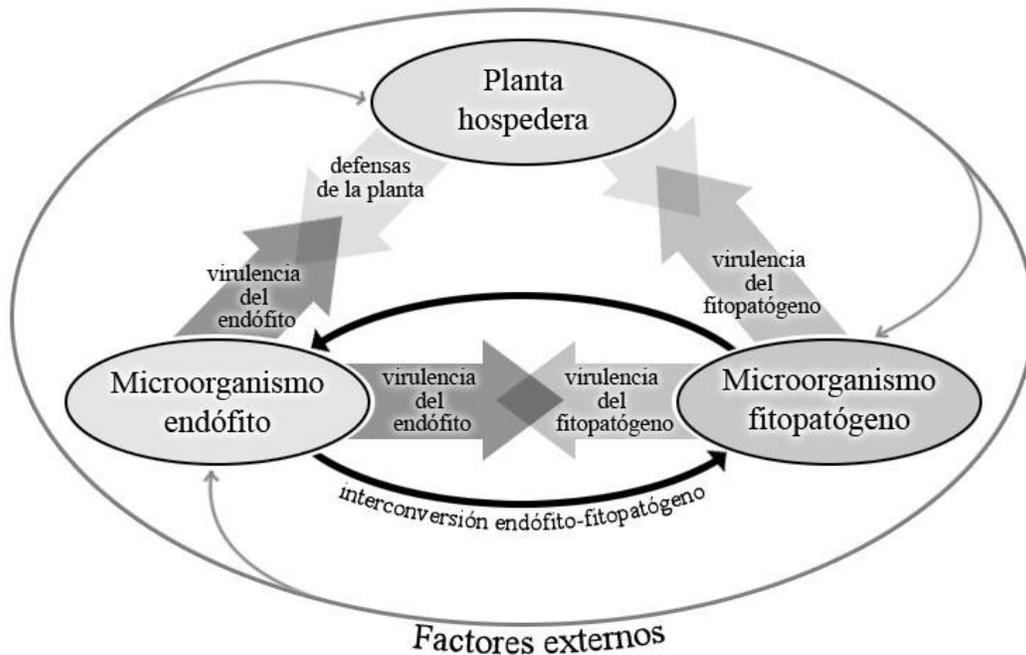
Muchos aspectos de la ecología de los endófitos de plantas leñosas son aún desconocidos o inciertos debido a los problemas experimentales que implica su estudio, como por ejemplo la dificultad de tener plantas adultas control y lo arriesgado de las extrapolaciones de los fenómenos *in vitro* a los fenómenos *in vivo* (Arnold, 2005).

La relación que los hongos endófitos guardan con sus hospederas y la distribución de estos microorganismos entre las distintas especies vegetales, está influenciada altamente por los metabolitos secundarios tanto de la planta como del hongo. Una gran cantidad de hongos endófitos de plantas leñosas tropicales tienen comportamientos generalistas (no son huéspedes específicos de una especie particular), sin embargo varios de estos microorganismos son aislados más frecuentemente de una especie que de otras, lo que demuestra cierta especificidad que en parte parece deberse a la presencia de algunos metabolitos secundarios en el organismo hospedero (Arnold, 2005; Schulz y Boyle, 2005). La especificidad en la colonización de los tejidos vegetales es todavía poco clara, a veces se han aislado hongos de órganos específicos, pero otras veces esta especificidad no es observada. Se sabe que cuando al medio de cultivo de un hongo endófito que muestra afinidad sobre una planta se le agrega extracto de ésta, el crecimiento del microorganismo se favorece. Por otro lado, es interesante resaltar que muchos metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos se han aislado en cultivos *in vitro*, sin embargo el único metabolito secundario que se ha demostrado que es sintetizado dentro del hospedero es la rugulosina, un compuesto producido por el hongo endófito *Phialocephala scopiformis* de *Picea glauca*; esto quizás se deba a que la colonización por parte de los endófitos de las plantas leñosas es localizada y la concentración de sus metabolitos secundarios dentro de las hospederas puede ser muy pequeña para poder ser detectados (Isaac, 1992; Miller *et al.*, 2002; Arnold, 2005; Schulz y Boyle, 2005; Sumarah *et al.*, 2008).

El conocimiento sobre los costos y beneficios de la interacción entre los endófitos y las plantas leñosas de zonas tropicales es muy escaso, pero la gran cantidad de endófitos asociados a plantas en estas zonas hace pensar que hay relaciones ecológicas significativas. En cuanto a los beneficios que los hongos endófitos obtienen de la planta, si bien es cierto que estar dentro de ésta los aísla y protege del medio externo y les proporciona nutrientes, también es verdad que el medio interno puede llegar a ser agresivo ya que una planta puede contener decenas de especies distintas de endófitos, los cuales deben competir entre sí. Además, los hongos endófitos deben enfrentar a las defensas químicas de la planta hospedera. Albergar un hongo endófito productor de aleloquímicos representa ciertos costos para la planta: el hongo consume algunos recursos de ésta que utiliza tanto para su desarrollo como para la generación de metabolitos secundarios, por ejemplo, la producción de alcaloides por parte del microorganismo que consume nitrógeno que la planta requiere, además, los metabolitos del hongo endófito pueden resultar tóxicos para la hospedera. Sin embargo, la distribución localizada dentro de las plantas leñosas hace que el efecto negativo de la presencia del hongo sea mínimo. No obstante, la planta hospedera también obtiene beneficios. Por ejemplo, se ha reportado que algunos hongos endófitos de los pastos pueden mejorar la adaptabilidad ecológica de su hospedera. Los mecanismos de estas interacciones no están bien definidos y aunque se sabe que algunos endófitos pueden producir metabolitos secundarios que en las plantas hospederas favorecen su crecimiento, la tolerancia a condiciones de estrés, la resistencia a patógenos y herbívoros, etc., existen muy pocos trabajos que correlacionen con certeza la producción de estos metabolitos con el beneficio observable (Isaac, 1992; Tan y Zou, 2001, Faeth, 2002; Hyakumachi y Kubota, 2004; Arnold; 2005; Schulz y Boyle, 2005; Van Bael *et al.*, 2005).

Varios investigadores mencionan que no existen interacciones neutras entre los hongos endófitos y sus plantas hospederas, más bien estas interacciones constituyen antagonismo en equilibrio. Es decir, aunque la planta y el hongo pueden obtener beneficios uno del otro, por un lado las defensas de la planta deben controlar el desarrollo de los hongos que la colonizan y, por otro, los endófitos tienen un grado de virulencia latente. Cuando se establece un equilibrio entre ambos organismos podemos observar una relación endófito. Factores externos pueden afectar dicho equilibrio y un endófito puede comportarse como patógeno si su virulencia supera las defensas vegetales. Además, los

microorganismo endófitos, deben desarrollar mecanismos que les permitan hacer frente a otros hongos con los que comparten su hábitat, ya sean endófitos o fitopatógenos. A esta compleja relación se le denominó antagonismo balanceado (Figura 1). Debido a la constante lucha entre los hongos endófitos y su planta hospedera, este tipo de interacciones son importantes para realizar estudios ecológicos y de bioprospección (Isaac, 1992; Schulz *et al.*, 1999; Tan y Zou, 2001; Schulz y Boyle; 2005; Kogel *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Interacciones presentes en la relación endófito planta hospedera (modificado de Schulz *et al.*, 1999).

Otro aspecto importante de la ecología de los hongos endófitos es la manera en que colonizan a su hospedera. Por ejemplo, se sabe que los hongos endófitos de las plantas leñosas tienen una transmisión horizontal a diferencia de la transmisión vertical de los hongos endófitos que colonizan pastos. En las primeras la infección no se transmite de la planta madre a la descendencia a través de la semilla. El mecanismo de colonización en plantas leñosas es conocido como “lluvia de esporas” donde la nueva planta entra en

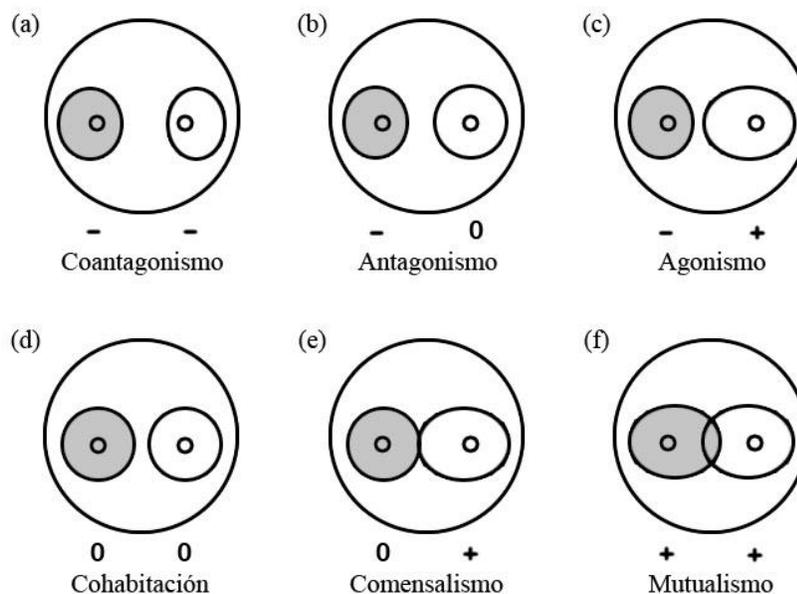
contacto con esporas de diversos hongos al depositarse éstas en la superficie de la misma. Cuando las condiciones son adecuadas las esporas germinan y se introducen en los tejidos vegetales, penetrando la cutícula o a través de los estomas. Además de éste, que es mecanismo principal, pueden existir otros como la herbivoría en la que los insectos herbívoros ayudan a la transmisión de los endófitos. La infección de los tejidos vegetales aumenta con el tiempo, llegando a su clímax entre las cuatro y ocho semanas después de la lluvia de esporas. Durante esta sucesión, las interacciones interespecíficas entre los distintos hongos que buscan colonizar la planta definen la alta biodiversidad fúngica de los endófitos (Schulz y Boyle; 2005; Van Bael *et al.*, 2005).

## **2. Antagonismo (interacciones interespecíficas)**

Los seres vivos pueden interactuar interespecífica o intraespecíficamente. Las interacciones interespecíficas se dan entre organismos de distintas especies a través de diferentes mecanismos y se definen por los efectos netos observables en los organismos en un determinado espacio y tiempo. Dichas interacciones son dinámicas y se encuentran condicionadas a los factores bióticos y abióticos del medio.(Wiklow, 1992; Tuininga, 2005)

Los organismos interactúan porque comparten algún recurso y la manera en que interactúan está definida por las estrategias que dichos organismos siguen. A continuación se explican los principales tipos de estrategias empleadas por los hongos y se definen los tipos de interacción interespecífica y sus mecanismos desde el punto de vista de la ecología de hongos: 1) hongos ruderales (R): los hongos que siguen estrategias ruderales crecen rápidamente, colonizando los recursos nuevos y consumiéndolos hasta agotarlos; 2) hongos tolerantes al estrés (S): estos microorganismos son capaces de sobrevivir en condiciones constantes de estrés, son hongos especializados; y 3) hongos competitivos (C): estos hongos pueden desplazar a otros organismos que se encuentran colonizando algún recurso. Esta clasificación agrupa las estrategias primarias que siguen los hongos y no una clasificación estricta, ya que también pueden presentarse comportamientos intermedios e incluso en el mismo micelio pueden presentarse distintas estrategias al mismo tiempo (Dix y Webster, 1995).

Para analizar las interacciones interespecíficas, conviene separar aquellas que están definidas por una relación nutritiva y aquellas donde el hongo interactúa con un organismo del cual no obtiene nutrimentos directamente. Las primeras corresponden al biotrofismo que se define como la adquisición de nutrientes de células vivas del hospedero, al necrotrofismo que es la adquisición de nutrientes de un organismo muerto y al saprotrofismo, donde el hongo obtiene sus nutrientes de materia en descomposición. Las relaciones no nutritivas se esquematizan en la Figura 2 y son las que se pueden observar en los bioensayos de antagonismo *in vitro* (Tuininga, 2005).



**Figura 2.** Tipos de interacciones no nutritivas entre microorganismos: a) coantagonismo: ambos microorganismos se encuentran negativamente afectados; b) antagonismo: efecto negativo sobre un microorganismo mientras que el otro permanece inalterado; c) agonismo: efecto negativo de un microorganismo mientras el otro presenta uno positivo; d) cohabitación: interacción cercana a la neutralidad; e) comensalismo: uno de los microorganismos no se ve afectado mientras el otro se beneficia; f) mutualismo: ambos microorganismos se afectan positivamente (Tuininga, 2005).

Las interacciones no nutritivas están regidas por distintos mecanismos que pueden clasificarse en indirectos y directos. Las interacciones indirectas son las que tienen lugar sin necesidad de contacto entre los organismos y son consecuencia de la liberación de

compuestos orgánicos volátiles, metabolitos secundarios, enzimas y algunos metabolitos primarios como alcoholes y aldehídos (estos últimos resultan autotóxicos). Los compuestos volátiles inhiben a distancia y se les ha señalado como uno de los factores responsables de la fungistasis (ausencia de germinación de esporas fúngicas). Los metabolitos secundarios que se difunden en el medio pueden tener efectos sobre el desarrollo de otros organismos que crecen en la proximidad del microorganismo productor. Durante las relaciones antagónicas, se ha observado un aumento en la producción enzimática de especies reactivas de oxígeno, un incremento de lacasas en la zona de interacción, al parecer relacionado con la producción de melanina y compuestos similares que se presentan en las interacciones interespecíficas, así como un aumento en la producción de quitinasas (Deacon, 1988; Dix y Webster, 1995; Woodward y Boddy, 2008).

Las interacciones directas son, al parecer, más eficientes y menos dependientes de la abundancia de nutrientes, requieren del contacto de las colonias y se pueden dividir en: a) interacción por contacto de hifas, que a su vez se subdividen en interferencia hifal y micoparasitismo, y b) por contacto de micelio. La interferencia hifal es un fenómeno restringido a las células en contacto o sumamente cercanas y en algunos casos puede afectar a las células contiguas, las células afectadas dejan de crecer y el citoplasma parece opacarse, se observa la proliferación de vacuolas, pérdida de turgencia y la absorción de algunos colorantes, probablemente relacionado con un cambio en la permeabilidad de la membrana, lo que conduce a la muerte de la célula o de todo el micelio en caso del contacto múltiple. Este tipo de interacción ha sido observada principalmente en basidiomicetos aunque hay algunos ejemplos de actinomicetos que presentan este tipo de interacción. Al parecer, las puntas de las hifas son las células más activas mientras que las células de crecimiento son las más susceptibles (Deacon, 1988; Dix y Webster, 1995; Woodward y Boddy, 2008).

El micoparasitismo podría verse como una extensión de la interferencia hifal y es un mecanismo que aunque está involucrado en las relaciones antagónicas entre hongos, tiene un gran componente nutricional y está íntimamente relacionado con las interacciones biótropas y necrótrofas. Una vez cercanas las hifas de los microorganismos, el micoparásito puede extender estructuras hacia la hifa hospedera a través de las cuales secreta enzimas y metabolitos para obtener a cambio nutrimentos; algunos micoparásitos pueden acoplarse a

las hifas de su hospedero para establecer una relación más estrecha y otros pueden enrollar y hasta penetrar al organismo parasitado, lo cual favorece el intercambio de sustancias y permiten al parásito consumir y matar al hospedero (Deacon, 1988; Dix y Webster, 1995; Tuininga, 2005; Woodward y Boddy, 2008).

La interacción que se da a nivel de contacto de micelio se utiliza para referirse a aquellos mecanismos no contemplados en la interacción indirecta, la interferencia hifal y el micoparasitismo, que se dan al entrar en contacto dos micelios. La morfología del micelio cambia, formando barreras físicas, cordones miceliares, mechones aéreos, etc. Los micelios pueden entremezclarse sin aparentar perjuicio entre las colonias, no obstante lo más común es que al final un hongo domine la interacción. El resultado final del contacto de micelios puede categorizarse en tres grupos: 1) avance del micelio del hongo dominante que produce lisis de las células del competidor, 2) crecimiento del microorganismo dominante sobre el micelio del microorganismo débil a la vez que se produce la muerte de éste y, 3) crecimiento del hongo dominante sobre el microorganismo débil con posterior muerte de éste (Woodward y Boddy, 2008).

Independientemente de los mecanismos de las relaciones interespecíficas, todas están fundamentadas en la interacción química que al final tienen su base en la expresión del genotipo de cada microorganismo. De esta manera, la plasticidad fenotípica, la habilidad de un genotipo para producir características alternativas, ya sean morfológicas, fisiológicas o de comportamiento en respuesta a condiciones ambientales, cobra relevancia en estas relaciones. La plasticidad fenotípica puede producir cambios inmediatos o a largo plazo así como permanentes o reversibles, estos cambios fenotípicos permiten a un organismo adaptarse a variaciones en sus microhábitats y reaccionar a la respuesta inmune de los hospederos (Fordyce, 2006; Jain *et al.*, 2008; Woodward y Boddy, 2008).

### **3. Nicho ecológico y antagonismo: dos aspectos muy importantes en los estudios bioprospectivos con hongos**

En los estudios bioprospectivos el objetivo es encontrar compuestos bioactivos con posibles aplicaciones prácticas. Debido a que los hongos son organismos productores de una amplia variedad de metabolitos secundarios, se han convertido en blanco de numerosos

estudios de este tipo. La mayoría de ellos parten de análisis y selecciones que, por lo general, no toman en cuenta el nicho ecológico de estos microorganismos, a pesar de que este enfoque, directamente relacionado con el papel que desempeñan los organismos en su ambiente natural, sería de gran ayuda en la búsqueda de actividades específicas. Dentro de este contexto, Gloer (1995) proporciona ejemplos de la importancia de los hongos coprófilos que viven en ambientes ricos en nutrientes como son los excrementos de los herbívoros, en la búsqueda de compuestos con actividad antifúngica. En estos ambientes se encuentra una gran variedad de microorganismos que tienen que competir por los recursos que dicho sustrato provee, por medio de mecanismos como el antagonismo. De esta manera, es probable encontrar entre estos microorganismos hongos productores de metabolitos secundarios bioactivos y si, además se realizan pruebas de antagonismo, donde se hacen crecer dos hongos, uno frente al otro, y se observan los efectos de la interacción entre ambos, se puede elegir con más acierto a un buen productor de compuestos antifúngicos. Bajo este mismo criterio es acertado proponer a los hongos endófitos como un buen objeto de estudio para la bioprospección. Diversos estudios han demostrado a estos microorganismos como una fuente prometedora de compuestos novedosos bioactivos dentro del reino Fungi (Gloer, 1995; Shearer, 1995; Saxena y Pandey, 2001; Schulz *et al.*, 2002).

#### **4. Metabolismo secundario y hongos endófitos**

Los hongos producen diversos metabolitos secundarios que al ser liberados al ambiente repercuten en las condiciones de éste así como en el crecimiento, salud y conducta de otros organismos, dando origen a las diversas relaciones químicas entre los hongos y otros seres vivos; estas relaciones son objeto de estudio de la ecología química. Anaya (2003) afirma que la ecología química puede avanzar dentro de un equilibrio “ideal” entre la ciencia básica - generando información sobre los mecanismos de relación química entre los organismos- y la ciencia aplicada -buscando un manejo de los recursos bióticos más adecuado y menos dañino para el ambiente.

Dada su importancia aplicada, los químicos orgánicos llevan mucho tiempo trabajando con los metabolitos secundarios o productos naturales y han estudiado

profundamente las propiedades de los compuestos fitoquímicos desde 1850. La investigación en el área de los productos naturales ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías para la separación de compuestos, métodos espectroscópicos para elucidar estructuras y estrategias sintéticas que ahora constituyen la base de la química orgánica contemporánea. El interés por los metabolitos secundarios no sólo es académico, el ser humano les ha dado una utilidad desde siempre y muchos de ellos han cobrado una importancia económica notable como aceites, ceras, gomas, fibras, esencias, fármacos, saborizantes, etc. Además, se ha encontrado en ellos una fuente muy grande de compuestos bioactivos y se ha comprobado su importante papel ecológico, lo cual provocó que el interés en estas sustancias recibiera más atención por parte de los biólogos (Buchanan *et al.*, 2000).

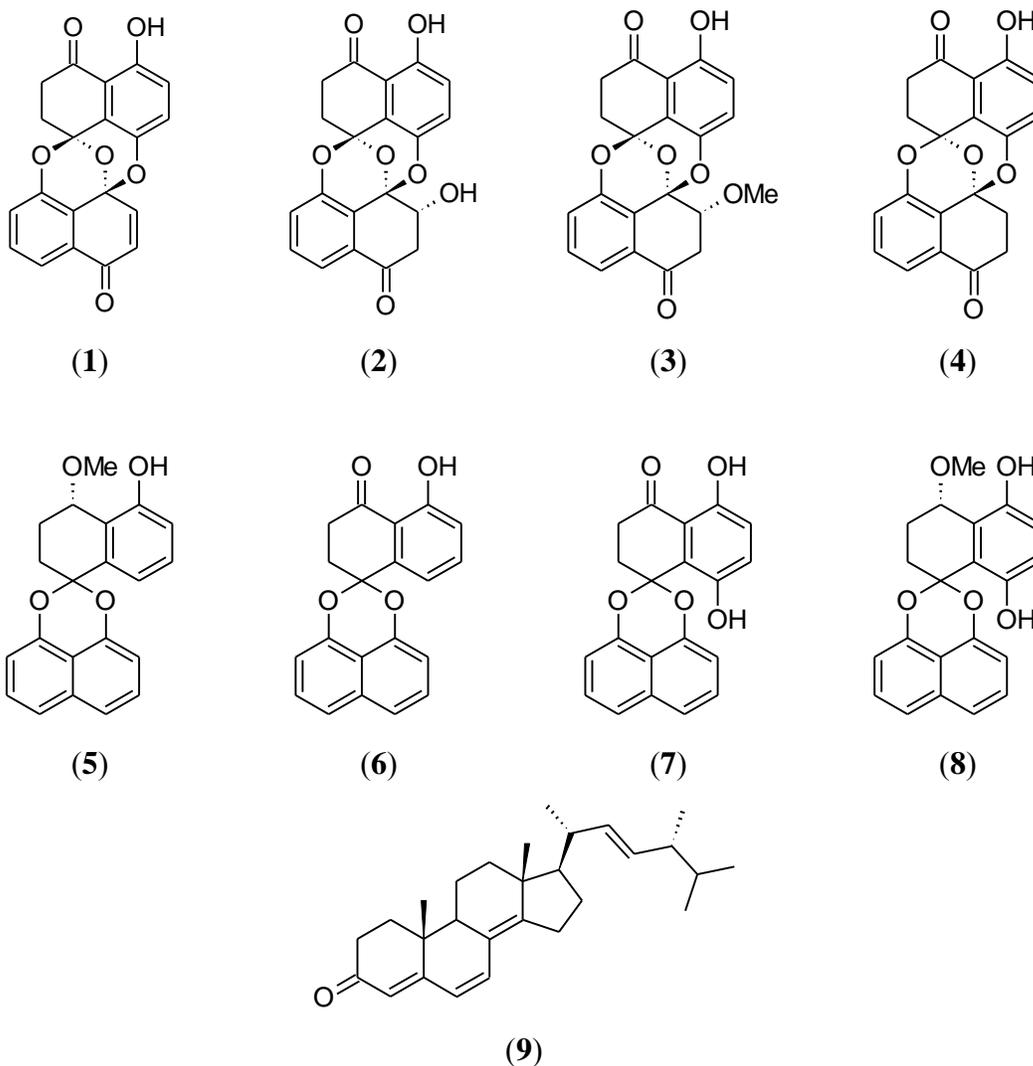
La producción de metabolitos secundarios por los hongos es una de sus características principales pues sintetizan una gran variedad de estos compuestos. Los metabolitos secundarios son aptos para ingresar a los sistemas biológicos, interactuar con un receptor o blanco molecular y penetrar a las células donde pueden afectar diversos procesos fisiológicos. Esta es la razón de su actividad biológica y farmacológica. Hasta ahora, de todos los microorganismos que han sido estudiados, los hongos son aquellos de los cuales se ha obtenido la mayor variedad de metabolitos secundarios (Guanatilaka, 2006).

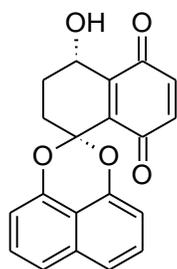
### **5. Endófito *Edenia gomezpompae***

El hongo endófito *Edenia gomezpompae* fue aislado de hojas sanas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), una planta que en un estudio fitoquímico previo demostró ser productora de compuestos con actividad antifúngica sobre diferentes hongos fitopatógenos (Saucedo-García, 2006; Anaya *et al.*, 2003). *E. gomezpompe* no genera estructuras reproductivas, por lo que su caracterización se realizó por medios moleculares indicando que se trata de una especie y género nuevos para la ciencia dentro de la familia Pleosporeaceae (González *et al.*, 2007). Los metabolitos secundarios mayoritarios producidos por este hongo se conocen como preusomerinas y desoxipreusomerinas o

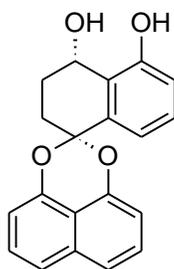
palmarumicinas y pertenecen al grupo de los bisnaftoespirocetales cuyas actividades biológicas y estructuras los han vuelto blanco de numerosas investigaciones.

*Edenia gomezpompa* es productora de cuatro preusomerinas novedosas: EG<sub>1</sub> (**1**), EG<sub>2</sub> (**2**), EG<sub>3</sub> (**3**) y EG<sub>4</sub> (**4**) y de la nueva palmarumicina EG<sub>1</sub> (**5**), además de las palmarumicinas conocidas CP<sub>2</sub> (**6**), CP<sub>17</sub> (**7**) y CP<sub>18</sub> (**8**). Estos compuestos han mostrado actividad antifúngica sobre diferentes microorganismos endófitos y fitopatógenos. De manera adicional, *E. gomezpompa* también produce un ergostano, la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**9**) (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; González-Meléndez, 2009).

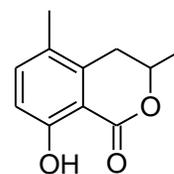




(10)



(11)



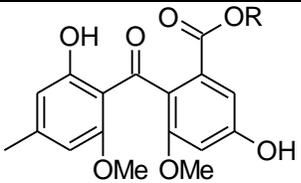
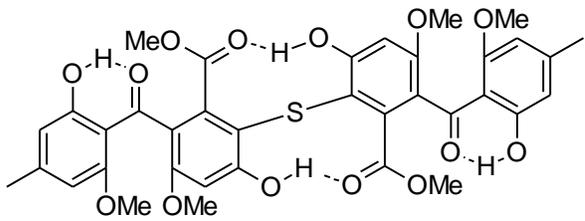
(12)

Martínez-Luis y colaboradores (2008) aislaron de las hojas maduras de *Petrea volubilis* L. (Verbenaceae), colectadas en el Parque Nacional de Coiba en Panamá, un hongo endófito caracterizado como *Edenia* sp. El estudio químico permitió el aislamiento y caracterización de ocho metabolitos secundarios con actividad antileishmania: las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**1**) y EG<sub>2</sub> (**2**), y las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (**6**), CP<sub>17</sub> (**7**), CP<sub>18</sub> (**8**), CP<sub>19</sub> (**10**) y CJ-12,371 (**11**) y la 5-metillicracina (**12**) (Martínez-Luis *et al.*, 2008; 2009).

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos del genero *Guignardia* y su actividad biológica.

Compuesto	Actividad biológica
<p>(13) ácido gignárdico</p>	Ninguna reportada (Rodrigues-Heerklotz <i>et al.</i> , 2001)
<p>R=H (<b>14</b>) vermistatina R=OMe (<b>15</b>) metilvermistatina R=OH (<b>16</b>) hidroxivermistatina</p>	Citotóxicos y Antitumorales (Xia <i>et al.</i> , 2007)

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos del genero *Guignardia* y su actividad biológica reportada (continuación).

Compuesto	Actividad biológica
 <p>R=Me (<b>17</b>) monometilsulocrina R=H (<b>18</b>) ácido rhizoctónico</p>	<p>Antitumorales y anti <i>Helicobacter pylori</i> (Wang <i>et al.</i>, 2010)</p>
 <p>(<b>19</b>) gignasulfuro</p>	<p>Antitumorales y anti <i>Helicobacter pylori</i> (Wang <i>et al.</i>, 2010)</p>

## 6. Endófito *Guignardia mangiferae*

*Guignardia mangiferae* es un hongo generalista que ha sido aislado de especies vegetales de distintas familias distribuidas alrededor de todo el mundo y que es conocido también como *G. endophyllicola* (Okane *et al.*, 2003, Baayen *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2006). Durante muchos años, a *G. mangiferae* se le confundió con *G. citricarpa*, pues se habían aislado juntos y son morfológicamente muy similares. *G. citricarpa* es un microorganismo fitopatógeno causante de la mancha negra en los cítricos, enfermedad que se encuentra bajo restricciones fitosanitarias (se restringe la entrada, a ciertos países, de frutos posiblemente infectados con este microorganismo). Mientras que *G. citricarpa* causa daño en los frutos cítricos, *G. mangiferae* coloniza los tejidos vegetales de forma asintomática.

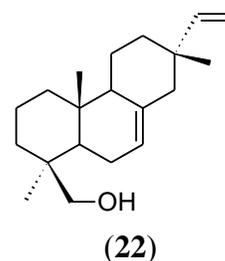
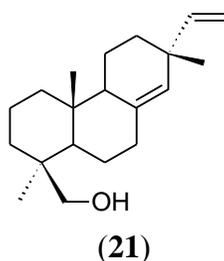
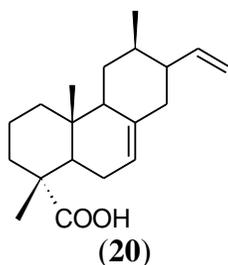
A la fecha son escasos los estudios químicos y biológicos conducidos sobre el hongo *G. mangiferae*. Algunos extractos orgánicos de especies endófitas de *Guignardia* sp. demostraron una moderada actividad biológica sobre el crecimiento de actinomicetos (*Actino* sp.), bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), levaduras

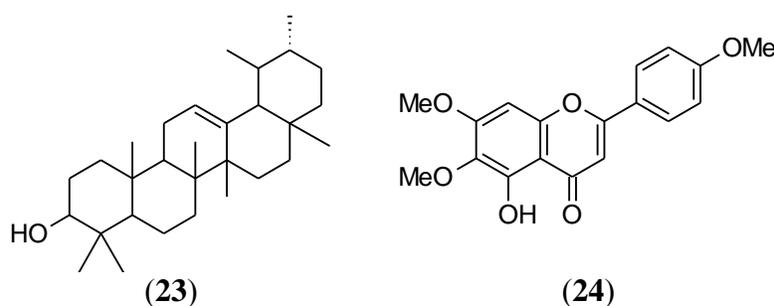
(*Saccharomyces cerevisiae*) y hongos filamentosos (*Geotrichum* sp. y *Penicillium canadensis*). En el Cuadro 1 se muestran los metabolitos secundarios y la actividad biológica demostrada por los compuestos aislados de diferentes aislamientos endofíticos de *Guignardia* sp. (Rodrigues *et al.*, 2000; Rodrigues-Heerklotz *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2008; Phongpaichit *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2007; Wang, *et al.*, 2010).

### 7. *Callicarpa acuminata*, la hospedera de *E. gomezpompae* y *G. mangiferae*

*Callicarpa acuminata*, “Pukim”, “Sakpuc’im” o “Xpucyim” es un arbusto ampliamente distribuido en México, desde la península de Yucatán hasta San Luis Potosí y Tamaulipas por la vertiente del Golfo, además se encuentra en Chiapas, Oaxaca y Puebla. Los ejemplares de donde se aislaron *E. gomezpompae* y *G. mangiferae*, con los que se trabajó en este proyecto, provienen de la reserva ecológica de “El Edén” que se encuentra en Quintana Roo, en donde *C. acuminata*, tiene una amplia distribución y se le encuentra en toda la vegetación secundaria.

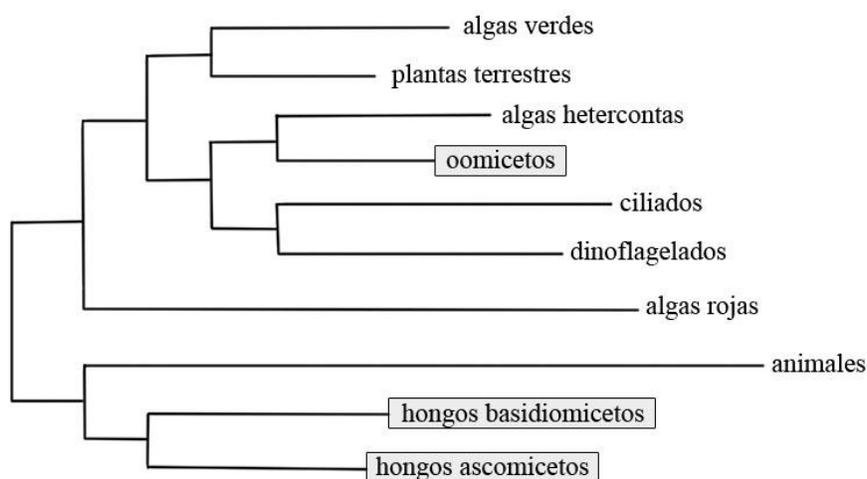
*C. acuminata* es un arbusto con tallos rectos, poco o nulamente ramificados, cubiertos de pelo blanquecino, hojas de diez a veinticinco centímetros con forma de lanza, de haz verde oscuro y envés tomentoso blanco, cuya altura varía de uno a tres metros. Forma vistosas inflorescencias constituidas por pequeñas flores de estambres blancos que crecen durante todo el año produciendo frutos globosos de color verde, blanco o negro, dependiendo de su madurez (Cabrera-Cano *et al.*, 1982). De la parte aérea de *C. acuminata* se obtuvieron extractos orgánicos moderadamente antifúngicos y fitotóxicos de los que se aislaron el ácido isopimarico (20), el sandaracopimaradien-19-ol (21), el akhdarenol (22), la  $\alpha$ -amirina (23) y la salvigenina (24) (Anaya *et al.*, 2003).





### 8. Fitopatógeno *Phytophthora capsici*

Durante mucho tiempo, los oomicetos fueron considerados hongos aunque tuvieran ciertas diferencias con el resto del reino Fungi: su pared celular es de celulosa, producen esporas flageladas y no son capaces de producir ergosterol. Investigaciones posteriores demostraron que los oomicetos, están más relacionados con las algas heterocontas (donde encontramos a las algas doradas, pardas y a las diatomeas) que con los hongos (Figura 3). Los hongos y los oomicetos constituyen los principales microorganismos fitopatógenos conocidos y, dentro de los segundos, el género más estudiado es *Phytophthora*, ya que en él se encuentran devastadores patógenos, tanto de cultivos con gran importancia económica, como de árboles de zonas boscosas (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Hausbeck y Lamour, 2004).



**Figura 3.** Árbol filogenético donde se muestra la diferencia evolutiva entre hongos y oomicetos (Latijnhouwers *et al.*, 2003)

El fungoide *Phytophthora capsici* fue descrito por primera vez en 1922 como un patógeno del chile responsable de una enfermedad que asoló varias hectáreas en Nuevo México, EE.UU. en 1988. Desde entonces este hongo ha sido detectado como el responsable de cuantiosas pérdidas económicas al ocasionar enfermedades de cultivos de gran importancia como la calabaza, el tomate y la sandía (Cuadro 2) (Leonian, 1922; Hausbeck y Lamour, 2004).

**Cuadro 2.** Principales cultivos susceptibles a *P. capsici* (Hausbeck y Lamour, 2004).

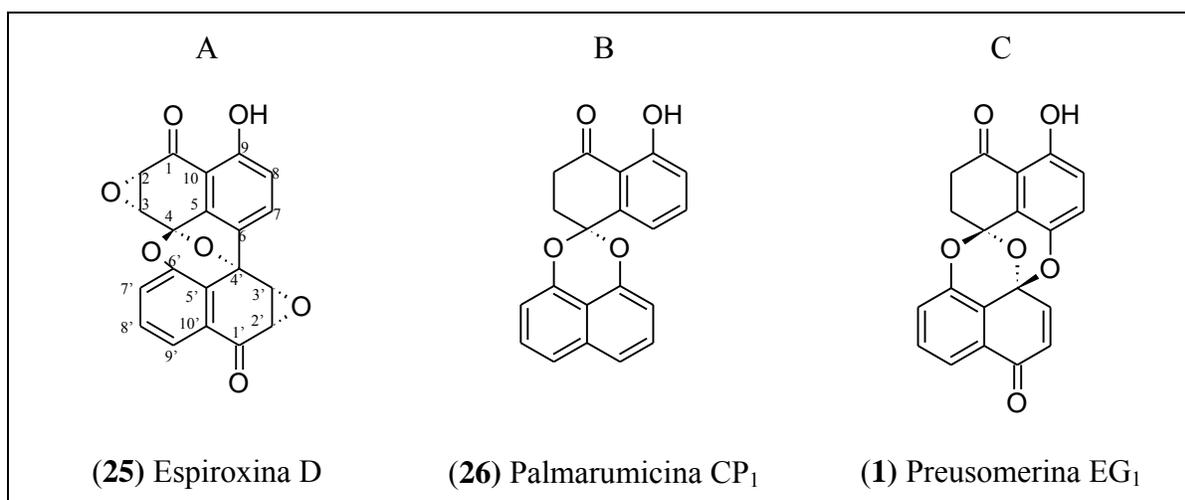
<b>Cucurbitaceas</b>	<b>Solanáceas</b>	<b>Leguminosas</b>
Calabaza	Berenjena	Ejote
Melon	Jitomate	Pallar o Haba de Lima
Sandia	Chile	
Pepino		

## 9. Bisnaftoespirocetales

A finales del siglo pasado se descubrió una nueva familia de metabolitos secundarios constituidos por dos núcleos naftalénicos, generalmente modificados: oxidados y/o saturados, unidos entre sí por puentes de oxígeno, los bisnaftoespirocetales. Estos compuestos se subdividen en tres grandes grupos: las espiroxinas donde el dímero se encuentra unido por dos puentes de oxígeno formando un espirocetal y un enlace carbono carbono, las desoxipreusomerinas o palmarumicinas en las que los anillos de los dos núcleos naftalénicos se encuentran unidos entre sí solo por dos oxígenos formando un espirocetal, y las preusomerinas, donde la unión de ambas subunidades está dada por tres oxígenos que forman dos espirocetales (Figura 4) (Krohn, 2003).

Las preusomerinas y desoxipreusomerinas han sido aisladas de una gran variedad de hongos: acuáticos, coprófilos, saprófitos, asociados a corales, líquenes y plantas. Aunque también existen dos reportes de la presencia de estos compuestos en plantas, cabe la posibilidad de que hayan sido producidos por algún hongo asociado a éstas (Krohn, 2003; Prajoubklang *et al.*, 2005).

En general, las palmarumicinas conservan un anillo naftalénico en forma de naftalendiol mientras que el otro se encuentra como naftoquinona. Esta última puede presentar diversos grados de oxidación en su estructura, siendo lo más común la presencia de grupos epóxido e hidroxilo. La unión de las subunidades se debe a un espiroacetal, formado por los hidroxilos en 6' y 4' de la unidad inferior y el carbonilo en 4 de la superior (Figura 4B).



**Figura 4.** Estructura química general de las espiroxinas (A), palmarumicinas (B) y preusomerinas (C)

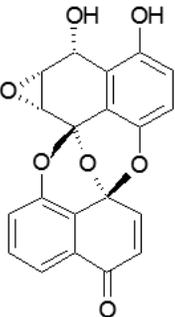
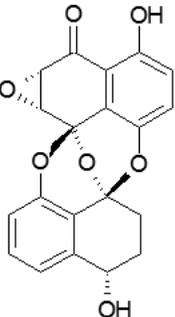
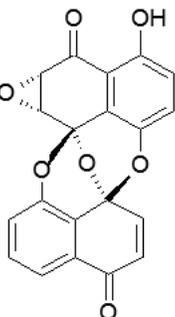
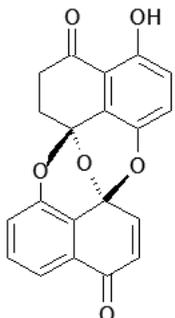
A diferencia de las palmarumicinas, las preusomerinas presentan una diversidad estructural menor, además del tercer puente de oxígeno entre 6 y 4' que forma un segundo espiroacetal (Figura 4C). Adicionalmente, en las preusomerinas el grupo cetona de los carbonos 1 y 1' se encuentra reducido a alcohol y se presentan grupos hidroxilo, metoxilo o epóxido sobre los carbonos 2, 3, 2' y 3'.

La actividad biológica que algunos de estos compuestos demuestran, aunada a su novedosa estructura y a la diversidad de modificaciones posibles a sus núcleos, ha atraído la atención de numerosos investigadores. Tanto las preusomerinas como las desoxipreusomerinas han demostrado actividades antibacterianas, fungitóxicas, antiparasitarias y antitumorales. Además, se ha observado que afectan la actividad de diversas enzimas implicadas en procesos cancerígenos, como la fosfolipasa D, la ADN

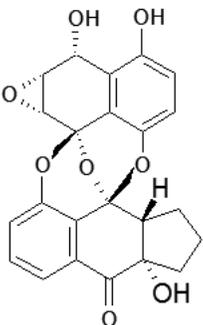
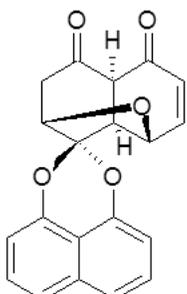
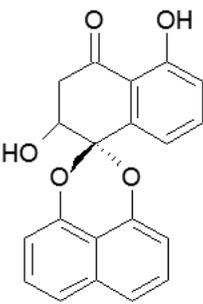
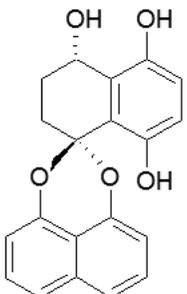
girasa y la farnesil fosfotransferasa de Ras (Krohn, 2003). En el Cuadro 3 se presentan algunos ejemplos de preusomerinas y palmarumicinas, su origen y la actividad biológica demostrada.

En esta época en la que medicinas y agroquímicos de origen sintético han demostrado poca selectividad en sus blancos, alta permanencia en el ambiente y la generación de daños o problemas colaterales, hace que la atención en busca de nuevas sustancias con aplicaciones prácticas se dirija, aun con mayores expectativas que antes, a las fuentes naturales. Bajo este contexto, tomando en cuenta las actividades biológicas presentadas por las preusomerinas y las desoxipreusomerinas y el nicho ecológico en el que se desarrolla *Edenia gomezpompae*, cobra importancia el estudio de la actividad particular de los compuestos que este hongo endófito produce y de su papel ecológico.

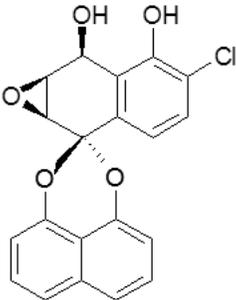
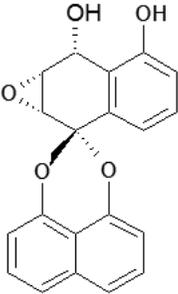
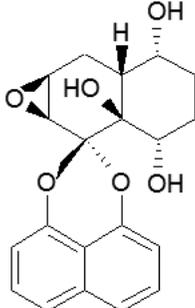
**Cuadro 3.** Algunas preusomerinas y palmarumicinas bioactivas.

Compuesto	Organismo productor	Actividad biológica	Referencias
 <p>Preusomerina D (<b>27</b>)</p>	<p><i>Harmonema dematioides</i></p> <p>Hongo filamentoso Cepa MF5916.</p>	<p>Antibacteriano Antifúngico Inhibidor de FPTasa</p>	<p>Polishook <i>et al.</i>, 1993</p> <p>Singh <i>et al.</i>, 1994</p>
 <p>Preusomerina F (<b>28</b>)</p>	<p><i>Preussia isomera</i> hongo coprófilo</p> <p><i>Microsphaeropsis</i> sp Liquen</p> <p><i>Dirinaria applanata</i></p>	<p>Antibacteriano Antifúngico Antimalárico</p>	<p>Weber y Gloer, 1991</p> <p>Seephonkai <i>et al.</i>, 2002</p>
 <p>Preusomerina G (<b>29</b>)</p>	<p>Hongo filamentoso Cepa MF5916</p> <p>Hongo filamentoso Coelomyceto Tipo <i>Phoma</i> Coprófilo</p> <p><i>Microsphaeropsis</i> sp Liquen</p> <p><i>Dirinaria applanata</i></p>	<p>Antibacteriano Antimalárico Inhibidor de FPTasa</p>	<p>Singh <i>et al.</i>, 1994</p> <p>Vilella <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Seephonkai <i>et al.</i>, 2002</p>
 <p>Preusomerina EG<sub>1</sub> (<b>1</b>)</p>	<p><i>Edenia gomezpompae</i> Endófito de <i>C. acuminata</i></p> <p><i>Edenia</i> sp. Endófito de <i>Petrea volubilis</i></p>	<p>Antifúngico Antileishmania</p>	<p>Macias- Rubalcava <i>et al.</i>, 2008</p> <p>Martínez-Luis <i>et al.</i>, 2008</p>

**Cuadro 3.** Algunas preusomerinas y palmarumicinas bioactivas (continuación).

Compuesto	Organismo productor	Actividad biológica	Referencias
 <p>YMF 1029 E (<b>30</b>)</p>	Hongo acuático no identificado YMF1.01029	Nematicida	Dong <i>et al.</i> , 2008
 <p>Palmarumicina CP<sub>4</sub> (<b>31</b>)</p>	<i>Coniothyrium palmarum.</i>	Antifúngico Antibacterino, Algicida	Krohn <i>et al.</i> , 1994
 <p>Palmarumicina JC2 (<b>32</b>)</p>	<i>Jatropha curcas</i>  Frutos de <i>Diospyros ehretioides</i>	Antibacteriano Antimalárico Antifúngico Citotóxico	Ravindranath <i>et al.</i> , 2004  Prajoubklang <i>et al.</i> , 2005
 <p>Palmarumicina CJ 12 372 (<b>33</b>)</p>	Hongo filamentoso (Cepa N983-46)	Inhibidor de DNA girasa	Sakemi <i>et al.</i> , 1995

**Cuadro 3.** Algunas preusomerinas y palmarumicinas bioactivas (continuación).

Compuesto	Organismo productor	Actividad biológica	Referencias
 <p>Palmarumicina C<sub>11</sub> (<b>34</b>)</p>	<p><i>Microsphaeropsis</i> sp. Liquen <i>Dirinaria aplanata</i></p>	<p>Antituberculoso Antimalarico</p>	<p>Seephonkai <i>et al.</i>, 2002</p>
 <p>Palmarumicina Sch 53825 (<b>35</b>)</p>	<p>Cepa MF5916. Hongo filamentoso Coelomycete</p> <p><i>Microsphaeropsis</i> sp. Liquen <i>Dirinaria aplanata</i></p>	<p>Inhibidores de fosfolipasa C</p> <p>Inhibidores de Ras FPTasa Antituberculoso Antimalarico</p>	<p>Chu <i>et al.</i>, 1996</p> <p>Singh <i>et al.</i>, 1994</p> <p>Vilella <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Seephonkai <i>et al.</i>, 2002</p>
 <p>Deoxipreusomerina A (<b>36</b>)</p>	<p>Hongo filamentoso <i>Sphaeropsidales</i> sp. (Cepa F-249707)</p>	<p>Antibacteriano Alguicida</p>	<p>Bode <i>et al.</i>, 2000</p>
<p>Cladospirona D (<b>37</b>)</p>			



#### IV. HIPÓTESIS

Considerando que los bisnaftoespirocetales constituyen los metabolitos secundarios mayoritarios de *Edenia gomezpompae*, con actividades biológicas demostradas incluyendo propiedades antifúngicas, y tomando en cuenta que la interacción antagónica entre hongos puede ser mediada por efectos alelopáticos, se planteó la siguiente hipótesis:

Las preusomerinas y palmarumicinas producidas por *E. gomezpompae* podrían estar involucradas en la interacción antagónica entre este endófito y el fungoide fitopatógeno *Phytophthora capsici* y con el endófito generalista aislado de la misma planta hospedera, *Guignardia mangiferae*, así como en la respuesta química de estos microorganismos.



## V. OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Comprobar la relevancia de los bisnaftoespirocetales producidos por el hongo endófito *Edenia gomezpompae* en la interacción antagónica con *Phytophthora capsici* y *Guignardia mangiferae*, así como en los perfiles metabólicos de estos microorganismos, mediante bioensayos de antagonismo directo y la evaluación de la actividad biológica de los extractos orgánicos de *E. gomezpompae* y metabolitos puros del mismo, con el fin de contribuir al conocimiento de las relaciones químicas involucradas en las interacciones endófito endófito y endófito fitopatógeno.

### 2. Objetivos particulares

Para cumplir con el objetivo primordial planteado, se formularon los siguientes objetivos particulares:

- a. Observar los efectos macroscópicos y microscópicos de la interacción entre las colonias de *E. gomezpompae*, *G. mangiferae* y *P. capsici*, mediante bioensayos de antagonismo directo entre estos microorganismos.
- b. Determinar el efecto de los extractos orgánicos de cultivos del endófito *E. gomezpompae* en medio sólido, sobre el crecimiento de éste hongo y el de *G. mangiferae*, *P. capsici* mediante bioensayos de dilución en agar.
- c. Determinar las condiciones óptimas de separación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos obtenidos a partir de cultivos en caja de Petri de *E. gomezpompae*, *G. mangiferae* y *P. capsici* utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y obtener los perfiles cromatográficos e identificar en los cromatogramas obtenidos de los extractos del endófito *E. gomezpompae* la presencia de sus principales compuestos bisnaftoespirocétalicos característicos.
- d. Obtener extractos orgánicos de cada microorganismo a partir de los bioensayos de antagonismo directo y de los bioensayos por dilución en agar y analizar

cromatográficamente los perfiles metabólicos de los extractos obtenidos, con el fin de correlacionar los resultados con las observaciones en los bioensayos de antagonismo.

- e. Evaluar el potencial antifúngico de las preusomerinas EG<sub>1</sub> y EG<sub>4</sub> por medio de bioensayos por dilución en agar sobre *G. mangiferae* y *P. capsici*.
- f. Obtener los extractos orgánicos de *G. mangiferae* y *P. capsici* de los bioensayos de potencial antifúngico de los compuestos puros y analizar sus perfiles mediante CLAR, para contrastar con los resultados obtenidos de los bioensayos de antagonismo y actividad antifúngica a nivel de extracto.

## VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. Material Fúngico

- *Edenia gomezpomape*

El hongo endófito *Edenia gomezpomape* fue aislado en el Laboratorio de Alelopatía, Instituto de Ecología, UNAM, en 2002 a partir de hojas sanas de *Callicarpa acuminata* Humb *et al.* (Verbenaceae) colectadas en la reserva ecológica „El Edén’ en Quintana Roo. La identidad de este microorganismo fue establecida por métodos moleculares (González *et al.*, 2007).

*E. gomezpomape* fue liofilizado y conservado en nitrógeno líquido. Muestras de referencia fueron depositadas en el Herbario Nacional (MEXU; clave 25346) del Instituto de Biología, UNAM y en el Herbario de Micología J. H. Millar (GAM; clave 16175) de la Universidad de Georgia, E.U.

- *Guignardia mangiferae*

El hongo endófito *Guignardia mangiferae* fue aislado en el Laboratorio de Alelopatía, Instituto de Ecología, UNAM, en 2004 a partir de hojas sanas de *C. acuminata*, provenientes de la reserva ecológica “El Edén”.

- *Phytophthora capsici*

El fungoide fitopatógeno (Oomycota) *Phytophthora capsici* fue donado por la Dra. Olga Gómez, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

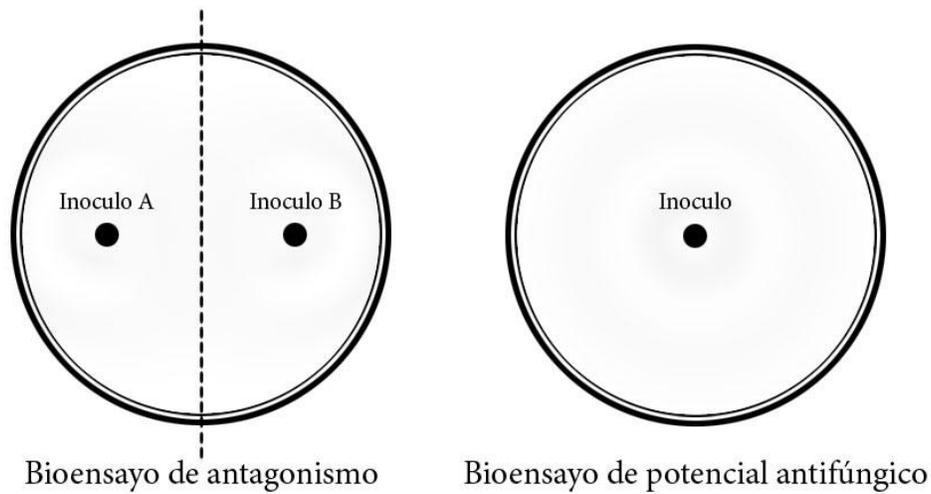
### 2. Medio de cultivo

El crecimiento en medio sólido de los tres microorganismos de estudio se realizó en agar papa dextrosa (APD) preparado a partir de papas frescas y se obtuvo de la siguiente manera. Para cada litro de APD se hirvieron durante 20 minutos 200 g de papa fresca previamente pelada y cortada en dados, posteriormente, la infusión de papa se pasó a través de un colador fino y se le agregaron 20 g de dextrosa, 20 g de agar y agua destilada hasta un volumen final de 1L. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

### 3. Bioensayos

- Bioensayos de antagonismo directo

Los bioensayos de antagonismo directo se realizaron entre los hongos endófitos *E. gomezpomae* y *G. mangiferae* y entre el endófito *E. gomezpomae* y el fungoide fitopatógeno *P. capsici*. Los microorganismos se inocularon de acuerdo a sus velocidades de crecimiento en cajas de Petri estériles de 25 cm, que contenían 80 mL de APD, de la siguiente manera: 1) *E. gomezpomae* y *G. mangiferae* son microorganismos de crecimiento lento y se sembraron al mismo tiempo; 2) en los bioensayos entre *E. gomezpomae* y *P. capsici* se inoculó primero *E. gomezpomae* y 14 días después se sembró *P. capsici* ya que este es un microorganismo de crecimiento rápido. Cada microorganismo competidor se sembró utilizando inóculos de 5 mm de diámetro, de micelio previamente incubado en APD. Los inóculos se colocaron equidistantes ocupando cada uno un extremo de la caja de Petri como se muestra en la Figura 5. Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad naturales (12:12 hrs). Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con diez repeticiones. Todo el procedimiento experimental se efectuó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar.



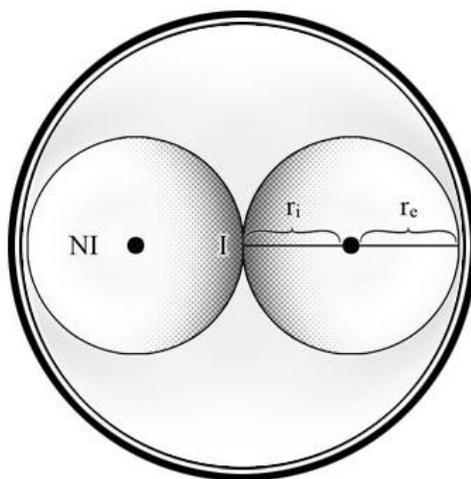
**Figura 5.** Disposición de los inóculos en los bioensayos de antagonismo y de potencial antifúngico.

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica y microscópica entre los microorganismos competidores se registró e interpretó después de 20 días para *E.*

*gomezpompae* y *G. mangiferae* y después de 8 días para *E. gomezpompae* y *P. capsici*. Los resultados de crecimiento se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento de los diferentes competidores, comparando el crecimiento de los microorganismos con respecto a los controles de crecimiento que se desarrollaron paralelamente, de acuerdo con la Ecuación 1 (Figura 6) (Saucedo-García, 2006).

$$inh \% = \left( \frac{r_i}{r_e} \right) 100$$

**Ecuación 1.** Determinación del porcentaje de inhibición en los bioensayos de antagonismo. Donde inh% = porcentaje de inhibición;  $r_i$  = radio interno;  $r_e$  = radio externo.



**Figura 6.** Zonas recortadas para la obtención de extractos orgánicos y radios en los bioensayos de antagonismo. NI: zona de no interacción; I: zona de interacción (área sombreada);  $r_i$ : radio interno;  $r_e$ : radio externo.

- Análisis microscópicos de las hifas en la zona de interacción antagónica

La posible interacción directa de los hongos endófitos *E. gomezpompae* y *G. mangiferae* y entre el endófito *E. gomezpompae* y el fungoide fitopatógeno *P. capsici* en los bioensayos de antagonismo, se determinó mediante un análisis microscópico de los micelios en la interfase de interacción (zona I) (Figura 6). Las preparaciones se obtuvieron tomando pequeñas muestras de los micelios y extendiéndolas con ayuda de agujas de

disección y de un microscopio estereoscópico dentro de una gota de rojo congo sobre un portaobjetos. Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico (Zeiss Axioskop 40) a 100x, se registraron las medidas del grosor de las hifas y diámetro de las vacuolas utilizando el programa AxioVision (v 4.6.3.0) y se compararon con las obtenidas en las zonas de no interacción (NI) de las mismas cajas (micelio puro).

- Determinación del potencial antifúngico

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de los extractos orgánicos de *E. gomezpompae* y de las preusomerinas EG<sub>1</sub> y EG<sub>4</sub> puras, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de *E. gomezpompae*, *G. mangiferae* y *P. capsici* utilizando el método de dilución en agar.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en acetona o en metanol (~100-500 µL) y se prepararon disoluciones en APD (1%) de 125, 250 y 500 µg/mL para los extractos orgánicos y de 100 µg/mL para las preusomerinas puras. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño al azar con diez repeticiones. Las cajas se incubaron de 15 a 20 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad (12:12 h) con luz fluorescente. Como controles negativos se utilizaron APD (1%) y APD 1%/acetona o metanol (~100-500 µL). Como control positivo se utilizó el fungicida comercial **Prozycar® 50 P.H (Carbendazim: Metilbencimidazol-2-il carbamato)** (200 µg/mL). Al final del bioensayo se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio de *E. gomezpompae* y *P. capsici* de cada repetición y se tomó el promedio de estas para el análisis estadístico. El efecto sobre *G. mangiferae* se estableció mediante la determinación de su área de crecimiento, utilizando un escáner HP PSC500 para obtener las imágenes correspondientes y los programas Adobe Photoshop CS3 para la edición de las imágenes (desaturación y aumento de contraste por ajuste de niveles) e ImageJ (v.1.4.3.67) para la medición de las áreas (analizar partículas). 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 STATISTICA versión 6.0) (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

#### **4. Perfiles cromatográficos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de los extractos orgánicos en la interacción antagónica**

- Obtención de los extractos orgánicos

Para obtener los extractos orgánicos de las interacciones antagónicas observadas en los bioensayos de antagonismo directo, se utilizaron 10 cajas de Petri. Cada zona de los micelios crecidos en condiciones de antagonismo (controles, NI e I) (Figura 6), se cortó con espátula en pequeños segmentos y se maceraron exhaustivamente utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente de extracción. Los extractos orgánicos resultantes se concentraron al vacío por medio de un rotaevaporador (Buchi, modelo R-215).

Posteriormente, el material macerado se secó en la estufa a  $40^\circ\text{C}$  y se determinó el rendimiento de los extractos obtenidos con base en el peso seco de cada zona, expresándose en mg de extracto por g de bioensayo.

Finalmente, los extractos obtenidos se analizaron por CLAR en un equipo Waters con modulo de separación Alliance e2695 y detector de fotodiodos Waters 2996.

- Optimización de los métodos de separación

La optimización de los métodos de separación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de *E. goezpompae*, *G. mangiferae* y *P. capsici* en condiciones de antagonismo se realizó con los extractos orgánicos obtenidos a partir de los controles de crecimiento de cada microorganismo competidor. Se utilizó una columna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (Atlantis) con un tamaño de partícula de  $5\mu\text{m}$ , longitud de 150 mm y diámetro interno de 4.6 mm a una temperatura de análisis de  $30^\circ\text{C}$  y como fase móvil agua y acetonitrilo en diferentes gradientes de concentración y de flujo. Las condiciones de separación utilizadas para cada uno de los extractos analizados se presentan en el Cuadro 4.

- Análisis de los perfiles metabólicos

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de separación de los metabolitos secundarios producidos por los diferentes microorganismos, se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos obtenidos, tanto de los bioensayos de antagonismo como de los de potencial antifúngico y se compararon con los perfiles de los extractos de los controles de crecimiento y del APD que se desarrollaron paralelamente. Por

otra parte, con la finalidad identificar en los cromatogramas obtenidos a los bisnaftoespirocetales producidos por el hongo endófito *E. gomezpompae* para poder establecer su posible papel de en la interacción antagónica con *G. mangiferae* y *Phytophthora capsici*, se analizaron individualmente por CLAR las preusomerinas EG<sub>1</sub>, EG<sub>2</sub>, EG<sub>3</sub> y EG<sub>4</sub> y las palmarumicinas CP<sub>2</sub>, CP<sub>17</sub> y CP<sub>18</sub>. Los cromatogramas obtenidos se integraron y se comparó el área bajo la curva de cada pico para cada extracto. La captura y análisis de la información se llevó a cabo con el programa Empower 2.

**Cuadro 4.** Gradientes de flujo y sistemas de elución utilizados para la separación óptima de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de *E. gomezpompae*, *G. mangiferae* y *P. capsici*.

Microorganismo	Condiciones de elución	
<i>E. gomezpompae</i>	Gradiente	
	Condiciones iniciales:	flujo: 0.6 mL/min Proporción de disolventes: 80 % H <sub>2</sub> O 20 % MeCN
	Condiciones finales: (30 min)	flujo: 1.0 mL/min Proporción de disolventes: 100 % MeCN
Tiempo de corrida: 40 min		
<i>G. mangiferae</i>	Gradiente	
	Condiciones iniciales	flujo: 0.6 mL/min Proporción de disolventes: 100 % H <sub>2</sub> O
	Condiciones a los 3 min	flujo: 0.65 mL/min Proporción de disolventes: 90 % H <sub>2</sub> O 10 % MeCN
Condiciones a los 55 min	flujo: 0.85 mL/min Proporción disolventes: 60 % H <sub>2</sub> O 40 % MeCN	

**Cuadro 4.** Gradientes de flujo y sistemas de elución utilizados para la separación óptima de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de *E. gomezpompae*, *G. mangiferae* y *P. capsici* (continuación).

Microorganismo	Condiciones de elución	
<i>G. mangiferae</i>	Gradiente (continuación)	
	Condiciones a los 85 min	flujo: 0.95 mL/min Proporción de disolventes: 25 % H <sub>2</sub> O 75 % MeCN
	Condiciones finales: (95 min)	flujo: 1.0 mL/min Proporción de disolventes: 100% MeCN
Tiempo de corrida: 120 min		
<i>P. capsici</i>	Gradiente	
	Condiciones iniciales	flujo: 0.6 mL/min Proporción de disolventes: 95 % H <sub>2</sub> O 5% MeCN
	Condiciones a los 25 min	flujo: 1.0 mL/min Proporción de disolventes: 70 % H <sub>2</sub> O 30 % MeCN
Condiciones finales: (60 min)	flujo: 1.0 mL/min Proporción de disolventes: 100 % MeCN	
Tiempo de corrida: 90 min		



## VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de establecer la importancia de los bisnaftoespirocetales producidos por el hongo endófito *Edenia gomezpompae* en la interacción antagonica con *Phytophthora capsici* y *Guignardia mangiferae*, así como en la producción de los metabolitos secundarios de estos microorganismos, a través de bioensayos de antagonismo directo y de la evaluación de la actividad biológica de los extractos orgánicos de *E. gomezpompae* y de sus compuestos puros, con el fin de contribuir al conocimiento de los aspectos químicos involucrados en las complejas relaciones que se establecen entre endófitos y entre endófitos y fitopatógenos. Los resultados obtenidos se dividen en tres partes. La primera corresponde a la realización de bioensayos de antagonismo directo y determinación de la actividad antifúngica del extracto de *E. gomezpompae*. La segunda se refiere a la obtención y análisis comparativo de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos obtenidos en condiciones de antagonismo directo, utilizando CLAR. Por último, la tercera se enfoca a la evaluación biológica de las preusomerinas EG<sub>1</sub> y EG<sub>4</sub>.

### 1. Bioensayos de antagonismo directo y potencial antifúngico

- Bioensayo de antagonismo directo

Los bioensayos de antagonismo directo se realizaron entre el hongo endófito *E. gomezpompae* aislado de *C. acuminata* y el endófito generalista *G. mangiferae* aislado de la misma planta hospedera y entre *E. gomezpompae* y el fungoide fitopatógeno *P. capsici*. En el Cuadro 5 se presentan las características macroscópicas en cultivos en APD de cada uno de los microorganismos en estudio.

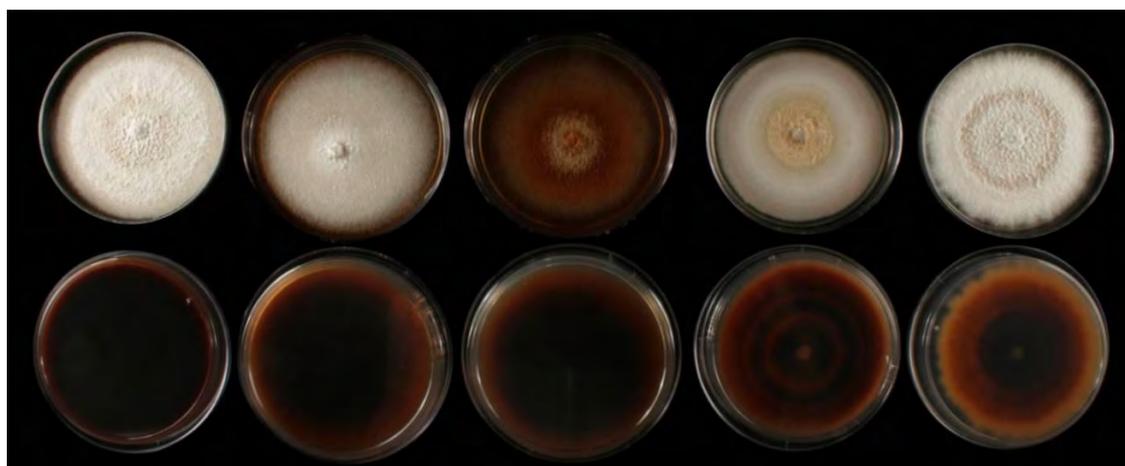
Las características morfológicas de los microorganismos pueden verse afectadas durante las interacciones interespecíficas (Dix y Webster, 1995). Estas variaciones son parte de la plasticidad fenotípica que permiten a un organismo adaptarse a los cambios en el ambiente. En el caso particular de *E. gomezpompae*, podemos observar una alta sensibilidad en su plasticidad fenotípica ya que las ligeras variaciones en el medio APD natural o del área de la colonia de donde se toma el inóculo, pueden producir diversas variantes fenotípicas de este endófito que no solo se limitan a las características

morfológicas, si no que afectan también su composición química como se discutirá más adelante. En la Figura 7 se presenta una imagen con algunas variantes de *E. gomezpompae*.

**Cuadro 5.** Características macroscópicas en cultivos sobre agar papa dextrosa (APD) de *E. gomezpompae*, *G. mangiferae* y *P. capsici*.

Microorganismo	Características macroscópicas en cultivos en APD
<i>Edenia gomezpompae</i> <sup>a</sup>	Hongo blanquecino al inicio de su crecimiento, después se torna ligeramente rosado. La parte inferior muestra una coloración café rojiza. Su micelio es aterciopelado y flocoso y sus hifas son hialinas, septadas, de pared delgada y lisas u onduladas, tienden a formar cordones y ovillos.
<i>Guignardia mangiferae</i> <sup>a</sup>	Tiene una coloración verde oscura y en la periferia muestra zonas ligeramente translúcidas. Produce micelio aéreo e inmerso, su superficie es rugosa y con apariencia polvosa, de consistencia dura y su crecimiento es abundante y lobulado.
<i>Phytophthora capsici</i> <sup>b</sup>	<i>P. capsici</i> es un fungoide translúcido y blanquecino, presenta un micelio abundante, algodonoso y húmedo.

<sup>a</sup> cultivo de 10 días; <sup>b</sup> cultivo de 4 días.

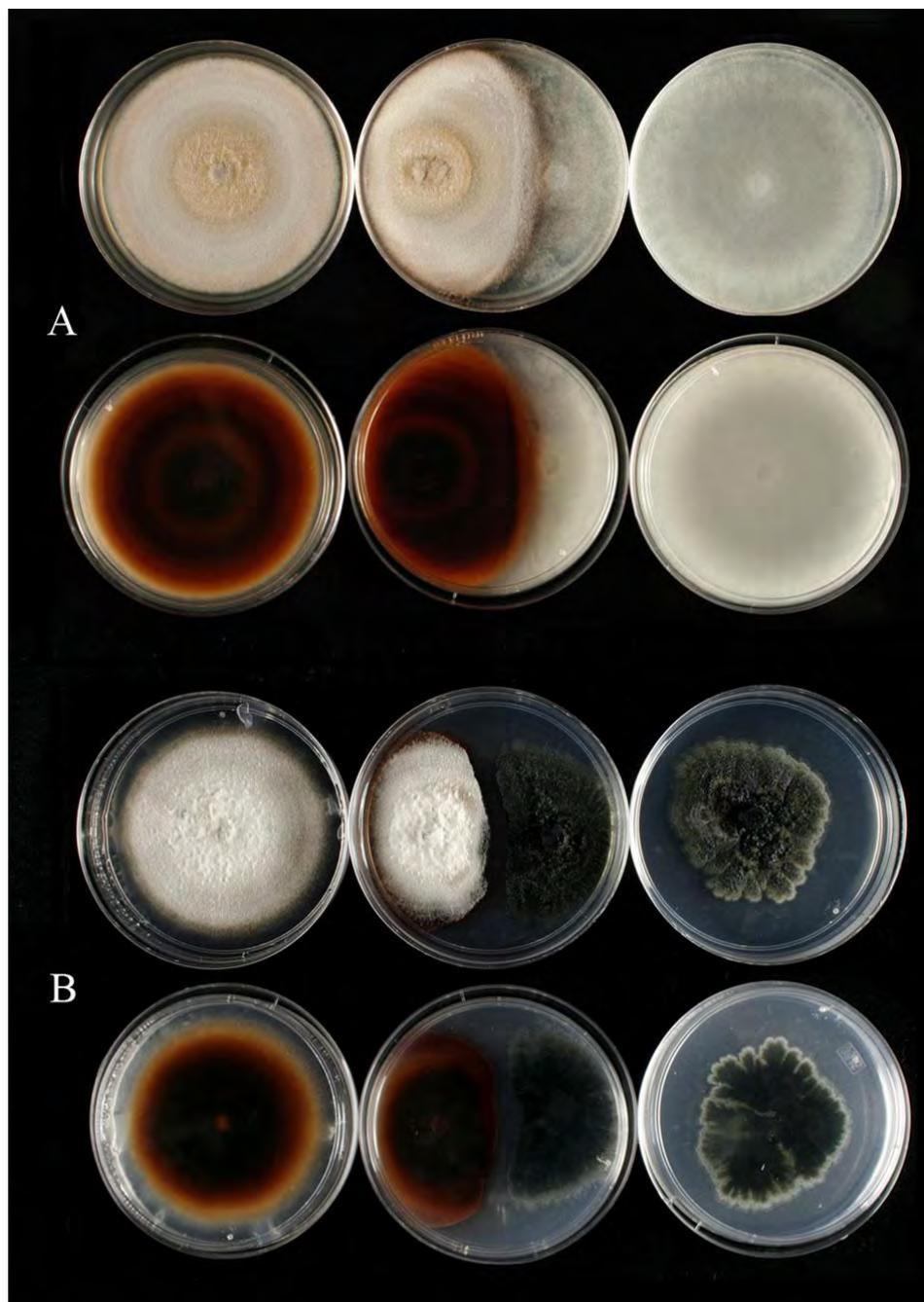


**Figura 7.** Variantes morfológicas de *E. gomezpompae* en cultivos en APD. Las cajas de Petri en la parte superior de la imagen muestran la vista superior de los micelios. Las imágenes de abajo de la fotografía muestran vista inferior de los cultivos.

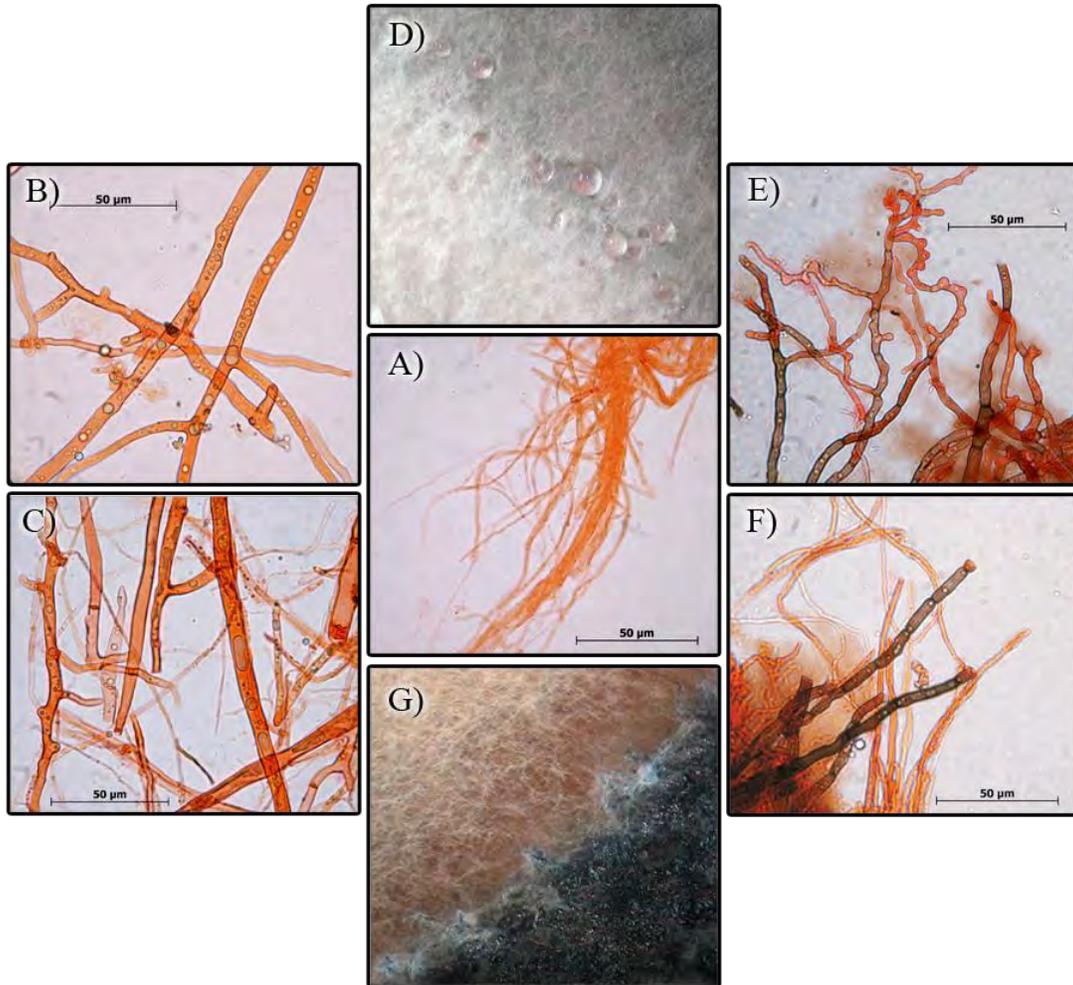
Una vez hechas estas consideraciones, a continuación se describen en detalle los resultados de los bioensayos de antagonismo directo entre el hongo endófito *E. gomezpompae* y sus competidores *G. mangiferae* y *P. capsici*.

En Figura 8 se muestran las fotografías de los bioensayos de antagonismo entre los microorganismos competidores. En A se observa el antagonismo entre *E. gomezpompae* y *P. capsici* a los 8 días de interacción, apreciándose una inhibición significativa en el crecimiento de *P. capsici* (65.2%) mientras que *E. gomezpompae* no es inhibido significativamente por la presencia de su competidor. En la zona de interacción las colonias se tocan y el micelio de los dos microorganismos crece entremezclado. También se observó que *E. gomezpompae* produce pequeñas gotas de exudado en la zona de interacción antagónica (Figura 9 D), además de la formación de un halo con mayor coloración, detectable por la vista inferior de las cajas de Petri (Figura 8 A). Estas observaciones en conjunto, indican que el endófito *E. gomezpompae* involucra diferentes estrategias de defensa frente a su competidor (interacciones directas e indirectas). Por su parte, el micelio de *P. capsici* no presenta cambios macroscópicos importantes, únicamente se observa una apariencia ligeramente más “húmeda” de su micelio aéreo.

Con la finalidad de establecer si el potencial antagónico demostrado por el hongo endófito *E. gomezpompae* en la interacción antagónica con *P. capsici*, es mediado por mecanismos de interacción competitiva directa (interferencia hifal o de contacto de micelio), se realizó un análisis microscópico de los micelios en las zonas donde estos hacían contacto (Figura 9 A, B, C y D). Este análisis permitió establecer que no existe antagonismo directo por interferencia hifal. Si bien, el micelio de estos microorganismos se entremezcla y crece en contacto, no fue evidente un cambio en la morfología de las hifas ni en la opacidad de las células. En la mayoría de las observaciones, el grosor de las hifas de *P. capsici* se mantuvo dentro del intervalo de tamaño observado en la zona de no interacción (NI, ver Figura 6 en procedimiento experimental). Por otra parte, tampoco se observó un cambio importante en el número o tamaño de las vacuolas y no se detectó ningún comportamiento de micoparasitismo. En el Cuadro 5 se muestran los intervalos de grosor de hifas y las dimensiones de las vacuolas registrados en las preparaciones microscópicas.



**Figura 8.** Bioensayos de antagonismo directo. **A.** Interacción antagónica entre *E. gomezpompae* y *P. capsici*; de izquierda a derecha: control de *E. gomezpompae*, microorganismos en antagonismo y control de *P. capsici*; arriba: bioensayo vista superior; abajo: vista inferior de las cajas de Petri. **B.** Interacción antagónica entre *E. gomezpompae* y *G. mangiferae*; de izquierda a derecha: control de *E. gomezpompae*, microorganismos en antagonismo y control de *G. mangiferae*; arriba: bioensayo vista superior; abajo: vista inferior de las cajas de Petri.



**Figura 9.** Microorganismos en interacción antagónica. **A.** Micelio de *E. gomezpompae* (100 X). **B.** Micelio de *P. capsici* (100x). **C.** Interacción entre *E. gomezpompae* y *P. capsici* (100 X). **D.** Fotografía de la zona de interacción entre *E. gomezpompae* y *P. capsici*. **E.** Micelio de *G. mangiferae* (100x). **F.** Interacción *E. gomezpompae* y *G. mangiferae* (100 X). **G.** Fotografía de la zona de interacción entre *E. gomezpompae* y *G. mangiferae*.

Aunque en la relación antagónica que se establece entre el hongo endófito *E. gomezpompae* y el fungoide fitopatógeno *P. capsici* se produce el contacto entre los micelios de ambos, no se observaron cambios físicos importantes en la estructura de éstos. Además, *E. gomezpompae* respondió a la cercanía de su competidor, produciendo barreras de metabolitos secundarios en la zona de interacción (halo con mayor coloración observable en la vista posterior de las cajas de Petri). Lo anterior indica que la inhibición del crecimiento de *P. capsici* es causada principalmente por los metabolitos secundarios de

*E. gomezpompae* que son difundidos en el sustrato (medio de cultivo) afectando su crecimiento, infiriéndose así que los mecanismos de competencia imperantes en esta relación antagónica son indirectos y dependientes de la producción de metabolitos secundarios bioactivos.

**Cuadro 6.** Intervalos de grosor de hifa y dimensiones de las vacuolas en el bioensayo de antagonismo entre *E. gomezpompae* y *P. capsici*.

	Control		Antagonismo	
	<i>E. gomezpompae</i>	<i>E. gomezpompae</i>	<i>P. capsici</i>	<i>P. capsici</i>
Grueso de hifa menor	0.53 $\mu\text{m}$	0.97 $\mu\text{m}$	4.76 $\mu\text{m}$	2.65 $\mu\text{m}$
Grueso de hifa mayor	2.63 $\mu\text{m}$	2.26 $\mu\text{m}$	8.22 $\mu\text{m}$	6.83 $\mu\text{m}$
Intervalo más frecuente	1.0 - 1.7 $\mu\text{m}$	1 - 2 $\mu\text{m}$	5 - 6.5 $\mu\text{m}$	4.5 - 7 $\mu\text{m}$
Tamaño de vacuola mayor	ND	ND	1.1 $\mu\text{m}$	0.5 $\mu\text{m}$
Tamaño de vacuola menor	ND	ND	15.4 $\mu\text{m}$	10.5 $\mu\text{m}$
Intervalo más frecuente	ND	ND	2 - 4 $\mu\text{m}$	2 - 4 $\mu\text{m}$

ND: no determinado porque el grosor de la hifa es tan pequeño que imposibilita la observación de las vacuolas.

Por otra parte, en la Figura 8 B se presenta el bioensayo de antagonismo entre los hongos endófitos *E. gomezpompae* y *G. mangiferae* a los 20 días de cultivo, observándose una evidente interacción coantagónica a distancia. El crecimiento de *E. gomezpompae* es inhibido en un 25.4 % por la presencia de *G. mangiferae*. En contraste, *E. gomezpompae* inhibe el crecimiento de *G. mangiferae* en un 49.6 %. De nueva cuenta se observa que *E. gomezpompae* responde a la presencia de su competidor produciendo halos con mayor coloración en la zona I, sin embargo, no son tan evidentes como en la interacción con *P. capsici*, además a diferencia de este último, no se observó producción de exudados. Por su

parte, *G. mangiferae* presenta un micelio ligeramente más oscuro y la superficie de las colonias es más plana con respecto a los controles de crecimiento.

Cabe mencionar que en algunas cajas de Petri, se observó que en los extremos de la zona de interacción, los micelios de los dos endófitos crecen en contacto y después de 25 días, *E. gomezpompae* comienza a desarrollarse sobre *G. mangiferae*. También se observó en algunas cajas de Petri que el micelio de *E. gomezpompae* mostraba una coloración amarillenta en la parte inferior, sin embargo, no se presentaron otras diferencias morfológicas observables ni se modificó la interacción coantagónica entre *E. gomezpompae* y *G. mangiferae*. Debido a este cambio fenotípico notorio, al realizarse las extracciones orgánicas de los micelios en condiciones de antagonismo y posterior estudio de su perfil cromatográfico (CLAR) se decidió trabajar por separado las cajas que presentaron las características mencionadas asignándole al extracto correspondiente la clave *E. amarilla*.

**Cuadro 7.** Intervalos de grosor de las hifas y dimensiones de las vacuolas en el bioensayo de antagonismo entre *E. gomezpompae* y *G. mangiferae*.

	Control	Antagonismo		Control
	<i>E. gomezpompae</i>	<i>E. gomezpompae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>G. mangiferae</i>
Grueso de hifa menor	0.53 $\mu\text{m}$	1.16 $\mu\text{m}$	3.46 $\mu\text{m}$	1.82 $\mu\text{m}$
Grueso de hifa mayor	2.63 $\mu\text{m}$	2.66 $\mu\text{m}$	7.25 $\mu\text{m}$	6.27 $\mu\text{m}$
Intervalo más frecuente	1.0 - 1.7 $\mu\text{m}$	1.3 - 1.7 $\mu\text{m}$	3.5 - 5 $\mu\text{m}$	3 - 5 $\mu\text{m}$
Tamaño de vacuola mayor	ND	ND	1 $\mu\text{m}$	0.8 $\mu\text{m}$
Tamaño de vacuola menor	ND	ND	4.29 $\mu\text{m}$	3.7 $\mu\text{m}$
Intervalo más frecuente	ND	ND	1.5 - 2.5 $\mu\text{m}$	1.5 - 2.5 $\mu\text{m}$

ND: no determinado porque el grosor de la hifa es tan pequeño que imposibilita la observación de las vacuolas.

En las Figuras 9 A, E y F se presentan las imágenes de la interacción microscópica en las cajas en las que los micelios crecieron en contacto. Al igual que en el bioensayo de antagonismo entre *E. gomezpompae* y *P. capsici*, no se observó interacción entre las hifas a nivel microscópico. Las hifas de los dos competidores mantienen sus características morfológicas y no se encontraron indicios de micoparasitismo entre ellas. Tampoco se observan cambios relevantes en las dimensiones de las vacuolas con respecto a los controles de crecimiento (Cuadro 6).

Los hongos endófitos *E. gomezpompae* y *G. mangiferae* establecen una interacción coantagónica mediada por mecanismos indirectos a través de la producción de metabolitos que se difunden en el medio de cultivo y afectan el crecimiento de su competidor.

- Rendimiento de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los bioensayos de antagonismo

Con la finalidad de obtener evidencia adicional de que la interacción antagónica entre el hongo endófito *E. gomezpompae* y sus competidores *G. mangiferae* y *P. capsici*, es mediada por mecanismos indirectos (producción de metabolitos primarios, secundarios y enzimas que difunden en el medio), se determinó el rendimiento de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los bioensayos de antagonismo. En el Cuadro 8 se presentan los rendimientos expresados en miligramos de extracto por gramo de bioensayo seco (APD más micelio), observándose diferencias considerables en función de la zona analizada: control de crecimiento de los competidores, zona de no interacción (NI) y zona de interacción antagónica (I).

Estos resultados confirman que los microorganismos en condiciones de antagonismo son capaces de modificar su metabolismo secundario, lo que nos muestra diferentes maneras en la que son afectados por la presencia de un competidor y de la forma en que activan sus mecanismos de defensa.

Los extractos de *P. capsici* obtenidos en la zona NI presentan un rendimiento menor con respecto al obtenido para los controles de crecimiento, mientras que los extractos en la zona I muestran un rendimiento aun más reducido. Sin embargo, hay que considerar que

este extracto proviene de micelio entremezclado de *P. capsici* y *E. gomezpompae*. Por su parte, los extractos de *E. gomezpompae* no muestran cambios significativos respecto a su control.

**Cuadro 8.** Rendimiento de los extractos orgánicos.

**Antagonismo entre *E. gomezpompae* y *P. capsici***

Origen del extracto	Clave del extracto	Rendimiento (mg/g seco de bioensayo)
<b>Control de <i>E. gomezpompae</i></b>	<b>E. gmz P</b>	<b>5.46</b>
Zona NI de <i>E. gomezpompae</i>	E. gmz NI P	5.07
<b>Control de <i>P. capsici</i></b>	<b>P. cap</b>	<b>21.15</b>
Zona NI de <i>P. capsici</i>	P. cap NI	14.54
Zona I entre <i>E. gomezpompae</i> y <i>P. capsici</i>	E. y P. I	12.90

**Antagonismo entre *E. gomezpompae* y *G. mangiferae***

Origen del extracto	Clave del extracto	Rendimiento (mg/g)
<b>Control de <i>E. gomezpompae</i></b>	<b>E. gmz G</b>	<b>6.67</b>
Zona NI de <i>E. gomezpompae</i>	E. gmz NI G	12.67
Zona I de <i>E. gomezpompae</i>	E. gmz I G	7.25
Zona NI de <i>E. amarilla</i>	E. am NI G	11.63
Zona I de <i>E. amarilla</i>	E. am I G	4.00
<b>Control de <i>G. mangiferae</i></b>	<b>G. mang E</b>	<b>19.20</b>
Zona NI de <i>G. mangiferae</i>	G. mang NI E	11.07
Zona I de <i>G. mangiferae</i>	G. mang I E	15.25
Zona NI de <i>G. mangiferae</i>	G. mang NI E. am	10.86
Zona I de <i>G. mangiferae</i>	G. mang I E. am	17.00

NI, zona de no interacción. I, zona de interacción antagónica.

En el caso del antagonismo entre *G. mangiferae* y *E. gomezpompae*, así como en el antagonismo con su variante fenotípica amarilla (*E. amarilla*) también se observa una

disminución en la producción de los extractos, en comparación con su control de crecimiento. Sin embargo, el rendimiento en la zona I es mayor que en la zona NI, indicando que la producción de metabolitos secundarios es estimulada por la presencia de su competidor. Si bien la presencia de los metabolitos secundarios producidos por *E. gomezpompae* provoca una disminución general en el metabolismo secundario de *G. mangiferae*, al mismo tiempo lo estimula en la zona de interacción antagónica.

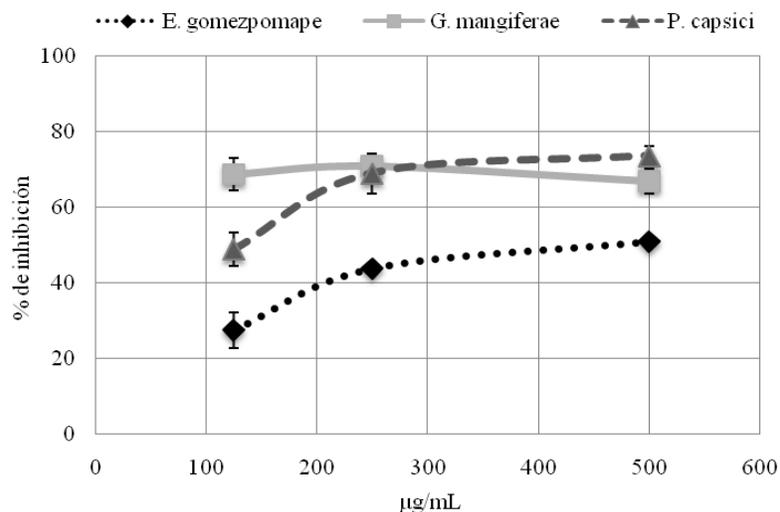
Con respecto al rendimiento de los extractos de *E. gomezpompae*, al enfrentarse a *G. mangiferae* se observa un incremento en su metabolismo secundario y en este caso hay una mayor concentración en la zona NI respecto a I. Estas observaciones sugieren que su comportamiento es opuesto al del endófito generalista *G. mangiferae*. Sin embargo, hay que considerar que cuando un microorganismo detecta la cercanía de otro, puede desviar los recursos invertidos en su crecimiento a la producción de metabolitos secundarios u otros factores de interacción indirecta, posteriormente el hongo puede volver a expandir su micelio y de esta manera se generan en el medio de cultivo zonas con mayor concentración de metabolitos secundarios (barreras químicas). Este tipo de comportamiento es común en los hongos y no solo se presenta en las interacciones interespecíficas. La formación de patrones durante el crecimiento de los hongos es un aspecto de la expresión fenotípica regulada por múltiples factores y que no solo se pueden expresar en concentración de metabolitos secundarios si no que también puede implicar zonas de mayor densidad de biomasa o diversas modificaciones morfológicas (Klein, 1996; Davidson *et al.*, 1996). Estas observaciones son claramente aplicables al momento de cortar las zonas de no interacción e interacción para la obtención de los extractos orgánicos y es muy probable que *E. gomezpompae* se encontrara en una fase de crecimiento teniendo como consecuencia esta disminución del rendimiento.

Con los resultados hasta ahora analizados podemos proponer que *E. gomezpompae* es un endófito con un potencial antagónico basado en la producción de metabolitos secundarios, difundidos en el sustrato, esto es que establece relaciones de competencia por interferencia indirecta. Para corroborar este mecanismo, a continuación se analizan los resultados de los bioensayos de potencial antifúngico por dilución en agar, realizados con el extracto orgánico de los cultivos control de *E. gomezpompae*.

- Determinación del potencial antifúngico por dilución en agar

En la Gráfica 1 se presentan los resultados obtenidos del efecto del extracto orgánico de *E. gomezpomape* sobre el crecimiento de *G. mangiferae* y *P. capsici* a las concentraciones de 125, 250 y 500  $\mu\text{g/mL}$ . El extracto de *E. gomezpomape* inhibe significativamente el crecimiento de los dos microorganismos de prueba, y al mismo tiempo causa autotoxicidad, este efecto está asociado a la producción de algunos metabolitos primarios, sin embargo, como es de esperar, dicha autotoxicidad resulta menor que la inhibición sobre el crecimiento de *P. capsici* y *G. mangiferae* (Dix y Webster, 1995).

**Gráfica 1.** Actividad antifúngica de los extractos de *E. gomezpomape* a 125, 250 y 500  $\mu\text{g/mL}$ , sobre el crecimiento de *G. mangiferae* y *P. capsici* y sobre sí misma.



Cabe señalar, que aunado a la inhibición del crecimiento de los microorganismos, se observaron cambios morfológicos en comparación con los controles de crecimiento. Por su parte, *E. gomezpomape* presenta un ligero incremento en la coloración de los bordes de la colonia. *P. capsici* muestra una apariencia con mayor humedad y las colonias de *G. mangiferae*, que por lo general no tienen un crecimiento radial uniforme, crecen aun más irregulares en presencia del extracto de *E. gomezpomape* lo cual impidió el análisis por medición del crecimiento radial y se realizó por determinación del área de la colonia.

La inhibición del crecimiento de los tres microorganismos no es dependiente de la concentración de extracto de *E. gomezpompe*, en todos los casos se observa un efecto de “saturación”. El crecimiento de *E. gomezpomape* y de *P. capsici* no muestra cambios significativos a las concentraciones de 250 y 500 µg/mL. El efecto de saturación de extracto sobre el crecimiento de *G. mangiferae* es aún más notorio ya que es observable desde la concentración de 125 µg/mL. Estos resultados muestran la sensibilidad de este hongo a los metabolitos de *E. gomezpompe*.

Al contrastar la información obtenida de estos bioensayos con los de antagonismo directo, es importante resaltar que el efecto del extracto de *E. gomezpompe* a 125 µg/mL sobre el crecimiento de *P. capsici* es menor (49.0 %) que el causado por la presencia del endófito *E. gomezpompe* (65.2 %). Por el contrario, el efecto provocado por la presencia del *E. gomezpompe* sobre el crecimiento de *G. mangiferae* (49.6 %) es menor que el causado por el extracto a la concentración más baja de prueba (68.9 %). Si consideramos que la concentración de los metabolitos secundarios producidos por *E. gomezpompe* y difundidos en el agar del bioensayo de antagonismo, es mucho menor que las utilizadas en los bioensayos de potencial antifúngico, el comportamiento que presenta *G. mangiferae* es el esperado, sobre todo tomando en cuenta que ambos endófitos fueron inoculados al mismo tiempo y en consecuencia las concentraciones iniciales de metabolitos secundarios producidos por *E. gomezpompe* en el medio de cultivo eran nulas pues se sabe que la producción de metabolitos secundarios es posterior a la fase de crecimiento de los microorganismos. Siendo *G. mangiferae* una especie sensible a la acción de estos metabolitos como lo demuestra el bioensayo por dilución en agar, es posible suponer que este hongo presenta una estrategia de vida S, es decir, de tolerancia al estrés que en este caso es estrés químico (Dix y Webster, 1995).

El comportamiento observado por el fungoide fitopatógeno *P. capsici* permite proponer que además del potencial antifúngico demostrado por los metabolitos secundarios producidos por *E. gomezpompe* y extraídos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, es posible que otro tipo de factores también contribuyan a la actividad antagónica. Tomando en cuenta los estudios microscópicos que demostraron que no existe interferencia hifal de *E. gomezpompe* y *P. capsici* y las observaciones macroscópicas que demostraron que el mecanismo de antagonismo no es por contacto de micelio, podemos inferir que el principal mecanismo de

interacción es indirecto. Con base en estos argumentos, la inhibición del crecimiento del oomiceto podría tener un componente enzimático u otras sustancias no extraídas durante las maceraciones, además hay que considerar que estamos realizando un análisis fundamentado en una competencia netamente por interferencia, no obstante, en el caso de los microorganismos es difícil separar ésta, de la competencia por explotación, la cual se da cuando ambos microorganismos consumen a distintas velocidades un recurso común (Tuininga, 2005). *P. capsici* es un organismo con una velocidad de crecimiento muy alta, una característica de los organismos ruderales (R). Los microorganismos que presentan esta estrategia de vida, por lo general no tienen la capacidad enzimática para asimilar diversos sustratos, en cuanto se consumen los nutrientes que pueden asimilar, la colonia comienza a morir. Si consideramos que *E. gomezpompae* consume primero los nutrientes más accesibles del medio de cultivo, asociado al espacio físico que ocupa, es posible que limite el acceso del fitopatógeno a estos nutrientes, por lo cual cabe la posibilidad de que este tipo de competencia también desempeñe un papel importante en el antagonismo de estos microorganismos. Por otro lado, los hongos con estrategias de crecimiento tolerantes al estrés (S) tienen una mayor capacidad enzimática para metabolizar diversos sustratos, haciendo que esta consideración sea menos importante en condiciones de competencia (Dix y Webster, 1995).

Con estos estudios se demostró que el hongo endófito *E. gomezpompae* presenta un buen potencial antagónico y que el principal mecanismo de interacción frente a *P. capsici* y *G. mangiferae* está relacionado directamente con producción de metabolitos secundarios (bisnaftoespirocetales) con actividad antifúngica. Con la finalidad, de evaluar el papel que juegan los compuestos bisnaftoespirocetálicos en el antagonismo de *E. gomezpompae* frente a *P. capsici* y *G. mangiferae* a continuación se analizan los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos obtenidos en los bioensayos de antagonismo directo, utilizando CLAR.

## **2. Análisis por CLAR de los perfiles metabólicos**

Para realizar eficientemente el análisis de los perfiles metabólicos de los extractos de los microorganismos en estudio bajo condiciones de antagonismo así como el efecto del

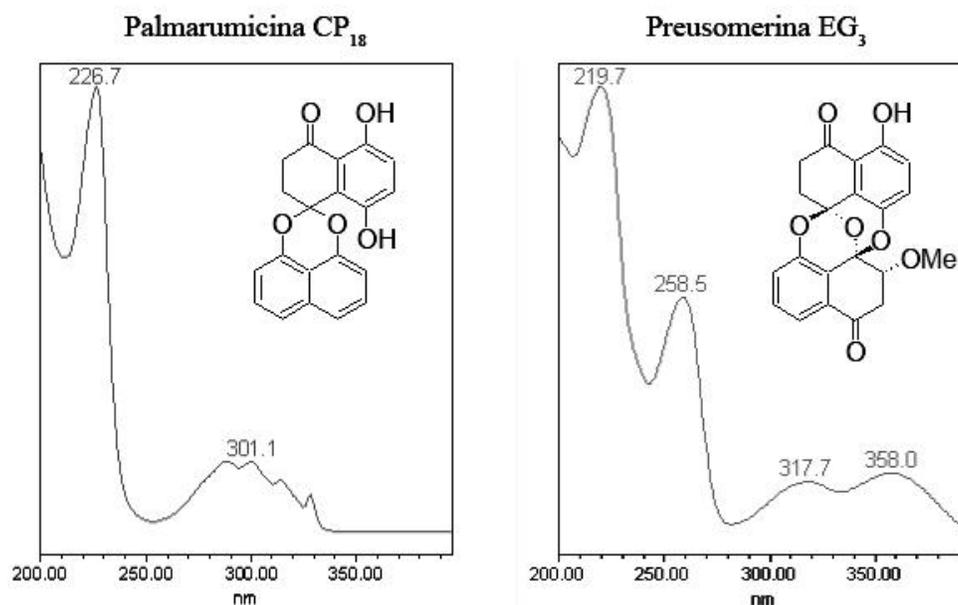
extracto de *E. gomezpompae* sobre la producción de metabolitos secundarios en *G. mangiferae* y *P. capsici* se requiere, en primer lugar, del desarrollo adecuado de métodos de separación que permitan la resolución de mezclas muy complejas, y en segundo, es fundamental que los perfiles obtenidos del mismo hongo se analicen bajo las mismas condiciones (ver procedimiento experimental).

Para determinar los métodos de separación se utilizaron los extractos obtenidos a partir de los controles de crecimiento. Los primeros análisis se realizaron con eluciones isocráticas, sin embargo, la diversidad de polaridad de los metabolitos presentes en los extractos crudos requirió el desarrollo de métodos empleando gradientes de elución. Además, se estableció una temperatura de columna ligeramente superior a la ambiente (30°C) para evitar incrementar las variaciones normales en los tiempos de retención de los diversos picos, debida al cambio de temperatura ambiental.

Con el fin de elucidar el posible papel ecológico de los bisnaftoespirocetales en estas interacciones, se analizaron muestras conocidas de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**1**), EG<sub>2</sub> (**2**), EG<sub>3</sub> (**3**), EG<sub>4</sub> (**4**) y de las palmarumicinas CP<sub>2</sub> (**5**), CP<sub>17</sub> (**6**) y CP<sub>18</sub> (**7**) en las condiciones de análisis establecidas. Los cromatogramas obtenidos para cada una de estas muestras se encuentran en las Figuras 14 a 16 del Anexo A, mientras que en el Cuadro 9 se presentan los tiempos de retención de estos compuestos bajo el método de análisis de los extractos de cada uno de los microorganismos en orden creciente de acuerdo con su tiempo de retención. Los bisnaftoespirocetales utilizados fueron obtenidos a partir de estudios previos realizados en el Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología, UNAM (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; González-Meléndez, 2009). Para cada compuesto se obtuvo su espectro en el UV utilizando un detector de arreglo de fotodiodos, de esta manera, ya que los espectros dentro de las familias de compuestos son prácticamente iguales, podemos detectar la presencia de otras preusomerinas o palmarumicinas aun no identificadas al encontrar una similitud en su espectro de UV mas no en los tiempos de retención (Fiedler, 1993). A manera de ejemplo en la Figura 10 se muestran los espectros UV de la palmarumicina CP<sub>18</sub> (**7**) y la preusomerina EG<sub>3</sub> (**3**).

**Cuadro 9.** Tiempos de retención de los bisnaftoespirocetales producidos por *E. gomezpompae* bajo distintas condiciones de análisis.

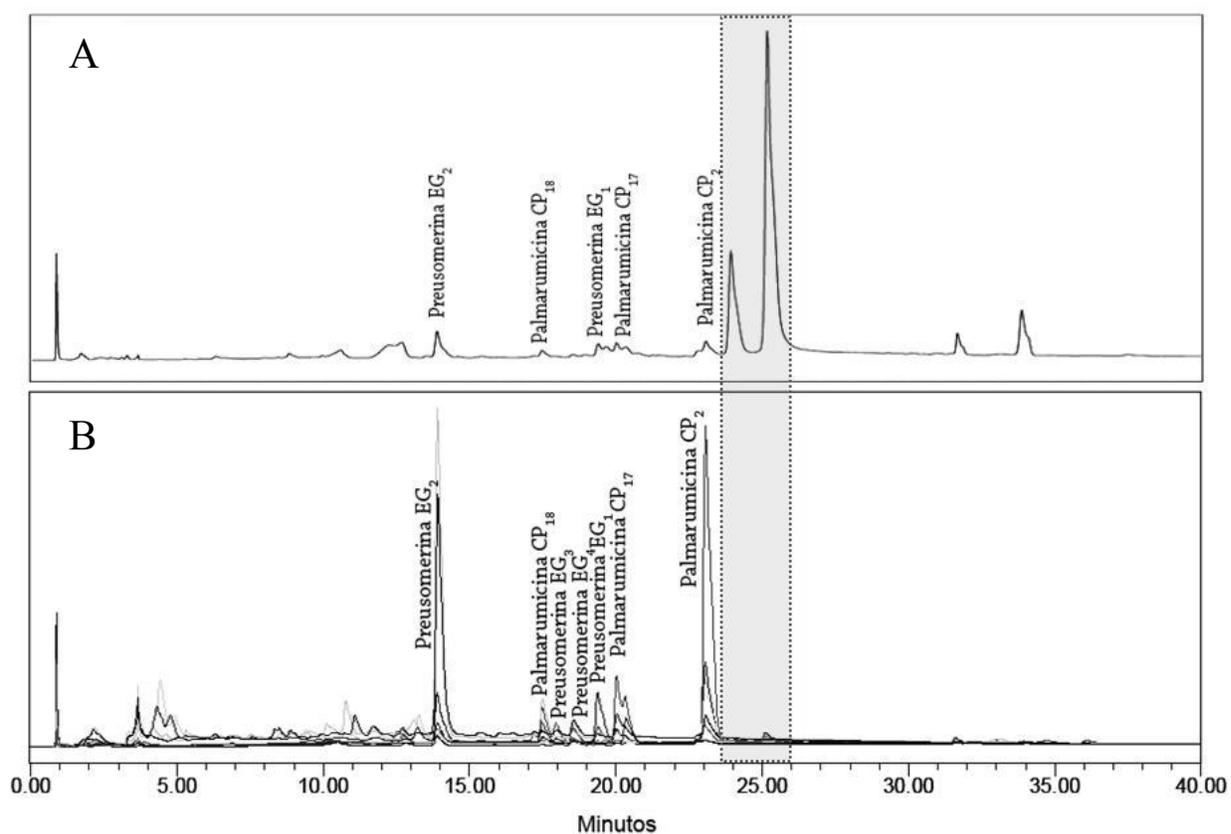
Compuesto	Tiempo de retención (min) bajo las condiciones de análisis de:		
	<i>E. gomezpompae</i>	<i>G. mangiferae</i>	<i>P. capsici</i>
Preusomerina EG <sub>2</sub> ( <b>2</b> )	13.9	56.2	35.7
Palmarumicina CP <sub>18</sub> ( <b>8</b> )	17.5	68.8	41.2
Preusomerina EG <sub>3</sub> ( <b>3</b> )	18.0	68.9	41.7
Preusomerina EG <sub>4</sub> ( <b>4</b> )	18.6	70.4	42.6
Preusomerina EG <sub>1</sub> ( <b>1</b> )	19.5	72.5	43.9
Palmarumicina CP <sub>17</sub> ( <b>7</b> )	20.1	74.7	44.8
Palmarumicina CP <sub>2</sub> ( <b>6</b> )	23.1	81.8	49.1



**Figura 10.** Espectros en el UV de la palmarumicina CP<sub>18</sub> y la preusomerina EG<sub>3</sub>

El procesamiento de los resultados de los análisis cromatográficos de los extractos obtenidos de los bioensayos, requirió del análisis de una gran cantidad de picos y en algunos casos, por la complejidad de los cromatogramas y las ligeras variaciones en los tiempos de retención (TR), la identificación que realiza el programa de control (Empower 2®), basada, en este caso, en los TR de los bisnaftoespirocetales y del APD (controles), arroja falsos positivos en consecuencia, fue necesario comparar los espectros de UV de los posibles falsos positivos con los controles, para lograr una identificación correcta de los picos. Debido a la gran cantidad de señales y a que en los cromatogramas la mayoría de los picos no se aprecian claramente debido a la baja absorbancia presentada, los resultados

obtenidos se muestran organizados en los Cuadros 10-12 en donde se resumen los picos principales de los cromatogramas obtenidos de los extractos de cada microorganismo. Los TR expresados en dichos cuadros son tiempos de retención promedio debido a que siempre existe, aunque mínima, una variación en éstos. Para obtener un manejo eficiente de datos es conveniente el uso de marcadores (Nielsen *et al.*, 2004). Para este estudio, se aprovecho la presencia de los bisnaftoespirocetales conocidos tanto en los cromatogramas provenientes de los extractos de *E. gomezpompae* como en los extractos de los microorganismos de prueba en los bioensayos de potencial antifúngico, ya que en todos los casos son fácilmente observables.



**Figura 11.** Comparación del perfil cromatográfico (CLAR) del control de crecimiento de *E. gomezpompae* con el de cuatro variantes fenotípicas de este hongo. **A.** Cromatograma (225 nm) del extracto *E. gmz G* (extracto del control de crecimiento de *E. gomezpompae* en el bioensayo de antagonismo frente a *G. mangiferae*); **B.** Sobreposición de los cromatogramas (225 nm) obtenidos de cuatro variantes fenotípicas de *E. gomezpompae*. El área sombreada señala la ventana de tiempo correspondiente a los dos picos mayoritarios presentes en extractos de *E. gomezpompae* incubados durante 20 días.

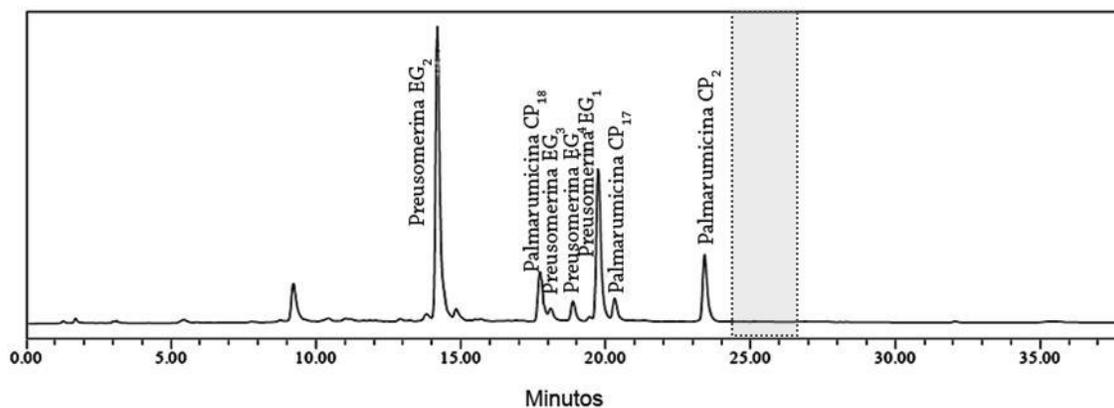
A continuación se discutirá cada uno de los perfiles obtenidos mostrando únicamente los cromatogramas cuando lo que se discute sea fácilmente apreciable. Los TR, área del pico, porcentaje de área y el respectivo cromatograma para cada extracto se encuentran en los Cuadros 13-37 y en las Figuras 17-41 del Anexo A.

- Perfiles metabólicos de *Edenia gomezpompae*

La hipótesis de este proyecto parte de que en estudios previos se demostró que los bisnaftoespirocetales son los metabolitos secundarios mayoritarios producidos por *E. gomezpompae* y que presentan potencial antifúngico (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; González-Meléndez, 2009). No obstante, lo más evidente en los cromatogramas de los extractos de *E. gomezpompae* es la presencia de dos picos mayoritarios que no corresponden a preusomerinas ni a palmarumicinas. Con la finalidad de entender la presencia de estos compuestos y considerando la alta plasticidad fenotípica mostrada por este endófito se planteó la posibilidad de analizar los extractos orgánicos obtenidos en proyectos anteriores llevados a cabo en el Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología, UNAM y que provienen de distintas variantes de *E. gomezpompae*. En la Figura 11 A se presenta el cromatograma del extracto E. gmz G y en la Figura 11 B se muestra la sobreposición de los cromatogramas obtenidos para los extractos de cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae*, en los cuales, no se aprecian diferencias cualitativas, pero sí cualitativas, evidenciando cambios en la expresión fenotípica a nivel químico.

Los picos mayoritarios detectados en los cromatogramas obtenidos de los extractos de los controles de crecimiento de *E. gomezpompae*, solo pudieron encontrarse en una de las cuatro variantes y en concentraciones mínimas. Considerando que los extractos de las cuatro variantes provienen de cultivos de seis meses incubación en condiciones estáticas mientras que los controles de crecimiento solo se incubaron por 20 días, se puede proponer, que estos compuestos pueden servir de sustrato cuando los nutrientes del medio de cultivo escasean o que son precursores de los bisnaftoespirocetales; en ambos casos, al incrementar el periodo de incubación, estos picos deben disminuir, como, podemos suponer, sucedió en los cultivos de las variantes. Para corroborar esta suposición se prepararon nuevas cajas de control de crecimiento de *E. gomezpompae* en APD y se incubaron por 45 días, al

termino de los cuales se les sometió al mismo proceso de extracción que a los primeros controles. El análisis por CLAR del extracto obtenido dio como resultado un cromatograma en donde no se observan estos picos y los bisnaftoespirocetales se muestran como los principales componentes del extracto (Figura 12) corroborando que el tiempo es un factor que define su presencia.



**Figura 12.** Cromatograma (225 nm) del extracto obtenido de un cultivo de *E. gozempompa* de 45 días de cultivo en APD. El área sombreada señala la ventana de tiempo correspondiente a los dos picos mayoritarios presentes en extractos de *E. gozempompa* incubados durante 20 días.

Una vez hechas estas consideraciones se discutirán los resultados obtenidos a partir de los extractos de *E. gozempompa* y su variante amarilla al interaccionar con *G. mangiferae* (E. gmz G, E. gmz NI G, E. gmz I G, E. am NI G y E. am I G) y con *P. capsici* (E. gmz P, E. gmz NI P y E. Y P. I) junto con los datos obtenidos para el extracto control de APD (Cuadro 10). Debido, a que no todos los compuestos absorben a las mismas longitudes de onda, los cromatogramas de *E. gozempompa* se analizaron a 200 nm y 225 nm, los de *G. mangiferae* a 215 y 260 nm y los de *P. capsici* a 225 nm.

En general, podemos observar que durante las interacciones antagónicas, la producción de los bisnaftoespirocetales disminuye, sin embargo, la proporción en que cada uno lo hace es variable. A continuación se describe el cambio observado para cada uno de los picos correspondientes a los bisnaftoespirocetales que pudieron detectarse en los bioensayos de *E. gozempompa*.

**Cuadro 10.** Resumen de los picos de los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAR de los extractos de *E. gomezpompae*.

TR (min)	$\lambda$ (nm)	E. gmz G		E. gmz NI G		E. gmz I G		E. am NI G		E. am I G		E. gmz P		E. gmz NI P		E. Y P. I		APD área ( $\mu$ V s)
		área ( $\mu$ V s)	% área															
6.90	225	5,658	0.02			65,361	0.29	5,697	0.02	136,680	0.40			92,739	0.60	85,255	1.87	
8.90	225	176,646	0.69	62,687	0.25	41,882	0.19	13,258	0.06	90,931	0.27	706,340	3.72	86,818	0.57	18,973	0.42	21,210
9.27	200					54,292	0.07			98,370	0.07			30,085	0.04			
9.29	225	38,739	0.15	20,968	0.08	174,616	0.79	17,593	0.07	131,742	0.38			99,328	0.65	46,953	1.03	
10.06	225	63,433	0.25	46,237	0.19	139,924	0.63	56,751	0.24	97,882	0.29	116,304	0.61	27,712	0.18	100,955	2.22	
12.08	200	274,204	0.29	254,152	0.30	192,131	0.24	64,456	0.09	221,466	0.17	641,986	0.76	273,202	0.36	49,040	0.13	
12.29	225	784,551	3.05															
12.76	225	698,192	2.71	765,646	3.08	620,849	2.80	897,150	3.78	401,706	1.17					172,894	3.80	
13.03	225			1,100,502	4.43													
13.93	225	835,566	3.25	331,949	1.34	185,046	0.84	69,233	0.29	79,940	0.23	107,607	0.57	6,999	0.05	16,254	0.36	208,739
14.19	225			170,612	0.69	106,699	0.48											
14.22	200			194,333	0.23	90,129	0.11					130,675	0.15	105,809	0.14			
15.45	225	67,548	0.26	50,817	0.20	75,188	0.34											
17.15	200	63,642	0.07	69,466	0.08	61,259	0.08					89,801	0.11					
17.52	225	204,899	0.80	149,989	0.60	97,451	0.44	38,008	0.16	55,259	0.16	26,909	0.14	25,720	0.17	71,775	1.58	78,232
17.95	225	35,404	0.14	14,949	0.06											91,511	2.01	
18.00	200											54,547	0.06			83,779	0.22	
18.59	225	71,534	0.28	156,762	0.63	104,540	0.47			6,620	0.02	8,886	0.05	51,865	0.34	66,929	1.47	18,593
18.93	200	410,327	0.43	369,001	0.44	330,660	0.41	268,872	0.04	446,179	0.34	2,097,489	2.48	1,207,180	1.60	314,240	0.81	
19.10	225			46,303	0.19	93,143	0.42	72,742	0.31			22,995	0.12	295,096	1.92	15,356	0.34	
19.41	200	364,045	0.38	410,701	0.49	183,142	0.23	29,468	0.62	64,681	0.05							
19.70	200	490,469	0.51	623,473	0.74	835,749	1.04	451,072	1.88	744,232	0.56							
19.82	200											460,105	0.54	874,293	1.16	102,918	0.27	
20.03	225	7,372,021	1.45	260,056	1.05	235,577	1.06					51,014	0.27	155,586	1.01	42,531	0.94	12,269
20.44	225	337,636	1.31	134,950	0.54	146,087	0.66	81,954	0.35	55,825	0.16	129,276	0.68	5,222,327	34.01	198,031	4.35	14,783
20.71	225	40,548	0.55	336,606	1.36	215,916	0.97			3,813	0.01							
22.84	225	102,579	0.40	135,582	0.55	163,240	0.74	324,574	1.37	478,776	1.40			281,152	1.83	133,044	2.93	
23.10	225	558,514	2.17	289,367	1.17	261,761	1.18					205,893	1.08			354,952	7.80	592,399
23.58	200															141,961	0.37	
23.94	225	3,626,902	14.09	6,189,910	24.94	2,682,675	12.11	5,192,403	21.90	4,178,961	12.21			141,160	0.92	66,120	1.45	
25.18	225	12,526,136	48.68	11,032,836	44.45	9,807,610	44.26	13,760,129	58.03	10,293,493	30.07	6,192,062	32.61	3,683,829	23.99	1,236,992	27.20	
26.47	225			109,159	0.44	116,594	0.53											
26.76	225			114,307	0.46	126,333	0.57											
27.65	200	1,714,260	1.79	1,171,438	1.39	2,258,989	2.80	717,421	0.06	925,623	0.70	2,840,624	3.36	8,606,386	11.39	2,013,703	5.20	101,434
29.60	200	101,634	0.11	82,798	0.10	132,554	0.16	45,858	0.08	96,692	0.07	27,040	0.03	116,779	0.15	65,378	0.17	45,537
31.92	225											81,178	0.43	178,573	1.16	8,913	0.20	
33.14	200	388,689	0.41									1,678,715	1.99	506,050	0.67	3,607,914	9.32	781,511
34.56	225											26,597	0.14	14,760	0.10	7,015	0.15	
35.88	200			239,607	0.28							106,008	0.13	201,844	0.27	131,515	0.34	347,013
37.29	200	161,722	0.17	197,183	0.23	110,718	0.14	309,044	0.43	190,326	0.14					79,818	0.21	

El área sombreada señala los tiempos de retención de los bisnaftoespirocetales y los dos picos mayoritarios observados en los controles.

La preusomerina EG<sub>2</sub> (2) y la palmarumicina CP<sub>18</sub> (8) (TR 13.93 y 17.52 min respectivamente) disminuyen con respecto los controles de crecimiento.

En el antagonismo entre *E. amarilla* y *G. mangiferae* no se observó producción de preusomerina EG<sub>3</sub> (3) (TR 17.95 min) y en el antagonismo entre *E. gomezpompae* y el fitopatógeno *P. capsici* solo se observa en la zona I.

La preusomerina EG<sub>4</sub> (4) (TR 18.59 min) aumenta al interaccionar *E. gomezpompae* con sus competidores, aunque en el caso de la variante amarilla parece no producirse en el área NI. De los bisnaftoespirocetales detectados, éste es el único que aumenta su proporción respecto a los demás y, sin embargo, es el segundo menos abundante.

La producción de la preusomerina EG<sub>1</sub> (1) (TR 19.41 min) es nula en el bioensayo de antagonismo con *P. capsici* así como en su control de crecimiento. Al enfrentarse *E. gomezpompae* a *G. mangiferae* su producción en la zona NI es prácticamente igual que en el control, siendo menor en la zona I. La variante amarilla la produce en concentraciones muy bajas.

En los antagonismos entre *E. gomezpompae* y *G. mangiferae* la palmarumicina CP<sub>17</sub> (7) (TR 20.03) también disminuye y *E. amarilla* no la produce. En el bioensayo con *P. capsici* hay una sobreproducción en la zona NI mientras que en la interacción se reduce considerablemente.

El tiempo de retención de la palmarumicina CP<sub>2</sub> (6) (TR 23.10) coincide con una señal importante en el medio de cultivo (APD) y el análisis de su espectro en el UV indica que la señal no corresponde a este metabolito, en consecuencia, no es producido en condiciones de antagonismo.

Los picos mayoritarios también muestran un patrón, el compuesto con TR 23.9 min aumenta su proporción al crecer en condiciones de antagonismo. En la zona de interacción la concentración es igual o muy similar a la de los controles. El compuesto con TR de 25.1 min muestra una constante disminución en la zona de interacción.

Finalmente, el comportamiento del resto de los picos es variado y la mayoría no presenta un patrón de incremento o decremento, aunque podemos encontrar algunas tendencias, por ejemplo, el compuesto con TR de 9.27 min solo aparece en las zonas I. Los compuestos con tiempos de retención de 26.47 y 26.76 min no se encuentran en los

controles de crecimiento, solo se producen en la zona NI e incrementan ligeramente en la zona I. Los compuestos que eluyen a los TR 8.9 y 20.4 min disminuyen del control de crecimiento al área NI y de ésta a la zona de interacción antagónica.

Otro aspecto observado en estos cromatogramas es que el número de señales registradas a 225 nm (longitud de onda a la que aparece la mayor cantidad de picos y los más importantes) aumenta notablemente cuando *E. gomezpompae* y la variante amarilla interaccionan con *G mangiferae*, notándose aun más en la zona I. Todo lo anterior indica que la respuesta antagónica del endófito *E. gomezpompae* reside en aumentar el número de sustancias producidas más que en el incremento selectivo de alguno de sus metabolitos.

Cada vez que analizamos un aspecto de los mecanismos de defensa de *E. gomezpompae* recurrimos a su plasticidad fenotípica y es que, al parecer, ésta es una característica sumamente importante en la ecología de este endófito. La plasticidad fenotípica permite la adaptación o reacción de un microorganismo a las variaciones en su ambiente, expresando características alternativas (Fordyce, 2006; Jain *et al.*, 2008), en este caso, además de las diferencias morfológicas mostradas en la Figura 7, podemos observar un cambio químico, ya sea en la proporción de algunos metabolitos como se mostró en los cromatogramas de la Figura 11, o en una producción diferenciada de algunos compuestos como puede observarse en el Cuadro 10. Este comportamiento dificulta el análisis de los cambios en el perfil metabólico durante los bioensayos de antagonismo, sin embargo, podemos plantear que la influencia de un ambiente de antagonismo, provocará un cambio en el metabolismo secundario más evidente que el causado por las pequeñas diferencias en el medio de cultivo (APD natural), de manera que suponemos que las variaciones observadas se deben principalmente al efecto de los antagonistas sobre el microorganismo en observación y en menor grado a otros factores. Bajo esta suposición resulta evidente que *E. gomezpompae* muestra un comportamiento distinto, como es de esperarse al antagonizar al endófito *G. magiferae* y al fungoide fitopatógeno *P. capsici*.

- Perfiles metabólicos de *Guignardia mangiferae*

Una vez que hemos analizado el comportamiento del hongo endófito *E. gomezpompae*, se discutirá el de los microorganismos competidores tanto en los bioensayos de antagonismo directo como en los de potencial antifúngico en presencia del extracto de *E. gomezpompae* a distintas concentraciones (125, 250 y 500 µg/mL).

En el Cuadro 11 se resumen los picos obtenidos de los extractos de *G. mangiferae* en el bioensayo de antagonismo con *E. gomezpompae* (G. mang E, G. mang NI E y G. mang I E), con su variante *E. amarilla* (G. mang NI E. am y G. mang I E. am) y en los bioensayos de fungitoxicidad (G 125, G 250 y G 500). Los picos mostrados provienen de cromatogramas a 215 o 260 nm debido a que algunos compuestos de *G. mangiferae* se detectan en la longitud de onda mayor.

Al igual que en los cromatogramas de los extractos de *E. gomezpompae*, la variación en las proporciones de los picos de los distintos cromatogramas de los extractos de *G. mangiferae*, es muy variada y en muchos casos no se observa una tendencia clara, sin embargo, es más común encontrar patrones de incremento o decremento en la producción de ciertos metabolitos. En algunos casos, podemos observar una inhibición en la producción de los compuestos durante el antagonismo, misma que se da también en los bioensayos de actividad antifúngica del extracto control de *E. gomezpompae*. Como ejemplo tenemos el pico en 58.24 min que a pesar de un incremento en su área en la zona I respecto a la zona NI, en ambos casos la concentración es menor que en el control. La disminución de este compuesto no se ve tan afectada en los bioensayos de potencial antifúngico como por la presencia de sus competidores, lo cual indica que la inhibición en la producción de esta sustancia está siendo perturbada por otros factores no presentes en el extracto y que los mecanismos que intervienen en el antagonismo entre *E. gomezpompae* y *G. mangiferae* pueden no limitarse a la producción de metabolitos secundarios bioactivos.

También hay sustancias que incrementan sus proporciones durante los bioensayos de antagonismo y, en algunos casos, esto se mantiene en los ensayos biológicos de evaluación del potencial antifúngico. Por ejemplo, la señal con TR de 91.77 min que, aunque disminuye en la zona I respecto a la zona NI, la tendencia general es incrementar la producción de esta sustancia durante el antagonismo y solo a la concentración más elevada de extracto parece disminuir. Otro ejemplo es el del pico en 27.86 min, un metabolito que no se produce en el control y que solo se genera durante el antagonismo, aumentando su concentración en la zona I y que sigue produciéndose aun en presencia de altas concentraciones de extracto de *E. gomezpompae*, sin embargo, su proporción disminuye al aumentar la concentración del extracto.

**Cuadro 11.** Resumen de los picos de los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAR de los extractos de *G. mangiferae*.

TR (min)	λ (nm)	G. mang E		G. mang NIE		G. mang IE		G. mang NIE. am		G. mang IE. am		G 125		G 250		G 500		APD área (μV s)
		área (μV s)	% área	área (μV s)	% área	área (μV s)	% área	área (μV s)	% área	área (μV s)	% área	área (μV s)	% área	área (μV s)	% área	área (μV s)	% área	
6.68	215	195,789	3.14	57,573	1.14													
7.42	215	68,753	1.10	33,494	0.66	9,896	0.20	58,611	1.35	604,387	2.53	99,648	0.25	139,728	0.24	118,425	0.20	
11.68	260											15,025	0.09	52,887	0.26	51,304	0.25	7,050
15.19	260	9,799	0.23	5,455	0.24	6,036	0.32	4,901	0.29	6,436	0.07	76,327	0.47	59,381	0.29	56,134	0.27	
15.31	215	17,443	0.28	11,082	0.22	9,338	0.19	4,404	0.10	10,495	0.04	103,939	0.26	135,894	0.23	110,206	0.19	
17.63	260	4,187	0.10	7,707	0.34	5,182	0.27			3,812	0.04	334,379	2.07	559,788	2.76	522,940	2.53	
18.04	215	7,249	0.12	18,876	0.37	6,417	0.13					589,977	1.47	925,718	1.60	858,926	1.48	72,235
24.69	215			6,559	0.13							22,442	0.06	9,668	0.02	5,216	0.01	
25.30	260	10,843	0.25	6,802	0.30	11,993	0.63	31,954	1.91	22,016	0.26	126,984	0.78	127,681	0.63	80,238	0.39	
25.47	215	28,771	0.46	48,172	0.95	26,943	0.54	51,571	1.19	63,779	0.27	154,041	0.38	98,364	0.17	65,449	0.11	
25.80	260	20,924	0.48	12,708	0.56	21,359	1.13	36,365	2.18	32,820	0.38							
27.86	215			5,194	0.10	6,172	0.12	6,773	0.16	25,733	0.11	18,579	0.05	8,864	0.02	4,320	0.01	67,451
28.94	215											834,526	2.08	1,019,549	1.76	493,734	0.85	
30.78	260	248,610	5.76	7,128	0.31			8,971	0.54	367,956	4.29					11,948	0.06	
33.75	260	23,540	0.54	52,199	2.28	4,607	0.24	3,648	0.22	10,068	0.12	8,755	0.05	3,722	0.02	6,101	0.03	
35.18	260	27,627	0.64	11,195	0.49	14,634	0.77	10,434	0.62	9,150	0.11	51,906	0.32	36,554	0.18	27,107	0.13	
35.31	215	30,031	0.48	85,493	1.69	11,689	0.23	29,739	0.69	8,328	0.03	54,604	0.14	88,435	0.15	33,550	0.06	
36.05	260			51,788	2.26							2,622,085	16.20	3,231,574	15.94	1,932,154	9.34	
36.32	215					8,365	0.17					6,561,943	16.32	8,262,285	14.29	4,913,395	8.46	9,739
37.69	260											59,559	0.37	72,184	0.36	49,713	0.24	
38.27	215											480,087	1.19	464,787	0.80	650,370	1.12	7,138
38.76	260									14,290	0.17	37,940	0.23	54,998	0.27	42,254	0.20	
40.47	215	236,042	3.78	78,557	1.55	4,529	0.09			8,708	0.04	10,094	0.03					
40.58	260	293,891	6.80			25,314	1.34	18,363	1.10	5,253	0.06	48,500	0.30	8,025	0.04	3,996	0.02	
41.33	260					20,950	1.11	29,642	1.77	34,204	0.40							
41.54	260			78,290	3.42							66,805	0.41	84,640	0.42	94,718	0.46	
41.83	215											181,577	0.45	435,246	0.75	406,052	0.70	12,515
43.84	215					7,392	0.15			14,966	0.06	54,163	0.13	294,836	0.51	223,614	0.39	5,630
44.73	260	290,134	6.72	10,462	0.46	85,985	4.55	98,485	5.89	206,220	2.40							
45.45	215											372,749	0.93	642,965	1.11	527,156	0.91	9,821
45.98	215									72,296	0.30	138,532	0.34	389,819	0.67	327,706	0.56	
47.98	215											6,548,380	16.29	10,845,685	18.75	9,794,164	16.87	
50.40	215											58,656	0.15	299,496	0.52	262,021	0.45	14,928
50.92	215											97,067	0.24	387,074	0.67	347,242	0.60	
51.72	215					48,806	0.98	24,809	0.57	47,676	0.20	406,840	1.01	872,396	1.51	809,762	1.39	
52.21	215			46,813	0.93							198,862	0.49	459,826	0.80	477,244	0.82	
52.65	215											183,192	0.46	749,097	1.30	744,471	1.28	
52.69	260	35,952	0.83					16,696	1.00	7,734	0.09	69,965	0.43	182,366	0.90	203,962	0.99	
54.43	215											66,650	0.17	479,170	0.83	539,812	0.93	
55.15	215											89,490	0.22	337,223	0.58	408,041	0.70	

**Cuadro 11.** Resumen de los picos de los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAR de los extractos de *G. mangiferae*. (Continuación).

TR (min)	$\lambda$ (nm)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	área ( $\mu\text{V s}$ )														
56.12	215	145,610	2.33	199,807	3.95	344,560	6.89	85,623	1.97	210,516	0.88	10,859,989	27.02	13,872,935	23.99	17,519,667	30.18	549,970
56.21	260	99,249	2.30			153,643	8.13	17,526	1.05	46,718	0.54	6,335,550	39.15	7,799,263	38.47	10,049,508	48.56	164,406
57.66	260											90,429	0.56	182,896	0.90	229,070	1.11	
58.19	215											127,425	0.32	479,790	0.83	556,293	0.96	
58.24	260	1,279,561	29.62	22,351	0.98	110,825	5.86	83,755	5.01	231,597	2.70	689,549	4.26	500,780	2.47	288,781	1.40	
58.57	215	155,352	2.49	33,769	0.67			6,653	0.15	16,375	0.07							
59.15	215											54,131	0.13	381,359	0.66	582,302	1.00	
61.46	260	14,181	0.33			6,858	0.36			35,431	0.41	162,339	1.00	193,104	0.95	155,837	0.75	
61.53	215	54,358	0.87	38,982	0.77	18,247	0.36	7,460	0.17			399,909	0.99	781,457	1.35	650,197	1.12	64,923
62.24	215											162,409	0.40	456,125	0.79	581,050	1.00	
63.29	215	26,164	0.42	131,442	2.60	44,708	0.89	31,294	0.72	79,772	0.33	40,938	0.10	458,032	0.79	165,074	0.28	24,839
64.54	215					41,591	0.83	6,188	0.14	18,167	0.08	73,597	0.18	268,540	0.46	302,900	0.52	15,144
65.03	260	10,768	0.25	8,541	0.37					6,466	0.08							
66.25	215					57,518	1.15			5,621	0.02	17,935	0.04	200,415	0.35	185,865	0.32	17,294
68.17	260	7,163	0.17	5,987	0.26	4,881	0.26	29,900	1.79	39,030	0.45							7,321
68.48	215					6,860	0.14	9,414	0.22	89,778	0.38	3,166,246	7.88	4,310,810	7.45	5,755,202	9.91	28,089
69.29	215	65,284	1.05	14,385	0.28			8,728	0.20	25,198	0.11							
69.76	215											231,151	0.58	414,888	0.72	474,934	0.82	
70.32	215											315,293	0.78	375,668	0.65	535,505	0.92	22,222
70.63	260					38,956	2.06			79,491	0.93							
72.56	215											778,583	1.94	746,286	1.29	1,677,907	2.89	
72.87	215	64,191	1.03	74,397	1.47			32,623	0.75	51,188	0.21							
74.59	215					17,244	0.34	6,954	0.16	6,287	0.03	75,120	0.19	72,590	0.13	109,578	0.19	12,585
75.46	215			12,488	0.25	18,624	0.37	13,524	0.31	65,348	0.27	253,412	0.63	156,712	0.27	105,350	0.18	17,138
76.13	215	29,820	0.48	131,457	2.60	163,736	3.27	105,798	2.44	31,457	0.13	151,361	0.38	182,479	0.32			
77.25	215	15,998	0.26	28,310	0.56	29,818	0.60	52,023	1.20	35,543	0.15	18,070	0.04	16,137	0.03			5,319
78.41	260	245,208	5.68			62,608	3.31	45,785	2.74	36,824	0.43	45,015	0.28	56,794	0.28	27,346	0.13	
81.12	260	89,339	2.07			70,966	3.75	80,760	4.83	48,772	0.57			37,966	0.19			36,153
81.66	215											1,533,623	3.82	1,531,334	2.65	2,004,072	3.45	
82.17	215	74,241	1.19	123,450	2.44	178,601	3.57	139,483	3.22									
85.63	215	207,450	3.32	169,601	3.35	9,122	0.18	53,156	1.23	52,560	0.22	163,313	0.41	121,154	0.21	69,739	0.12	
87.78	215	39,488	0.63	37,430	0.74	41,315	0.83	35,295	0.81	255,962	1.07							
91.77	215	101,797	1.63	259,967	5.14	156,206	3.12	120,933	2.79	111,002	0.46	179,920	0.45	236,361	0.41	143,995	0.25	26,283
92.77	215			26,680	0.53							38,545	0.10	82,788	0.14	48,457	0.08	9,086
94.66	215	19,943	0.32	39,684	0.78	29,989	0.60	32,979	0.76	62,297	0.26	10,806	0.03	24,188	0.04	6,613	0.01	
98.97	215	248,973	3.99	23,487	0.46			6,453	0.15	3,847,853	16.10							
99.16	215	144,184	2.31	25,337	0.50	37,952	0.76			4,764,434	19.93	266,923	0.66	42,840	0.07	10,344	0.02	135,505
99.30	215	201,078	3.22					18,013	0.42									35,220
100.60	215			32,557	0.64													124,579
116.60	215			30,135	0.60	32,695	0.65	20,911	0.48	18,636	0.08	28,428	0.07	6,281	0.01	18,570	0.03	55,121

El área sombreada señala los tiempos de retención de los bisnaftoespirocetales.

Además, es importante destacar que a pesar de que no se detectaron diferencias en los resultados macroscópicos y microscópicos en los bioensayos de antagonismo, en varios picos se observan comportamientos distintos dependiendo de si la interacción es con *E. gomezpompae* o con su variante amarilla. Así, la señal en 18.04 min no se detecta en el antagonismo con *E. amarilla* y por el contrario el área bajo la curva del compuesto en 68.17 min aumenta más de cinco veces durante la interacción con esta variante de *E. gomezpompae*.

Por otra parte, es importante hacer notar que los picos correspondientes a las preusomerinas y palmarumicinas mayoritarias producidas por *E. gomezpompae* son las principales en los cromatogramas obtenidos para los extractos de los bioensayos de potencial antifúngico a nivel de extracto. No obstante, aparecen algunos picos cuyo espectro UV no puede ser correlacionado con estos compuestos. Tal es el caso de los dos picos intensos que aparecen a 36.05 y 36.32 min. El área bajo la curva aumenta al incrementar la concentración de extracto de 125 a 250  $\mu\text{g/mL}$  y disminuye a 500  $\mu\text{g/mL}$ , probablemente, estos picos son producto de la degradación de los metabolitos secundarios de *E. gomezpompae* como se verá al analizar el efecto de los compuestos puros sobre *G. mangiferae* y *P. capsici*.

Al comparar la cantidad de compuestos (picos) obtenidos a 215 nm se encontró que la presencia del microorganismo competidor estimula la producción de compuestos que no se observaron en los cromatogramas de los extractos del cultivo control, incrementándose este efecto en la zona I. Por otra parte, a 260 nm se observa una disminución en la cantidad de señales en el antagonismo entre *E. gomezpompae* y *G. mangiferae*. Al interactuar con *E. amarilla* la disminución del número de picos es aún mayor en la zona NI, sin embargo, en la zona I se observa un incremento significativo con respecto al control. Al aumentar la concentración de extracto, en ambas longitudes de onda, se ve un decremento en el número de picos.

Estas observaciones revelan la plasticidad fenotípica de *G. mangiferae*, promovida por los distintos quimiotipos de *E. gomezpompae*, demostrando la capacidad del primero para adaptarse a las agresivas condiciones impuestas por su antagonista, característica que debe resultar muy importante en un endófito generalista que enfrenta a distintos microorganismos, ya sean endófitos o fitopatógenos.

- Perfiles metabólicos de *Phytophthora capsici*

Con respecto al comportamiento del fungoide *P. capsici* durante el antagonismo con el endófito *E. gomezpompae* destaca la diferencia entre la cantidad de señales observadas durante la interacción antagonica respecto al control de crecimiento. En estas condiciones prácticamente se duplica el número de metabolitos secundarios producidos. En la zona I el número de picos se reduce con respecto a la zona NI, esto puede deberse a que su concentración es muy baja en comparación con la de los metabolitos de *E. gomezpompae* y en consecuencia el detector no puede captar su señal (ambos micelios se encontraban entremezclados).

Por otro lado, en el Cuadro 12 se resumen los picos más importantes detectados en los extractos de los bioensayos de antagonismo y de potencial antifúngico observándose que aunque el número de señales aumenta cuando los microorganismos se encuentran en condiciones de antagonismo, algunas señales presentes en el extracto control no se detectan en la interacción. En general, el área bajo la curva de las señales presentes en el control, aumenta considerablemente durante el antagonismo, el caso contrario solo lo presenta el compuesto en 3.48 min, sin embargo, los picos de los compuestos poco retenidos en estos análisis son menos confiables ya que el extracto del medio (APD) muestra importantes señales a TR bajos. Es evidente el cambio metabólico que se suscita en *P. capsici* durante el antagonismo con el hongo endófito *E. gomezpompae*, no obstante, la respuesta del oomiceto a la presencia del antagonista es insuficiente para sobrevivir.

Respecto a los dos picos mayoritarios que aparecen en los cromatogramas de *E. gomezpompae* hay que destacar que se encuentran ausentes en los cromatogramas de los bioensayos de potencial antifúngico, realizados con ambos microorganismos de prueba, lo que nos indica que estas sustancias pueden ser metabolizadas tanto por *G. mangiferae* como por *P. capsici* lo cual confirma que no son los responsables del efecto negativo observado durante los antagonismos.

No toda la producción metabólica y enzimática de un hongo es nociva para otros microorganismos, ciertos componentes pueden ser benéficos para un antagonista, es el efecto conjunto de la batería de metabolitos lo que define el comportamiento observado durante las interacciones antagonicas (Dix y Webster, 1995; Deacon, 1988).

**Cuadro 12.** Resumen de los picos de los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAR de los extractos de *P. capsici*.

TR (min)	$\lambda$ (nm)	P. cap		P. cap NI		E. Y P. I		P 125		P 250		P 500		APD área ( $\mu$ V s)
		área ( $\mu$ V s)	% área											
3.48	225	171,743	4.84	80,895	0.37	70,556	1.13	48,736	0.06	50,794	0.08	55,873	0.05	
5.56	225	41,847	1.18	161,239	0.74			36,203	0.05	44,681	0.07	48,149	0.05	
10.87	225			7,898	0.04			131,497	0.17	65,664	0.10	175,853	0.17	71,348
12.94	225							420,470	0.55	316,355	0.47	449,497	0.44	151,453
15.92	225	14,483	0.41	502,168	2.30	41,007	0.66							
17.10	225			148,037	0.68			67,694	0.09	115,145	0.17	105,033	0.10	
20.33	225			9,687	0.04	56,346	0.90	424,626	0.55	227,996	0.34	182,825	0.18	
22.77	225			33,016	0.15	13,802	0.22							
23.75	225			30,862	0.14			8,796	0.01	8,557	0.01	22,204	0.02	
25.38	225			34,413	0.16			3,309,392	4.30	3,108,629	4.59	4,967,166	4.88	12,921
26.66	225			16,971	0.08			365,297	0.48	229,215	0.34	407,817	0.40	
27.87	225			16,104	0.07			62,144	0.08	60,356	0.09	114,573	0.11	
28.58	225			50,698	0.23			58,202	0.08	66,664	0.10	99,395	0.10	
29.06	225			72,509	0.33	32,560	0.52	497,057	0.65	387,580	0.57	433,826	0.43	
29.63	225							77,717	0.10	75,039	0.11	112,869	0.11	
30.12	225	12,357	0.35	266,689	1.22			170,506	0.22	183,481	0.27	287,015	0.28	59,290
30.36	225					70,533	1.13	178,683	0.23	170,663	0.25	314,129	0.31	
30.92	225							255,449	0.33	254,818	0.38	327,045	0.32	
31.34	225							69,724	0.09	76,814	0.11	122,604	0.12	
32.21	225							351,166	0.46	331,877	0.49	196,947	0.19	
32.45	225					44,322	0.71	258,668	0.34	229,222	0.34	324,568	0.32	45,656
32.86	225							97,674	0.13	100,678	0.15	139,742	0.14	
33.20	225	34,999	0.99	616,038	2.83	395,311	6.32	127,941	0.17	123,279	0.18	273,207	0.27	
33.90	225							271,992	0.35	302,861	0.45	467,255	0.46	
34.16	225							250,112	0.33	157,722	0.23	721,707	0.71	
35.72	225	404,150	11.39	420,857	1.93	46,216	0.74	38,296,667	49.81	33,393,818	49.33	51,801,315	50.93	262,065
36.39	225	51,843	1.46	67,021	0.31									
36.86	225							221,283	0.29	171,985	0.25	658,415	0.65	
37.17	225							178,639	0.23	189,984	0.28	382,599	0.38	
37.35	225			159,188	0.73			318,052	0.41	321,132	0.47	575,634	0.57	
38.07	225	36,974	1.04											
38.68	225							137,401	0.18	126,368	0.19	506,211	0.50	
40.28	225			9,307	0.04			229,396	0.30	227,091	0.34	295,624	0.29	29,270

El área sombreada señala los tiempos de retención de los bisnaftoespirocetales.

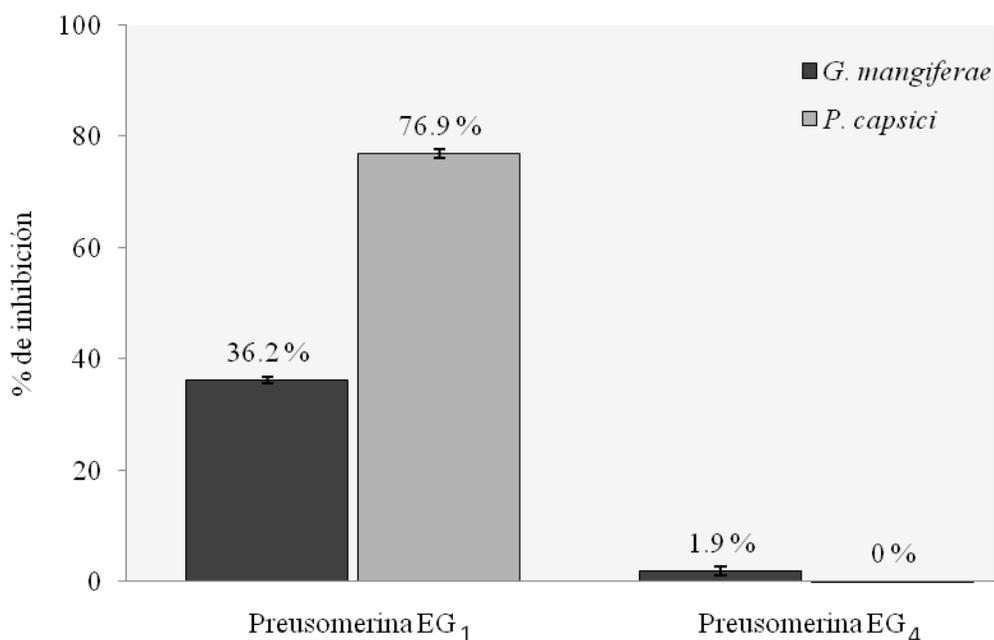
**Cuadro 12.** Resumen de los picos de los cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAR de los extractos de *P. capsici*. (Continuación).

TR (min)	$\lambda$ (nm)	P. cap		P. cap NI		E. Y P. I		P 125		P 250		P 500		APD área ( $\mu$ V s)
		área ( $\mu$ V s)	% área											
41.25	225	17,606	0.50	58,217	0.27	59,369	0.95	12,218,160	15.89	9,324,854	13.77	16,691,429	16.41	76,832
41.81	225					100,398	1.60	1,008,268	1.31	1,019,951	1.51	1,707,003	1.68	77,294
42.54	225	36,467	1.03	36,171	0.17	83,764	1.34	1,994,086	2.59	1,721,328	2.54	1,914,090	1.88	66,846
43.80	225	112,094	3.16	76,123	0.35	30,859	0.49	3,654,923	4.75	2,386,726	3.53	5,664,587	5.57	97,193
44.82	225					63,520	1.02	1,311,243	1.71	1,442,684	2.13	1,643,945	1.62	42,523
45.30	225					81,133	1.30	837,965	1.09	868,340	1.28	1,072,295	1.05	24,156
45.52	225	25,650	0.72	92,598	0.42	124,067	1.98							46,840
46.38	225	24,435	0.69	208,751	0.96	12,533	0.20	14,678	0.02			161,826	0.16	
48.08	225	22,220	0.63					17,759	0.02	38,107	0.06	40,189	0.04	
49.08	225	594,219	16.74			477,412	7.63	5,498,759	7.15	4,691,676	6.93	4,329,482	4.26	616,314
50.34	225			171,577	0.79	86,720	1.39			57,878	0.09	66,115	0.07	
51.56	225			9,506	0.04			34,589	0.04	49,679	0.07	47,832	0.05	
52.05	225					1,258,566	20.12	14,265	0.02	1,289,248	1.90	65,549	0.06	
59.10	225			17,956	0.08	75,395	1.21			21,302	0.03	8,453	0.01	
62.28	225			54,015	0.25	15,225	0.24			5,091	0.01	11,178	0.01	
63.62	225			393,339	1.80	309,954	4.95	29,061	0.04	21,395	0.03	30,476	0.03	62,514

El área sombreada señala los tiempos de retención de los bisnaftoespirocetales.

Hasta ahora se ha analizado el efecto de la presencia del hongo *E. gomezpompae* y de su extracto orgánico en la relación entre este y los dos microorganismos competidores. A continuación se discutirán los resultados de los bioensayos de potencial antifúngico de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**1**) y EG<sub>4</sub> (**4**) y los perfiles cromatográficos de sus extractos.

**Gráfica 2.** Actividad antifúngica de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**1**) y EG<sub>4</sub> (**4**) sobre el crecimiento *G. mangiferae* y *Phytophthora capsici* a 100 µg/mL.



### 3. Evaluación biológica de las preusomerinas EG<sub>1</sub> y EG<sub>4</sub>

Para evaluar la actividad antifúngica a nivel de compuestos puros en bioensayos por dilución en agar y obtener los perfiles de los extractos orgánicos resultantes se eligieron a las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**1**) y EG<sub>4</sub> (**4**). La preusomerina EG<sub>1</sub> (**1**) fue seleccionada porque en estudios previos se encontró que es el bisnaftoespirocetal que demuestra la mayor actividad antifúngica sobre el crecimiento de diferentes microorganismos endófitos y fitopatógenos (Macías-Rubalcava, *et al.*, 2008). La preusomerina EG<sub>4</sub> (**4**) se eligió por ser la única que mostró un aumento en su producción durante los bioensayos de antagonismo frente a los

microorganismos de prueba. Los resultados de los bioensayos se presentan en la Gráfica 2, observándose diferencias significativas en la actividad antifúngica de estos compuestos. La preusomerina EG<sub>1</sub> (**1**) inhibe significativamente el crecimiento del endófito generalista en un 36 % y el del microorganismo fitopatógeno casi un 80 %. En contraste, la preusomerina **4** no afecta el crecimiento de *G. mangiferae* y *P. capsici* a la concentración de prueba que fue de 100 µg/mL.

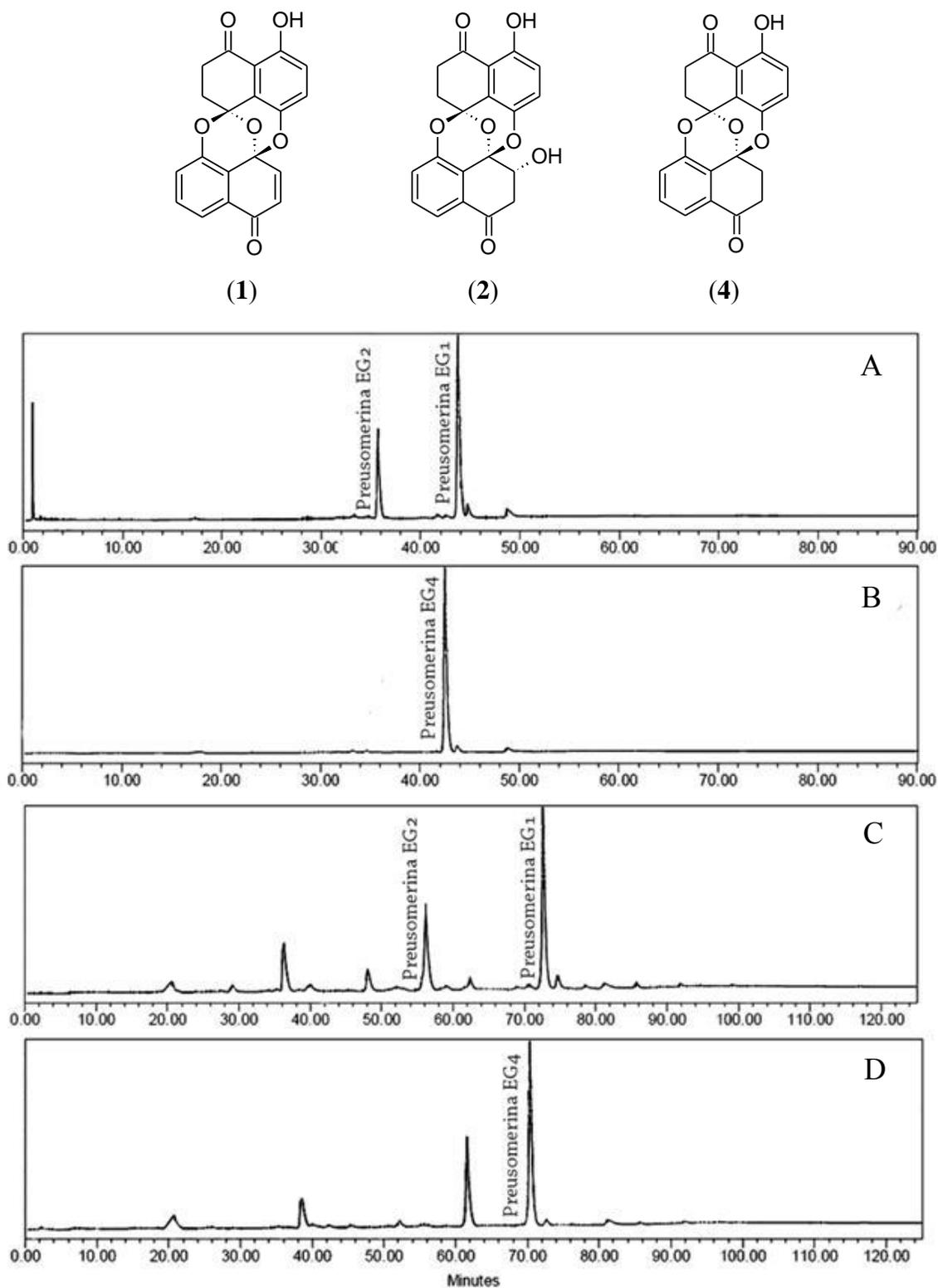
La respuesta química de *E. gomezpompae* debida la presencia de sus competidores es contraria a la esperada, por un lado la producción del compuesto más activo (preusomerinas EG<sub>1</sub>) hasta ahora aislado e identificado de entre los bisnaftoespirocetales producidos por este endófito es disminuida, hasta el punto de no poder ser detectada y por otra parte, la producción de un compuesto presuntamente inactivo (preusomerinas EG<sub>4</sub>) aumentó.

La Figura 13 muestra los cromatogramas A-D, obtenidos a partir de los extractos de los bioensayos anteriores. En la Figura 13, A y B presentan los resultados de *P. capsici* con las preusomerinas EG<sub>1</sub> (**1**) y EG<sub>4</sub> (**4**) respectivamente, mientras que C y D presentan los de *G. mangiferae*. Es importante destacar que, en los cromatogramas del bioensayo con el compuesto **1**, también se observan las señales correspondientes a la preusomerina EG<sub>2</sub> (**2**) (TR=35.773 para el fungoide y TR=56.176 para el endófito) y a la palmarumicina CP<sub>17</sub>, esta última es solo una impureza de la muestra evaluada. Sin embargo, la presencia de la preusomerina EG<sub>2</sub> (**2**) puede deberse a la actividad microbiana.

Las preusomerinas **1** y **4** reducen la producción de metabolitos secundarios de *P. capsici* con respecto a su control de crecimiento. Si bien el compuesto **4** no afecta el crecimiento del oomiceto si inhibe su producción metabólica a la concentración de prueba (100 µg/mL).

Por otro lado, en el caso de los bioensayos con *G. mangiferae* encontramos resultados que podrían ayudarnos a comprender el porqué éste endófito resiste mejor el antagonismo de *E. gomezpompae* que el fitopatógeno *P. capsici*. En el cromatograma del bioensayo con la preusomerina EG<sub>1</sub> (**1**) encontramos que los picos que aparecen en TR 36.22, 48.02 y 62.31 min solo se detectaron en los bioensayos de actividad antifúngica a nivel de extracto. Esto nos indica que muy probablemente estos picos correspondan a productos de degradación de los bisnaftoespirocetales por parte de *G.*

*mangiferae*. Del mismo modo, encontramos en el bioensayo con la preusomerina EG<sub>1</sub> (4) que los compuestos en TR 38.46 y 61.84 min únicamente aparecen en los bioensayos con extracto de *E. gomezpomae*. Si esta respuesta de *G. mangiferae* es general para la mayoría de los bisnaftoespirocetales es probable que sea uno de los factores más importantes en la capacidad de respuesta de este hongo frente a la interacción con *E. gomezpomae*, sobre todo si consideramos que el mecanismo de antagonismos de este último se fundamenta en un mecanismo de interacción indirecta basado principalmente en la producción de metabolitos secundarios bioactivos constituidos principalmente de preusomerinas y palmarumicinas, dos de los tres tipos de bisnaftoespirocetales.



**Figura 13.** Cromatogramas de los bioensayos de potencial antifúngico de las preusomerinas EG<sub>1</sub> (1) y EG<sub>4</sub> (4). **A.** *P. capsici* con 1; **B.** *P. capsici* con 4; **C.** *G. mangiferae* con 1 y **D.** *G. mangiferae* con 4.

## VIII. CONCLUSIONES

Una de las características más destacables del hongo endófito *Edenia gomezpompae* es su plasticidad fenotípica que le permite la expresión de distintos quimiotipos, al ser un hongo que muestra fuertes características de estrategias de vida competitivas (C) esto puede representarle una ventaja capacitándolo para adaptarse a una gran diversidad de interacciones.

La diferencia en el comportamiento de *E. gomezpompae* al antagonizar al endófito *Gignardia mangiferae* o al fitopatógeno *Phytophthora capsici* es observable y no es de sorprender puesto que el ambiente bioquímico en el que se encuentra el hongo en cada caso es distinto. No obstante la evidencia recaudada a lo largo de este proyecto no es posible determinar el papel particular que desarrollan las preusomerinas y palmarumicinas de *Edenia gomezpompae* en la interacción antagónica de este endófito con *G. mangiferae* y *P. capsici*. Aun así, es innegable que estos compuestos tienen un efecto biológico sobre sus antagonistas. Podemos dejar en claro que es el conjunto de metabolitos, y no uno o unos en específico, el responsable de la interacción observada.

*Guignardia mangiferae* muestra la capacidad plástica para adaptarse a las condiciones que establece *Edenia gomezpompae*, esto es relevante ya que ambas fueron aisladas de *Callicarpa acuminata*. Probablemente esta característica representa una adaptación a su estilo de vida como endófito. Por otro lado, la respuesta de *Phytophthora capsici* al antagonismo de *E. gomezpompae* es insuficiente para su supervivencia. Aunque estos son casos particulares, concuerdan con la hipótesis de que los endófitos pueden proveer protección a sus hospederas contra fitopatógenos y que como endófitos deben tener los mecanismos para interactuar con organismos competitivos.

La respuesta de *Guignardia mangiferae* y *Phytophthora capsici* ante la presencia de los compuestos producidos por *Edenia gomezpompae* no solo se limita al incremento en la producción metabólica, muy probablemente también incluye la degradación de éstos compuestos y posiblemente otros mecanismos fisiológicos. Si bien el antagonismo de *Edenia gomezpompae* está principalmente definido por mecanismos de competencia por interferencia indirecta, probablemente incluye otros mecanismos que provocan los efectos que no pueden ser explicados con la producción de metabolitos secundarios.

La importancia de proyectos de esta naturaleza reside en que poco a poco ayudan a desentrañar la enmarañada red de interacciones ecológicas. Además, la información que este tipo de estudios arroja puede ser aplicada en la búsqueda de nuevas sustancias con aplicación directa en las actividades humanas, fungiendo como un método de análisis y selección que conjunta las características del análisis y selección químico y de aquellos que consideran tanto el nicho ecológico como el potencial antagónico de los organismos a estudiar. En resumen, metodologías similares a las aplicadas en el presente trabajo son versátiles y pueden satisfacer y conciliar las necesidades de distintas líneas de investigación.

## IX. PERSPECTIVAS

El presente proyecto de investigación arroja luz sobre los mecanismos de *E. gomezpompa* en su interacción antagónica con *G. mangiferae* y *P. capsici*. Sin embargo, aun hay mucho por investigar al respecto. El modelo de estudio para las interacciones interespecíficas no contempló la influencia del ambiente químico impuesto por la planta hospedera (*Callicarpa acuminata*), además, el microorganismo fitopatógeno no es propio de *C. acuminata*. El siguiente paso en la elucidación de las relaciones establecidas *in vivo* por *E. gomezpompa* es la incorporación de lixiviados, extractos o exudados de la planta hospedera al medio de cultivo. Además de realizar los estudios con fitopatógenos y otros endófitos presentes en *C. acuminata*.

La presencia de los compuestos mayoritarios en cultivos de *E. gomezpompa* con veinte días de incubación y su ausencia al transcurrir cuarenta días de cultivo, requiere mayores estudios. Principalmente, del aislamiento e identificación de dichos compuestos y su posterior evaluación biológica. Además, resultaría interesante la obtención de los perfiles metabólicos de los bioensayos de antagonismo directo a distintos tiempos de cultivo, así como la realización de bioensayos modificando los tiempos en los que se inoculan, tanto *E. gomezpompa* como *G. mangiferae* y *P. capsici*, con el fin de observar su capacidad de resistir el remplazo o de efectuarlo, en la sucesión.

Por su parte, la degradación que *G. mangiferae* efectúa sobre los metabolitos de *E. gomezpompa* requiere una investigación más profunda en la cual se realicen pruebas biológicas por dilución en agar con los demás bisnaftoespirocetales aislados de *E. gomezpompa* para analizar los perfiles metabólicos y aislar e identificar los posibles productos de la degradación.

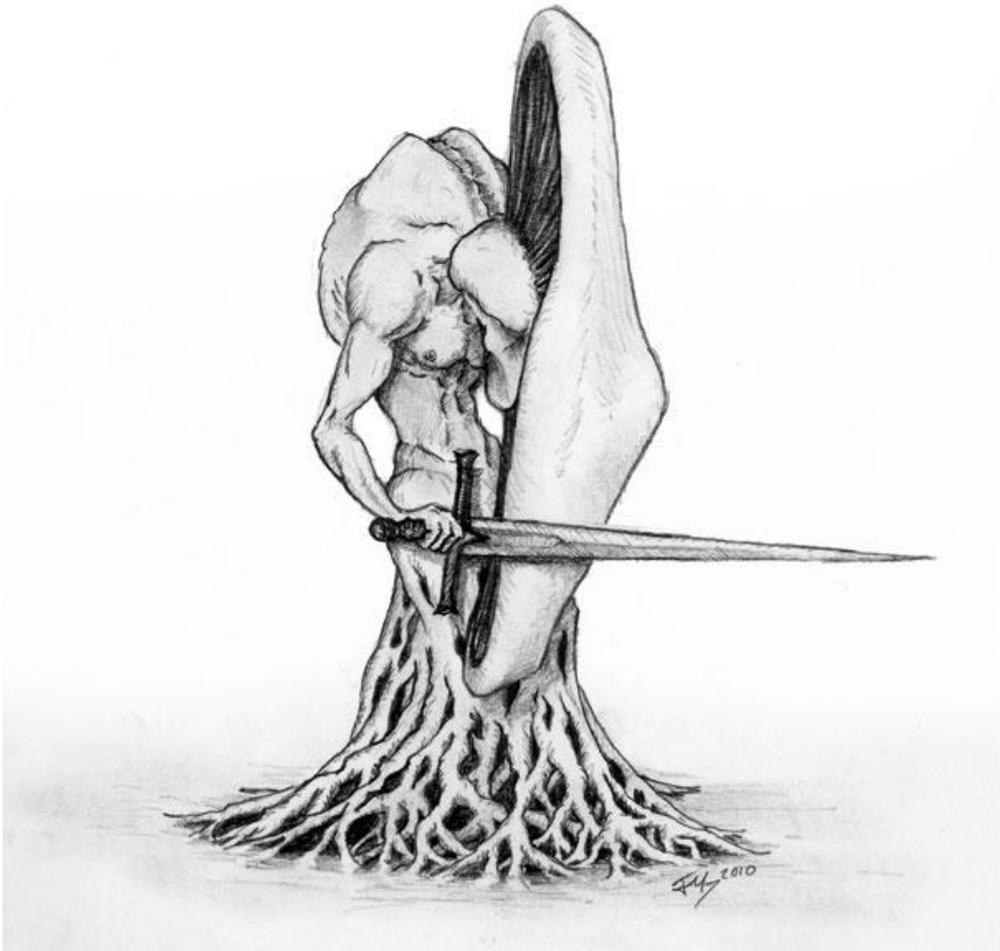
Finalmente, este proyecto abre una nueva línea de investigación donde los productos naturales de hongos endófitos se abordan desde el punto de vista de la metabolómica, dándonos un mejor panorama de su papel ecológico. De esta manera, la búsqueda de aleloquímicos con potenciales de aplicación práctica va en conjunto con estudios quimioecológicos profundos, que no solo se fundamentan en la observación de actividades biológicas, si no que toman en cuenta las variaciones en los perfiles metabólicos.



## X. EPÍLOGO

Tener el conocimiento por el hecho de tenerlo no otorga ningún beneficio, por eso su empleo es fundamental para poder obtener satisfacción en su posesión. Es, al igual que con el capital, el flujo lo que le atribuye valor al conocimiento y éste, a mi manera de ver las cosas, solo puede darse de dos maneras: a través de la enseñanza o mediante su aplicación. De esta manera podemos trascender el placer que se obtiene con la investigación científica prolongando su dulce resabio.

La comprensión de nuestro entorno nos permite un mejor aprovechamiento del ambiente. La consecuencia lógica de la ciencia básica es su implementación. Entre mayor es el bagaje científico incrementamos sus consecuencias benéficas sobre la humanidad y su entorno. Bajo estas premisas podemos decir que la ciencia, una actividad que satisface necesidades personales, desemboca en un beneficio global.





---

**XI. REFERENCIAS**

- Anaya, A L, (2003) Ecología Química, Plaza y Valdes, México
- Anaya, A.L., Mata, R., Sims, J., González-Coloma, A., Cruz-Ortega, R., Guadaño, A., Hernández-Bautista, B.E., Ríos, G. y Gómez-Pompa, A. (2003) Allelochemical Potential Of *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae). *Journal Chemical Ecology*. 29: 2725-2740
- Arnold, A.E. (2005) Diversity and Ecology of Fungal Endophytes in Tropical Forests. En *Current Trends In Mycological Research*. Deshmukh, S. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi: pp. 49-68
- Azevedo, J. L. y Welington, L. A. (2006) Diversity and Applications of Endophytic Fungi Isolated from Tropical Plants. En *Fungi: Multifaceted Microbes*. Ganguli, B. N. y Deshmukh, S. K., Taylor & Francis. Pp 189-207
- Baayen, R. P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., van der Aa, H. A., de Weerd, M., van Brouwershaven, I. R., Schutte, G. C., Maccheroni Jr., W., Glienke de Blanco, C. y Azevedo J. L. (2002) Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology* 92: 464-477
- Bode, H. B., Walker, M., Zeeck, A. (2000) Secondary Metabolites by Chemical Screening, 42. Cladospirones B to I from *Sphaeropsidales* sp. F-24'707 by Variation of Culture Conditions. *European Journal of Organic Chemistry*. 18: 3185-3193
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R, et al. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist. E.U.
- Cabrera-Cano, E., Sousa-Sánchez, M y Téllez-Valdés, O. (1982) Imágenes de la Flora Quintanarroense. Centro de Investigaciones de Quintana Roo, A.C e Instituto de Biología, UNAM.
- Chu, M., Patel, M. G., Pai, J. K., Das, P. R., Puar, M. S. (1996) SCH 5382 and SCH 53825, Novel Fungal Metabolites with Phospholipase D Inhibitory Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6(5): 576-584

- Davidson, F. A., Sleeman, B. D., Rayner, A. D. M., Crawford, J. W. y Ritz, K. (1996) Context-Dependent Macroscopic Patterns in Growing and Interacting Mycelial Networks. *Proceedings: Biological Sciences*. 263: 873-880
- Deacon, J.W. (1988) *Introducción a la Micología Moderna*. Limusa. México
- Dewick, P. M. (2009) *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*. Wiley. 3° ed Gran Bretaña.
- Dix, N. y Webster, J. (1995) *Fungal Ecology*. Chapman & Hall. Gran Bretaña.
- Dong, J. Y., Song, H. C., Li, J. H., Tang, Y. S., Sun, R., Wang, L., Zhou, Y. P., Wang, L. M., Shen, K. Z., Wang, C. R., Zhang, K. Q. (2008) Ymf 1029A-E, Preussomerin Analogues from the Fresh Water Derived Fungus YMF 1.01029. *Journal of Natural Products*. 71: 952-956
- Faeth, S. (2002) Are Endophytic Fungi Defensive Plant Mutualists? *OIKOS* 98: 25-36
- Fiedler, H. P. (1993) Biosynthetic Capacities of Actinomycetes. 1 Screening for Secondary Metabolites by HPLC and UV-Visible Absorbance Spectral Libraries. *Natural Products Letters* 2: 119-128
- Fordyce, J. A. (2006) The Evolutionary Consequences of Ecological Interactions Mediated Through Phenotypic Plasticity. *Journal of experimental biology* 209: 2377-2383
- Guimarães, D. O., Borges, W. S., Kawano, C. Y., Ribeiro, P. H., Goldman, G. H., Nomizo, A., Thiemann, O. H., Oliva, G., Lopes, N. P y Pupo, M. T. (2008) Biological Activities from Extracts of Endophytic Fungi Isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 52: 134–144
- Gloer, J. B. (1995) The chemistry of fungal antagonism and defense. *Journal of Canadian Botany* 73: 1265-1274
- González, M. C., Anaya, A. L., Glenn, A. E., Saucedo, G. A., Macías, R. M., Hanlin, T. R. (2007) A New Endophytic Ascomycete from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, México. *Mycotaxon* 10; 251-260
- González-Melendez, C. (2009) Potencial aleloquímico del endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.

- Gunatilaka, L. (2006) Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity and Implications of their Occurrence. *Journal of Natural Products*. 69: 509-526
- Guzman, G. (1998) Inventorying the Fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7: 369-384
- Hausbeck, M. K. y Lamour, K. H. (2004) *Phytophthora capsici* on Vegetable Crops: Research Progress and Management Challenges. *Plant Disease* 88: 1292-1303
- Hawksworth, D. (2001) The Magnitude of Fungal Diversity: the 1.5 Million Species Estimated Revisited. *Mycological Research*. 105: 1422-1432
- Hyakumachi, M. y Kubota, M. (2004) Fungi as Plant Growth Promoter and Disease Suppressor. En *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. Arora, D. K. Marcel Dekker inc. EU. pp. 101-110
- International Allelopathy Society (IAS) Constitution y Bylaws. (1996) First World Congress on Allelopathy: A Science for the Future. España. Septiembre.
- Isaac, S. (1992). *Fungal-Plant Interactions*. Chapman & Hall, Reino Unido.
- Jain, N., Hasan, F. y Fries, B. C. (2008). Phenotypic Switching in Fungi. *Current Fungal Infection Reports* 2: 180-188
- Klein, K K. (1996) Pattern formation and development of the fungal mycelium. En *Patterns in Fungal Development*. Chiu, S.W y Moore, D. Cambridge University Press. pp 70-86
- Kogel, K. H., Franken, P. y Hüchelhoven, R. (2006) Endophyte or Parasite – What Decides? *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 358-363
- Krohn, K., Michel, A., Flörke, U. Aust, H. J., Draeger, S., Schulz, B. (1994) Biologically Active Metabolites from Fungi, 4. Palmarumycins CP<sub>1</sub>-CP<sub>4</sub> from *Coniothyrium palmarum*: Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity. *Liebigs Annalen der Chemie* 11: 1093-1097
- Krohn, K. (2003) Natural Products Derived from Naphthalenoid Precursors by Oxidative Dimerization. En *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 85. Herz, W., Falk, H., Kirby, G. Springer. Austria. pp. 1-50

- Latijnhouwers, M., de Wit, P. J.G.M. y Govers, F. (2003) Oomycetes and Fungi: Similar Weaponry to Attack Plants. *Trends in Microbiology*. 11: 462-469
- Leonian, L. H. (1922) Stem and Fruit Blight of Peppers Caused by *Phytophthora capsici* sp. *Phytopathology* 12: 401-408
- Macías-Rubalcava, M., Hernández-Bautista, B. E., Jiménez-Estrada, M., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Hernández, O. S. Saucedo-García, A., Murià-González, M. J., Anaya, A. L. (2008) Naftoquinone Spiroketal With Allelochemical Activity From the Newly Discovered Endophytic Fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* 69: 1185-1196
- Mann, J. (1987). *Secondary Metabolism*. Clarendon Press. Oxford
- Martínez-Luis, S., Della, T. G., Coley, P. D., Cursar, A. T., Gerwick, W. H., Cubilla-Rios, L. (2008) Antileishmanial constituents of the Panamanian Endophytic Fungus *Edenia* sp. *Journal of Natural Products*. 71(12): 2011-2014
- Martínez-Luis, S., Cherigo, L, Spadafora, C., Gerwick, W.H., Cubilla-Rios, L. (2009) Additional Anti-Leishmanial Constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *Revista Latinoamericana de Química*. 37: 104-114
- Mead, R., Curnow, R. N. y Hasted, A. M. (2002) *Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology*. 3° ed. Chapman & Hall. CRC, EU.
- Meyer, L., Sanders, G. M., Jacobs, R. y Korsten, L. (2006) A One-Day Sensitive Method to Detect and Distinguish Between the Citrus Black Spot Pathogen *Guignardia citricarpa* and the Endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Disease* 90: 97-101
- Miller, J. D., Mackenzie, S., Foto, M., Adams, G. W. y Findlay, J. A. (2002) Needles of White Spruce Inoculated With Rugulosin Producing Endophytes Contain Rugulosin Reducing Spruce Budworm Growth Rate. *Mycological Research* 106: 471-479
- Nielsen, K. F., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., Lund, F., Thrane, U. y Frisvad, J. C. (2004) Chemical Identification of Fungi: Metabolite Profiling and Metabolomics. En *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. Arora, D. K. Marcel Dekker inc. EU. pp. 19-35

- Okane, I., Lumyong, S., Nakagiri, A. y Ito, T. (2003) Extensive Host Range of an Endophytic Fungus, *Guignardia endophyllicola* (Anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). *Mycoscience* 44: 353–363
- Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V. y Kirtikara, K. (2007) Biological activities of Extracts From Endophytic Fungi Isolated From *Garcinia* Plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 51: 517–525
- Polishook, J. D., Dombrowski, A. W., Tsou, N. N., Saliturno, g. M., Curotto, J. E. (1993) Preussomerin D From the Endophyte *Hormonema dematioides*. *Mycologia* 85(1): 62-64
- Prajoubkleng, A., Sirithunyalung, B., Charoenchai, P., Suvannakad, R., Sriubolmas, N., Piyamongkol, S., Kongsaree, P., Kittakoop, P. (2005) Bioactive Desoxypreussomerins and Dimeric Naphthoquinones From *Diospyros Ehretioides* Fruits: Deoxypreussomerins May Not Be Plant Metabolites but May Be From Fungal Epiphytes or Endophytes. *Chemistry & Biodiversity* 2: 1358-1367
- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D. y Jeewon, R. (2007) A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*. 53: 579-590
- Ravindranath, M., Reddy, R., Mahender, G., Ramu, R., Kumar, K. R., Das, B. (2004) Deoxypreussomerins From *Jatropha curcas*: are they Also Plant Metabolites? *Phytochemistry* 65: 2387-2390
- Rodrigues, K. F., Hesse, M. y Werner, C. (2000) Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi From *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*. 40: 261–267
- Rodrigues-Heerklotz, K. F., Drandarobv, K., Heerklotzb, J., Hesse, M. y Werner, C. (2001) Guignardic Acid, A Novel Type of Secondary Metabolite Produced by the Endophytic Fungus *Guignardia* Sp.: Isolation, Structure Elucidation, and Asymmetric Synthesis. *Helvetica Chimica Acta* 84: 3766-3772
- Sakemi, S., Inagaki, T., Kaneda, K., Hiral, H., Iwata, E., Sakakibara, T., Yamagichi, Y., Norcia, M., Wondrack, L. M., Sutcliffe, J., Korma, N. (1995) CJ-12,371 and CJ-12,372, Two Novel

DNA Gyrase Inhibitors. Fermentation, Isolation, Structural Elucidation and Biological Activities. *The Journal of Antibiotics* 48(2) 134-142

Saucedo-García, A. (2006) Búsqueda de compuestos bioactivos en hongos antagonistas endófitos de plantas con potencial aleloquímico de la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias, UNAM.

Saxena, S. y Pandey, A. K. (2001) Microbial Metabolites as Eco-Friendly Agrochemicals for the Next Millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 395-403

Schulz, B., Römmert, A. K., Dammann, U., Aust, H. J. y Strack, D. (1999) The Endophyte-Host Interaction: a Balanced Antagonism? *Mycological Research*. 10: 1275-1283

Schulz, B., Boyle, Ch., Draeger, S., Römmert, AK. y Krohn, K (2002) Endophytic Fungi: a Source of Novel Biologically Active Secondary Metabolites. *Mycological Research*. 106. 996-1004

Schulz, B. y Boyle, Ch. (2005) The Endophytic Continuum. *Mycological Research*. 109: 661-686

Seephonkai, P., Isaka, M., Kittakoo, P., Palittapongarnpim, P., Kamchonwonpaisan, S., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y. (2002) Evaluation of Antimycobacterial, Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of Preussomerins Isolated from the Lichenicolous Fungus *Microsphaeropsis* sp. BC 3050. *Planta Medica*. 68: 45-48

Seigler, D.S. (1977) Primary Roles for Secondary Products. *Biochemical Systematics and Ecology*. 5: 195-199

Shearer, C. A. (1995) Fungal Competition. *Journal of Canadian Botany* 73: 1259-1264

Sieber, T. N. (2007) Endophytic Fungi in Forest Trees: Are they Mutualists? *Fungal Biology Reviews* 21: 75-89

Singh, B. S., Zinck, D. L., Liesch, J. M., Ball, R.G., Goetz, M. A., Bolessa, E. A., Giacobbe, R.A., Silverman, K. C., Bills, G. F., Pelaez, F., Cascales, C., Gibbs, J. B., Lingham, R. B. (1994) Preussomerins and Deoxypreussomerins: Novel Inhibitors of Ras Farnesyl-Protein Transferase. *Journal of Organic Chemistry*. 59: 6296-6302

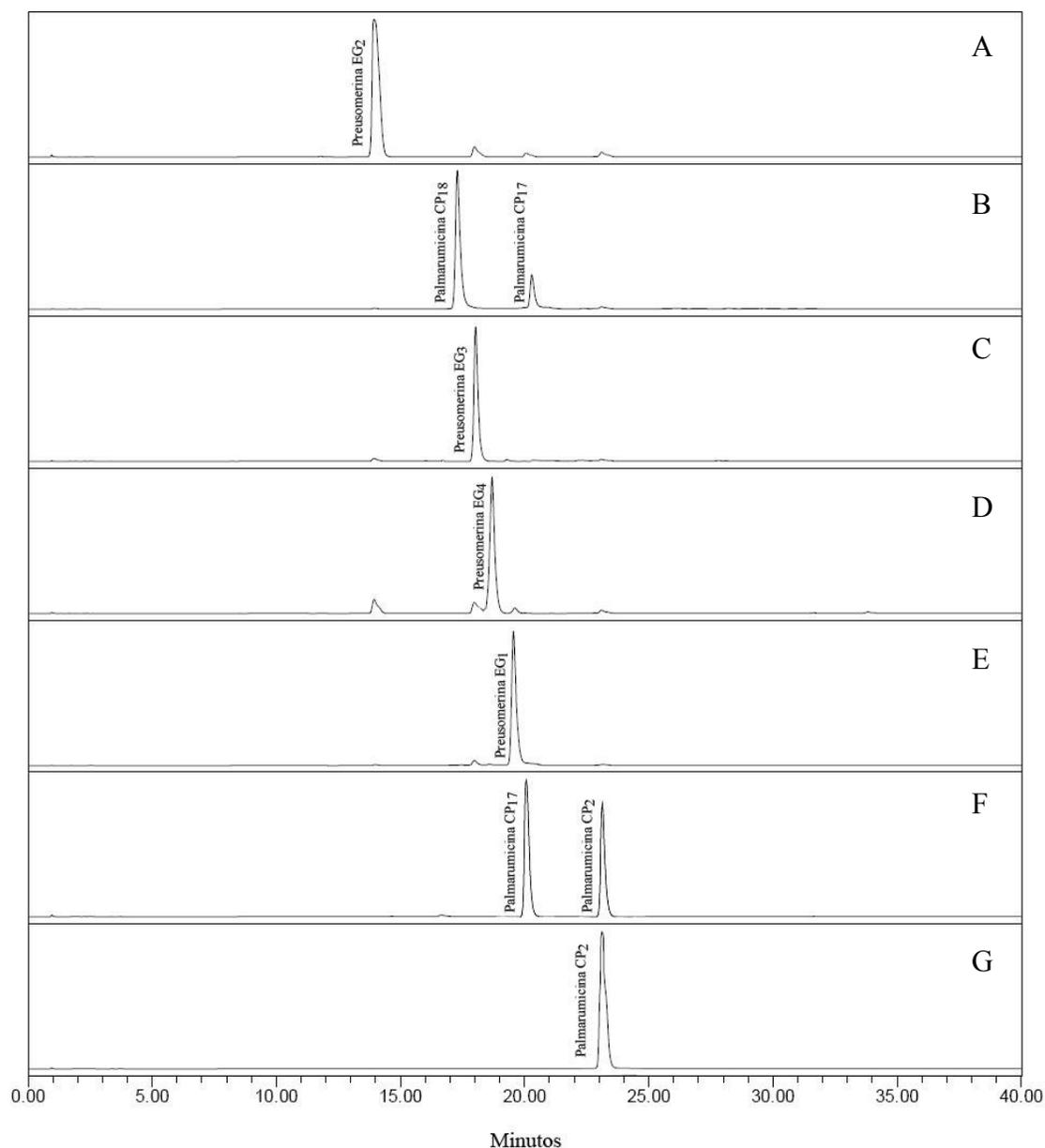
Sumarah, M. W., Adams, G. W., Berghout, J., Slack, G. J., Wilson, A. M. y Miller, J. D. (2008) Spread and Persistence of a Rugulosin-Producing Endophyte in *Picea glauca* Seedlings. *Mycological Research*. 112: 731-736

- Tan, R. X. y Zou, W. X. (2001). Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites. *Natural Products Reports* 18: 448-459
- Tuininga, A. R. (2005) Interspecific Interaction Terminology: from Mycology to General Ecology. En *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Dighton, J., White, J. Oudemans, P. Taylor & Francis. E.U. pp 265-283
- van Bael, S., Maynard, Z., Rojas, E., Mejia, L. C., Kylo, D., Herre, E. A., Robbins, N., Bischoff, J. F. y Arnold, A. E. (2005) Emerging Perspectives on the Ecological Roles of Endophytic Fungi in Tropical Plants. En *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Dighton, J., White, J. Oudemans, P. Taylor & Francis. E.U. pp 181-191
- Vilella, D., Sanchez, M., Platas, G., Salazar, O., genilloud, O., Royo, I., Cascales, C., Martín I., Diez, T., Silverman, K. c., Lignham, R. B., Singh, S. B., Jayasuriya, H., Peláez, F. (2000) Inhibitors of farnesylation of Ras from a Microbial Natural Products Screening Program. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25; 315-327
- Wang, F. W., Ye, Y. H., Ding, H., Chen, Y. X., Tan, R. X., y Song, Y. Ch. (2010) Benzophenones from *Guignardia* sp. Ifb-e028, an Endophyte on *Hopea hainanensis*. *Chemistry & Biodiversity* 7: 216-220
- Weber, H. A., Gloer, J. B. (1991) The Preussomerins: Novel Antifungal Metabolites from the Coprophilous fungus *Preussia isomera* Cain. *Journal of Organic Chemistry*. 56: 4355-4360
- Wiklow, D. T. (1992) Interference Competition. En *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Carroll, G. C., Wiklow, D. T. Marcel Dekker inc. EU. Pp 265-274
- Woodward, S. y Boddy, L. (2008) Interactions Between Saprotrophic Fungi. En *Ecology Of Saprotrophic Basidiomycetes*. Boddy, L., Frankland, J. C. y van West, P. Elsevier. Reino Unido. pp. 125-141.
- Xia, X. K, Huang, H. R., She, Z. G., Cai, J. W., Lan, L., Zhang, J. Y., Fu, L. W., Vrijmoed, L. L. P., y Lin, Y. Ch. (2007) Structural and Biological Properties of Vermistatin and Two New Vermistatin Derivatives Isolated from the Marine-Mangrove Endophytic Fungus *Guignardia* sp. No. 4382. *Helvetica Chimica Acta* 90: 1925-1931

## ANEXO A

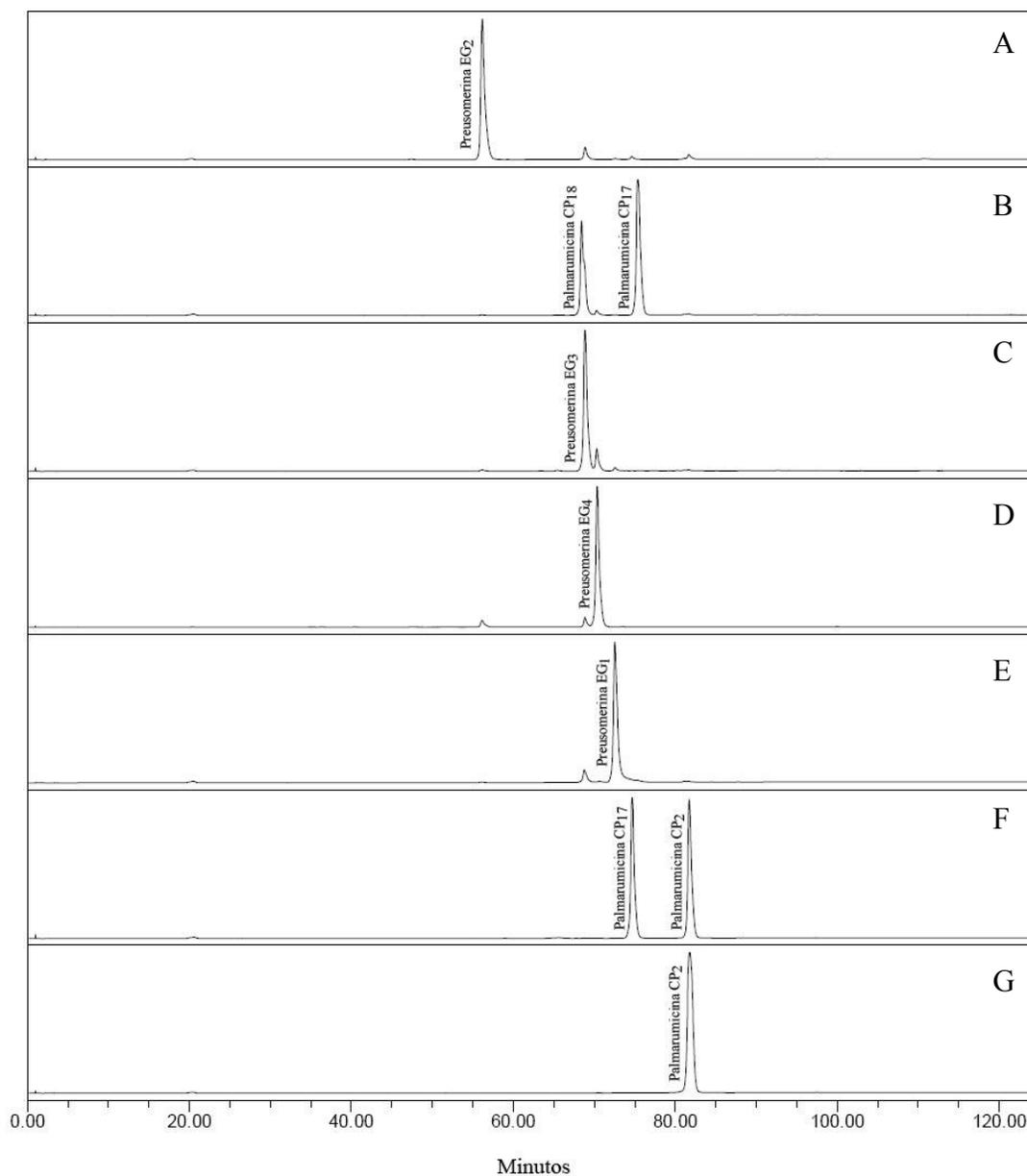
Cromatogramas y cuadros de Datos

**Figura 14.** Cromatogramas de las muestras conocidas de los bisnaftoespirocetales de *Edenia gomezpompae*, analizadas bajo las condiciones determinadas para los extractos de *E. gomezpompae*.



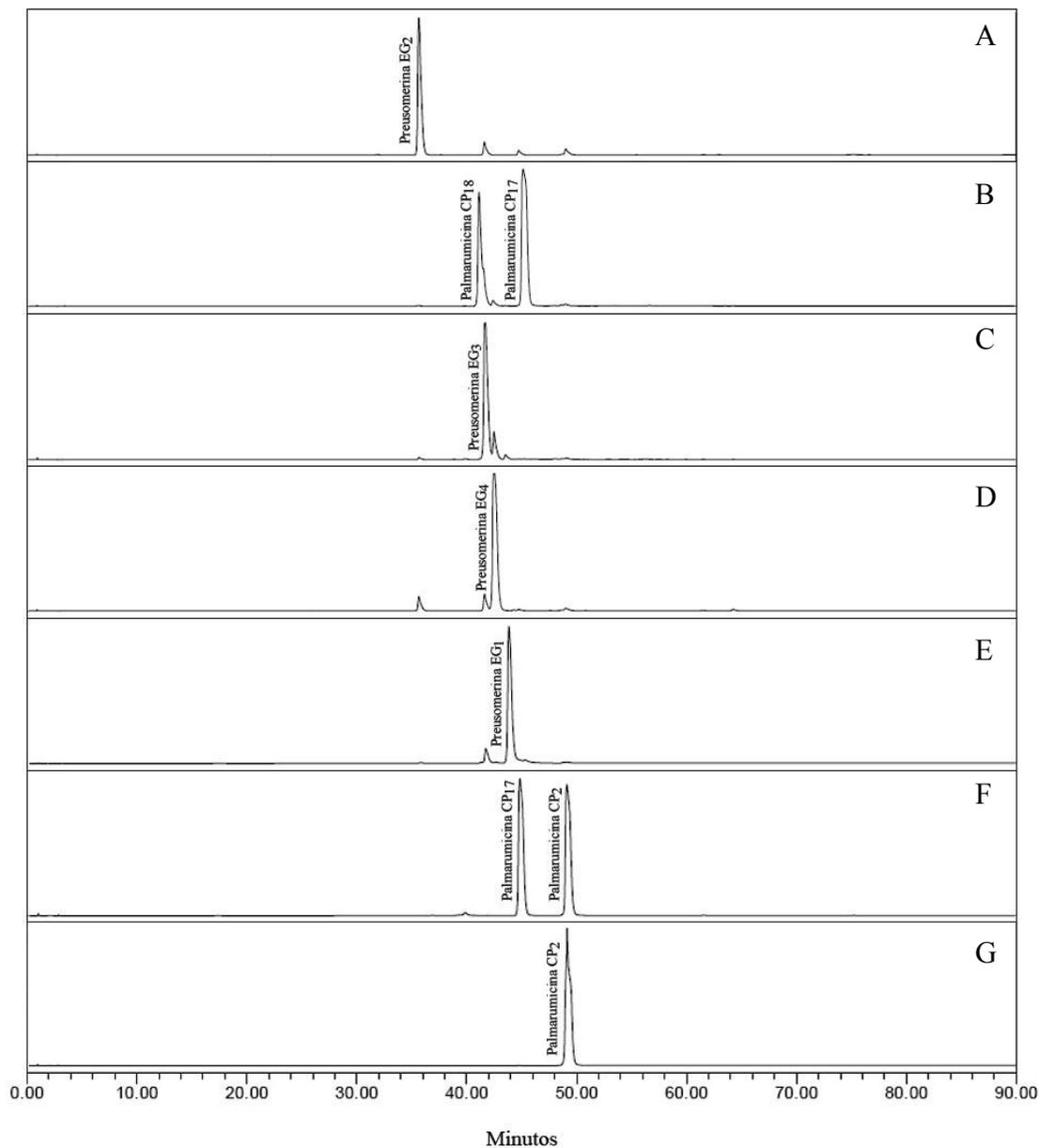
A. muestra de la preusomerina EG<sub>2</sub>; B. muestra de las palmarumicinas CP<sub>17</sub> y CP<sub>18</sub>; C. muestra de la preusomerina EG<sub>3</sub>; D. muestra de la preusomerina EG<sub>4</sub>; E. muestra de la preusomerina EG<sub>1</sub>; F. muestra de las palmarumicinas CP<sub>17</sub> y CP<sub>2</sub>; G. muestra de la palmarumicina CP<sub>2</sub>.

**Figura 15.** Cromatogramas de las muestras conocidas de los bisnaftoespirocetales de *Edenia gomezpompae*, analizadas bajo las condiciones determinadas para los extractos de *G. mangiferae*.



A. muestra de la preusomerina EG<sub>2</sub>; B. muestra de las palmarumicinas CP<sub>17</sub> y CP<sub>18</sub>; C. muestra de la preusomerina EG<sub>3</sub>; D. muestra de la preusomerina EG<sub>4</sub>; E. muestra de la preusomerina EG<sub>1</sub>; F. muestra de las palmarumicinas CP<sub>17</sub> y CP<sub>2</sub>; G. muestra de la palmarumicina CP<sub>2</sub>.

**Figura 16.** Cromatogramas de las muestras conocidas de los Bisnaftoespirocetales de *Edenia gomezpompae*, analizadas bajo las condiciones determinadas para los extractos de *P. capsici*.

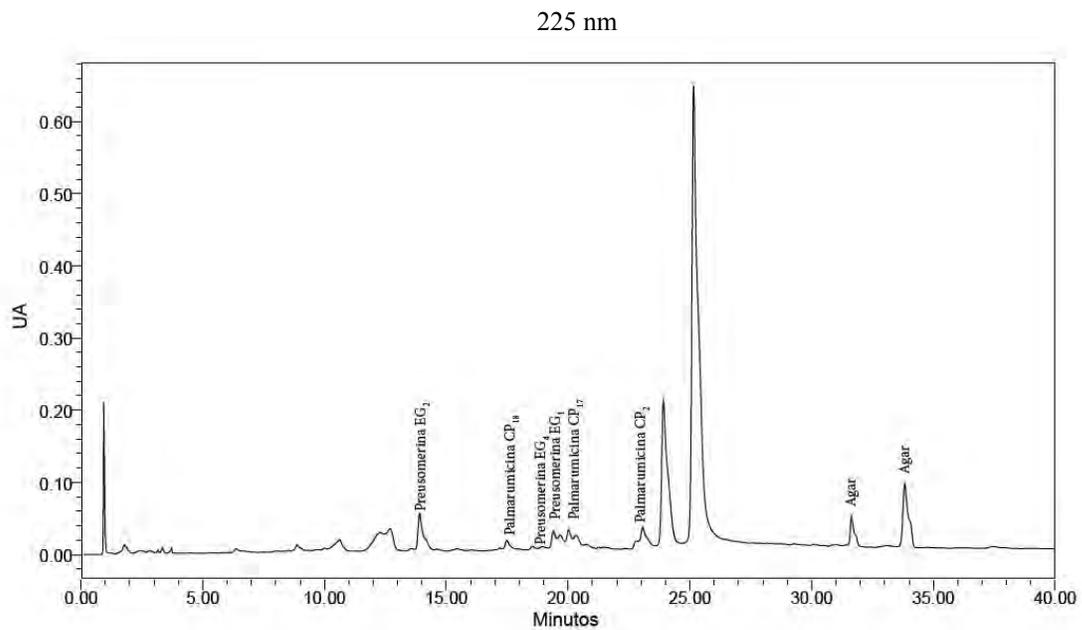
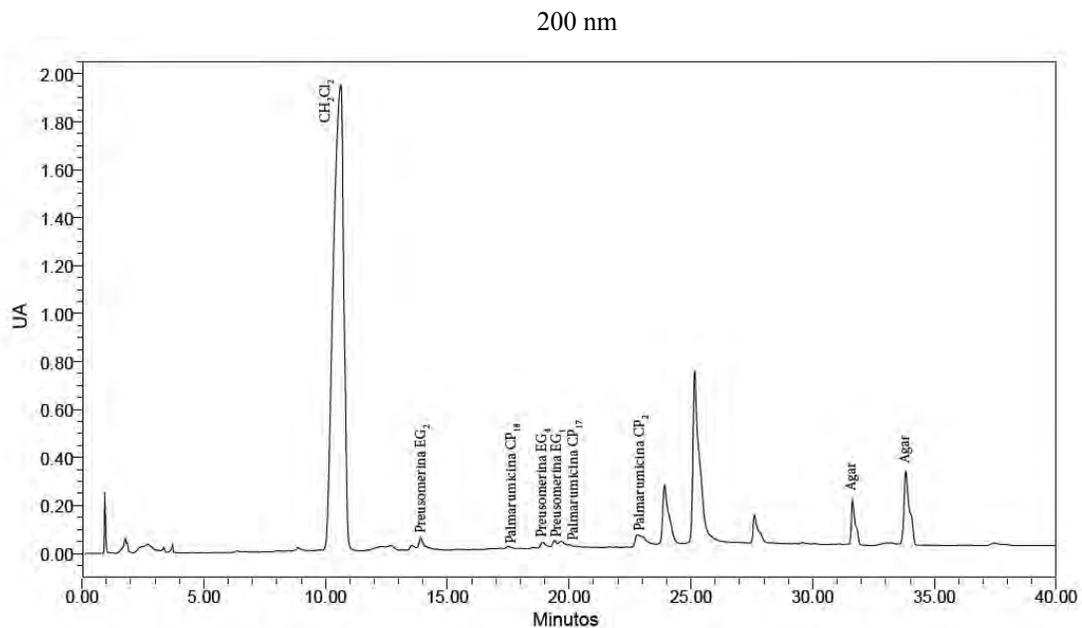


A. muestra de la preusomerina EG<sub>2</sub>; B. muestra de las palmarumicinas CP<sub>17</sub> y CP<sub>18</sub>; C. muestra de la preusomerina EG<sub>3</sub>; D. muestra de la preusomerina EG<sub>4</sub>; E. muestra de la preusomerina EG<sub>1</sub>; F. muestra de las palmarumicinas CP<sub>17</sub> y CP<sub>2</sub>; G. muestra de la palmarumicina CP<sub>2</sub>.

**Cuadro 13.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto del control de *E. gomezpompae* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. gmz G)

E. gmz G											
200 nm						225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.94	880934	0.92	18.53	51762	0.05	0.94	721646	2.80	16.03	18194	0.07
1.78	805320	0.84	18.92	410327	0.43	1.78	132524	0.51	16.84	7258	0.03
2.45	387861	0.40	19.40	364045	0.38	1.86	81237	0.32	17.20	48612	0.19
2.70	989991	1.03	19.67	490469	0.51	2.35	33607	0.13	17.49	204899	0.80
3.36	214218	0.22	20.01	163540	0.17	2.44	29236	0.11	17.92	35404	0.14
3.71	194297	0.20	20.31	64283	0.07	2.52	39582	0.15	18.26	5650	0.02
6.37	73021	0.08	22.80	1548011	1.62	2.80	41484	0.16	18.54	71534	0.28
8.02	69984	0.07	23.92	4620578	4.82	2.93	19451	0.08	18.97	90953	0.35
8.87	201936	0.21	25.16	14264097	14.89	3.16	31655	0.12	19.40	320480	1.25
10.62	58162431	60.71	27.62	1714260	1.79	3.35	53923	0.21	19.68	329324	1.28
12.29	473635	0.49	29.58	101634	0.11	3.71	36524	0.14	20.03	7372021	1.45
12.69	411237	0.43	30.06	42275	0.04	4.48	6304	0.02	20.33	337636	1.31
13.55	274204	0.29	31.07	41698	0.04	5.32	6407	0.02	20.77	40548	0.55
13.91	854631	0.89	31.64	2190259	2.29	6.37	68697	0.27	21.26	28450	0.11
14.58	56788	0.06	33.12	388689	0.41	6.70	19813	0.08	21.47	47891	0.19
17.19	63642	0.07	33.83	4913342	5.13	6.88	5658	0.02	22.32	11151	0.04
17.49	161057	0.17	37.45	161722	0.17	8.00	17260	0.07	22.81	102579	0.40
						8.09	15707	0.06	23.07	558514	2.17
						8.35	8076	0.03	23.92	3626902	14.09
						8.50	25545	0.10	25.16	12526136	48.68
						8.87	176646	0.69	29.27	13998	0.05
						9.29	38739	0.15	30.07	14493	0.06
						9.63	23132	0.09	30.22	9068	0.04
						9.70	34298	0.13	30.51	6021	0.02
						9.99	63433	0.25	30.92	22241	0.09
						10.62	446847	1.74	31.06	25440	0.10
						11.15	15986	0.06	31.42	23811	0.09
						12.29	784551	3.05	31.64	502649	1.95
						12.69	698192	2.71	33.08	6408	0.30
						13.54	53046	0.21	33.83	1426652	5.54
						13.91	835566	3.25	34.78	13667	0.05
						14.62	41401	0.16	37.45	41681	0.16
						15.44	67548	0.26			

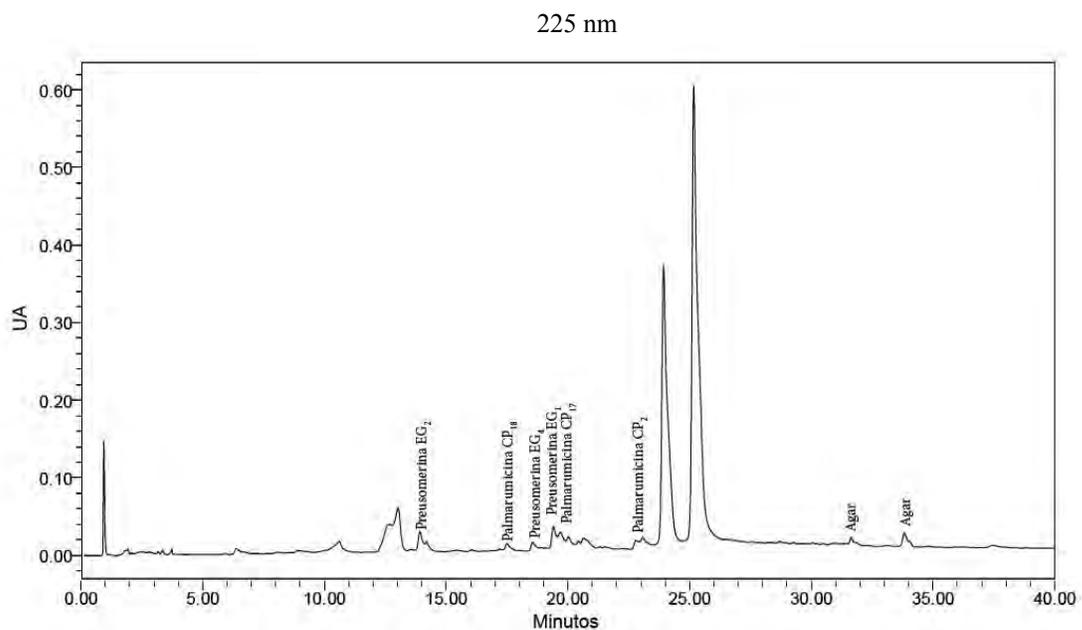
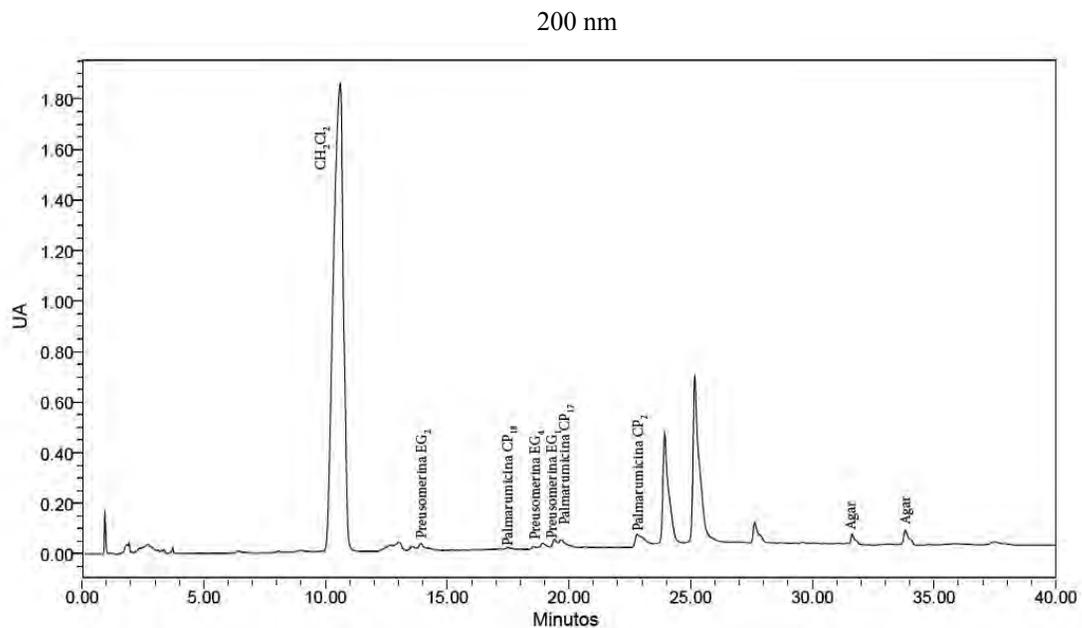
**Figura 17.** Cromatogramas del extracto del control de *E. gomezpompae* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. gmz G)



**Cuadro 14.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de *E. gomezpompa* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. gmz NI G)

200 nm						225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.94	642666	0.76	17.21	69466	0.08	0.94	506732	2.04	19.41	376957	1.52
1.93	543060	0.64	17.50	126001	0.15	1.86	64872	0.26	19.69	381878	1.54
1.97	68137	0.08	18.56	114372	0.14	1.93	40062	0.16	20.03	260056	1.05
2.71	1415934	1.68	18.93	369001	0.44	2.05	16110	0.06	20.44	134950	0.54
3.36	147115	0.17	19.41	410701	0.49	2.15	13173	0.05	20.65	336606	1.36
3.40	24013	0.03	19.69	623473	0.74	2.33	30151	0.12	21.30	34419	0.14
3.73	126548	0.15	22.81	1385726	1.64	2.44	28167	0.11	21.52	49680	0.20
6.39	89195	0.11	23.94	7538808	8.94	2.56	47920	0.19	22.24	5887	0.02
8.06	70746	0.08	25.17	12081519	14.33	2.80	46789	0.19	22.81	135582	0.55
8.91	178673	0.21	27.64	1171438	1.39	2.93	22580	0.09	23.07	289367	1.17
10.60	53217779	63.10	29.59	82798	0.10	3.17	33016	0.13	23.94	6189910	24.94
12.67	474262	0.56	31.64	441926	0.52	3.36	44120	0.18	25.17	11032836	44.45
13.03	685141	0.81	33.08	70357	0.08	3.73	32284	0.13	26.50	109159	0.44
13.57	254152	0.30	33.83	858676	1.02	3.85	9197	0.04	26.76	114307	0.46
13.92	421436	0.50	35.86	239607	0.28	6.39	96676	0.39	27.08	58332	0.24
14.19	194333	0.23	37.45	197183	0.23	6.71	25454	0.10	27.59	39214	0.16
						8.06	15276	0.06	27.91	9494	0.04
						8.52	4875	0.02	28.70	24106	0.10
						8.91	62687	0.25	28.93	6419	0.03
						9.27	20968	0.08	29.27	13274	0.05
						10.04	46237	0.19	29.56	6948	0.03
						10.61	364709	1.47	29.81	9572	0.04
						12.66	765646	3.08	30.06	17740	0.07
						13.03	1100502	4.43	30.23	9126	0.04
						13.55	52224	0.21	30.50	12053	0.05
						13.92	331949	1.34	30.93	28458	0.11
						14.19	170612	0.69	31.05	32100	0.13
						15.45	50817	0.20	31.42	38895	0.16
						16.05	26943	0.11	31.63	100295	0.40
						16.86	9226	0.04	31.81	48542	0.20
						17.21	42250	0.17	32.33	14701	0.06
						17.50	149989	0.60	33.07	29033	0.12
						17.93	14949	0.06	33.82	264123	1.06
						18.56	156762	0.63	34.78	22965	0.09
						18.89	33422	0.13	35.99	7644	0.03
						19.08	46303	0.19	37.45	50617	0.20

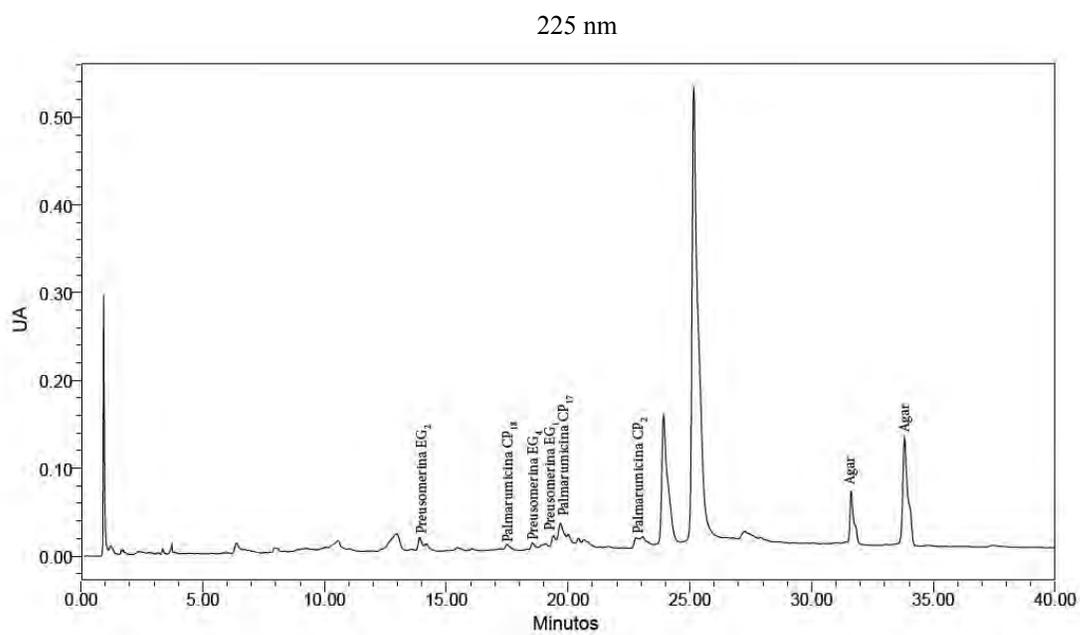
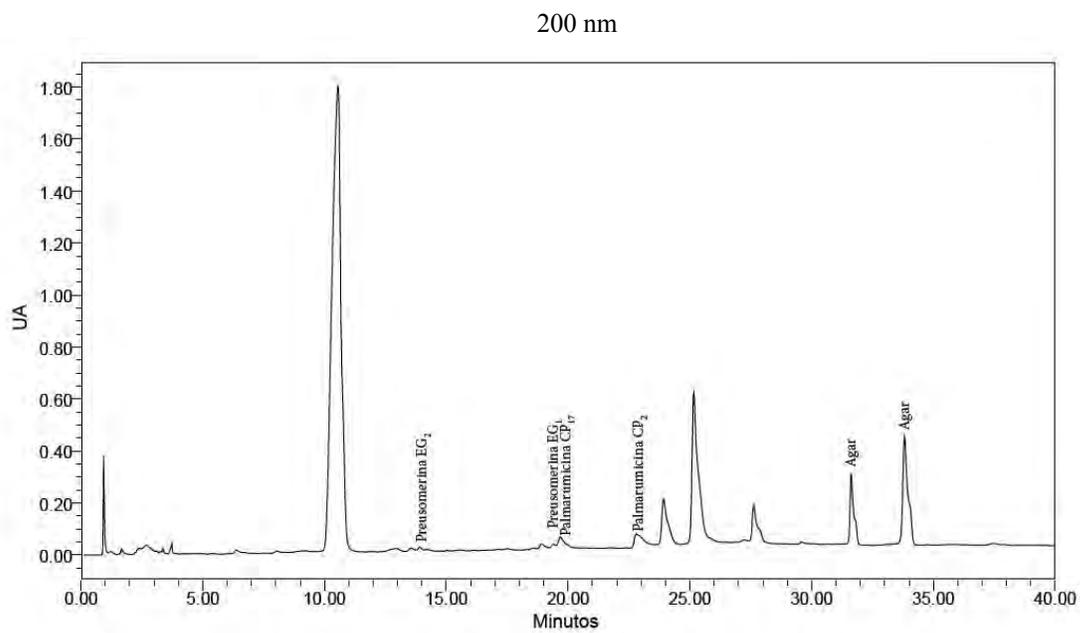
**Figura 18.** Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de *E. goezpompae* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. gmz NI G)



**Cuadro 15.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción de *E. gomezpompae* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. gmz I G)

200 nm						225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.94	1341750	1.66	15.51	84617	0.10	0.94	1040885	4.70	15.46	75188	0.34
1.23	164772	0.20	17.12	61259	0.08	1.23	151540	0.68	16.05	27465	0.12
1.67	229537	0.28	17.49	87124	0.11	1.67	37782	0.17	16.84	8472	0.04
2.37	333764	0.41	18.55	71723	0.09	1.73	27057	0.12	17.20	25194	0.11
2.69	972955	1.21	18.92	330660	0.41	1.81	39086	0.18	17.49	97451	0.44
3.36	196654	0.24	19.40	183142	0.23	2.35	43618	0.20	18.29	10551	0.05
3.72	269707	0.33	19.69	835749	1.04	2.43	29803	0.13	18.55	104540	0.47
6.38	180564	0.22	22.80	1452490	1.80	2.53	26926	0.12	18.91	42849	0.19
6.71	34098	0.04	23.92	3200523	3.96	2.79	30269	0.14	19.06	93143	0.42
8.04	96926	0.12	25.17	10565531	13.09	2.91	16899	0.08	19.40	184401	0.83
9.09	92148	0.11	27.24	184061	0.23	3.16	17457	0.08	19.69	509953	2.30
9.25	54292	0.07	27.62	2258989	2.80	3.36	40842	0.18	20.01	235577	1.06
10.55	47066541	58.29	29.59	132554	0.16	3.72	66206	0.30	20.42	146087	0.66
12.96	354812	0.44	31.63	3032165	3.76	3.84	25545	0.12	20.65	215916	0.97
13.56	192131	0.24	33.82	6281432	7.78	4.19	9510	0.04	21.28	16637	0.08
13.91	198591	0.25	37.46	110718	0.14	4.44	15802	0.07	21.53	11245	0.05
14.20	90129	0.11				4.76	6521	0.03	21.68	19833	0.09
						5.34	5464	0.02	22.24	4429	0.02
						5.86	21312	0.10	22.80	163240	0.74
						6.38	166381	0.75	23.06	261761	1.18
						6.71	55069	0.25	23.92	2682675	12.11
						6.91	65361	0.29	25.17	9807610	44.26
						7.58	11495	0.05	26.45	116594	0.53
						7.80	5627	0.03	26.75	126333	0.57
						7.96	102154	0.46	27.26	462635	2.09
						8.36	30297	0.14	27.92	110592	0.50
						8.70	15967	0.07	29.28	7095	0.03
						8.88	41882	0.19	29.81	4787	0.02
						9.26	174616	0.79	30.04	12635	0.06
						10.04	139924	0.63	30.49	7301	0.03
						10.55	357155	1.61	31.05	40981	0.18
						11.00	83920	0.38	31.41	33408	0.15
						11.74	11697	0.05	31.63	698475	3.15
						11.80	6684	0.03	33.07	14359	0.06
						12.02	11281	0.05	33.30	7389	0.03
						12.96	620849	2.80	33.53	23844	0.11
						13.60	38077	0.17	33.82	1819271	8.21
						13.91	185046	0.84	34.76	14812	0.07
						14.18	106699	0.48	37.46	28231	0.13
						15.05	5199	0.02			

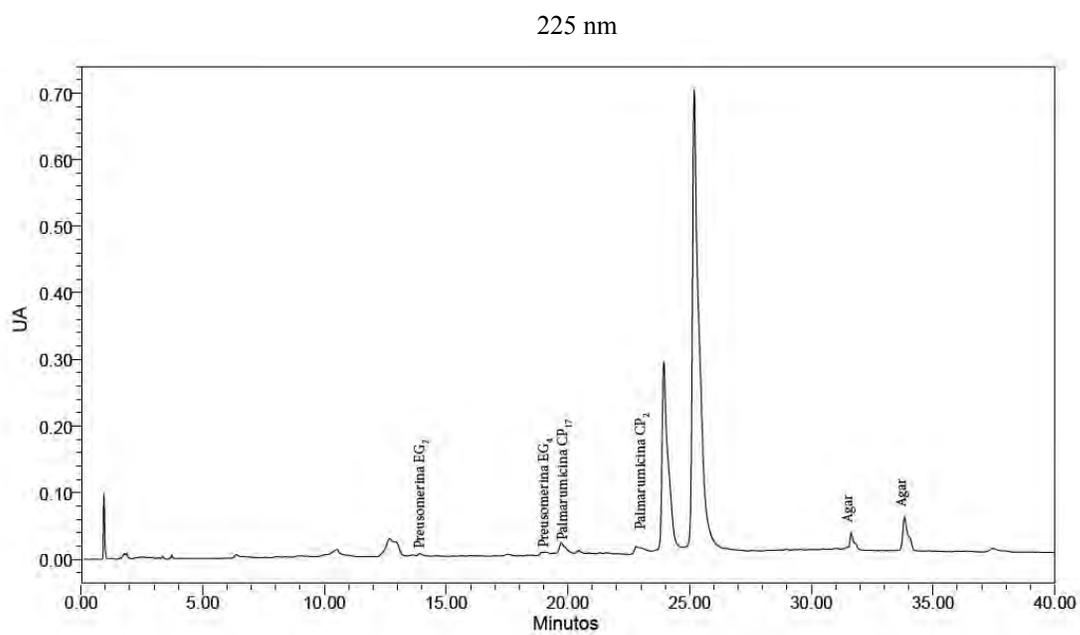
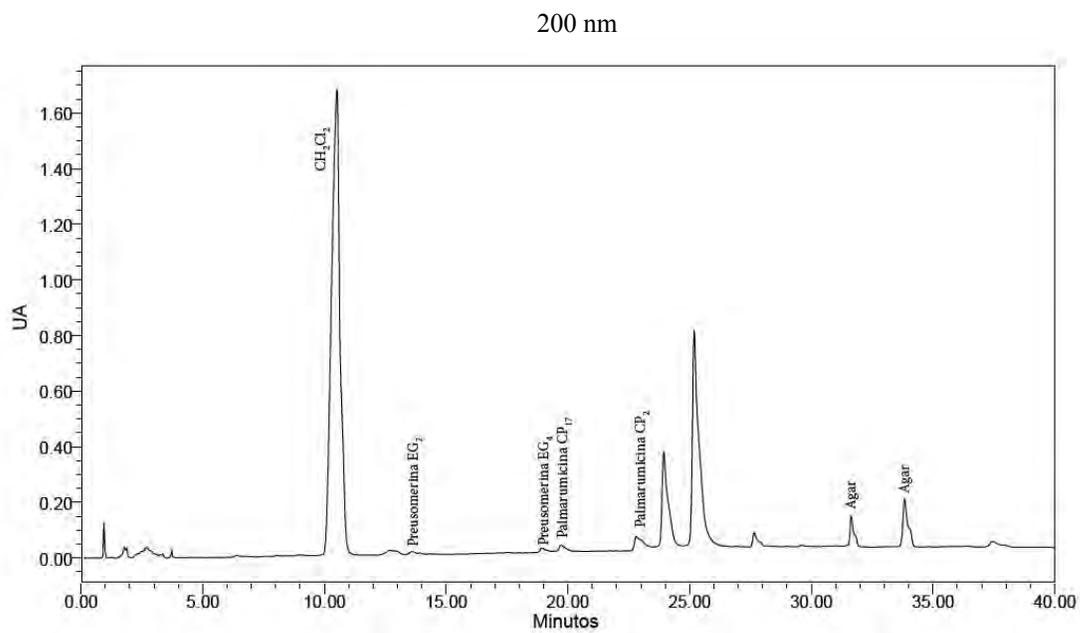
**Figura 19.** Cromatogramas del extracto de la zona de interacción de *E. gomezpompae* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. gmz I G)



**Cuadro 16.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de *E. amarilla* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. am NI G)

E. am NI G											
200 nm			225 nm								
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.95	445084	0.61	17.98	268872	0.37	0.95	337431	1.42	18.31	8419	0.04
1.79	484511	0.67	18.94	29468	0.04	1.26	15261	0.06	18.93	38946	0.16
1.93	33190	0.05	19.43	451072	0.62	1.79	76377	0.32	19.09	72742	0.31
2.47	1327735	1.83	19.72	1365393	1.88	1.88	47390	0.20	19.43	25167	0.11
2.71	141228	0.19	22.82	6372239	8.77	2.33	29313	0.12	19.73	374545	1.58
3.36	17669	0.02	23.94	15137905	20.85	2.45	26589	0.11	20.45	81954	0.35
3.40	115824	0.16	25.19	717421	0.99	2.58	30090	0.13	20.84	14494	0.06
6.39	77196	0.11	27.66	45858	0.06	2.80	26705	0.11	21.01	7374	0.03
8.05	32308	0.04	29.60	55065	0.08	2.93	22215	0.09	21.30	8613	0.04
10.51	41051053	56.53	31.07	1292983	1.78	3.17	16648	0.07	22.82	324574	1.37
11.36	107552	0.15	33.83	2512799	3.46	3.36	24258	0.10	23.94	5192403	21.90
12.68	164526	0.23	37.45	309044	0.43	3.73	25422	0.11	25.19	13760129	58.03
13.59	64456	0.09				3.80	9901	0.04	27.54	9840	0.04
						6.39	63249	0.27	27.62	3835	0.02
						6.72	20552	0.09	28.74	8910	0.04
						6.90	5697	0.02	28.99	18550	0.08
						8.05	15965	0.07	29.33	13475	0.06
						8.89	13258	0.06	29.53	18636	0.08
						9.06	25445	0.11	29.87	9615	0.04
						9.31	17593	0.07	30.05	13907	0.06
						10.05	56751	0.24	30.24	10414	0.04
						10.51	282191	1.19	30.50	30688	0.13
						10.95	40241	0.17	30.73	17550	0.07
						12.68	897150	3.78	30.99	59345	0.25
						13.66	38725	0.16	31.64	389354	1.64
						13.92	69233	0.29	33.83	775021	3.27
						14.60	12641	0.05	34.82	9109	0.04
						15.62	7475	0.03	35.99	11266	0.05
						16.03	17957	0.08	36.40	15255	0.06
						17.52	38008	0.16	37.45	79201	0.33

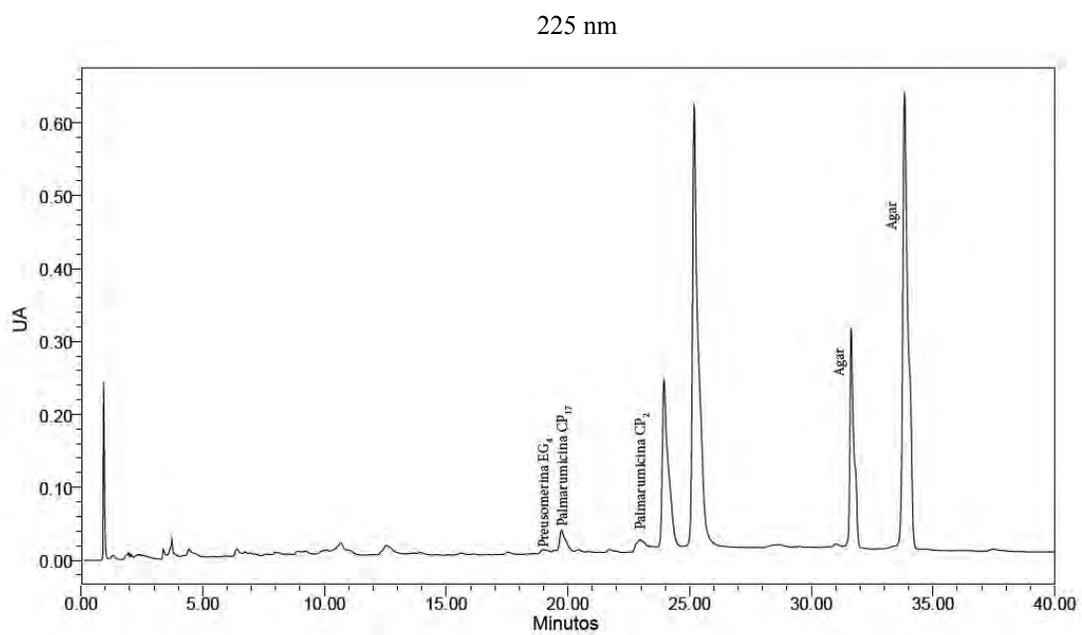
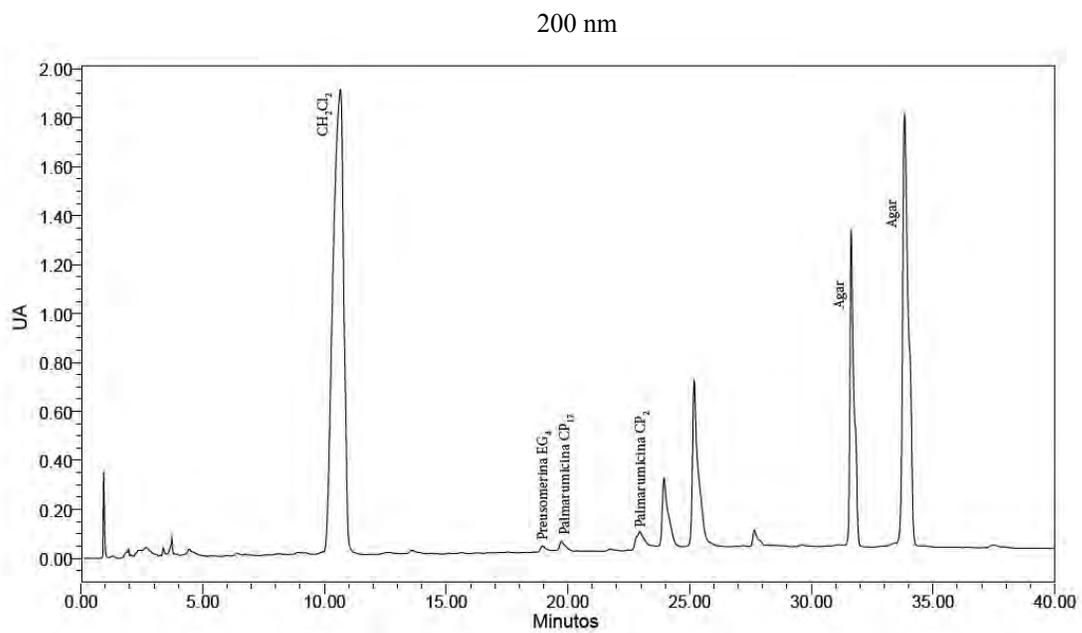
**Figura 20.** Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de *E. amarilla* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. am NI G)



**Cuadro 17.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción de *E. amarilla* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. am I G)

E. am I G											
200 nm						225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.94	1169422	0.88	13.60	221466	0.17	0.94	807822	2.36	14.62	11878	0.03
1.32	99649	0.08	13.91	51281	0.04	1.32	86664	0.25	15.61	46724	0.14
1.95	407237	0.31	15.07	50040	0.04	1.88	47228	0.14	16.12	18204	0.05
2.10	29519	0.02	15.63	70762	0.05	1.95	51765	0.15	16.74	5661	0.02
2.46	482769	0.36	18.97	446179	0.34	2.05	46131	0.13	17.14	4686	0.01
2.70	1052065	0.79	19.43	64681	0.05	2.34	84216	0.25	17.54	55259	0.16
3.28	64306	0.05	19.74	744232	0.56	2.45	35786	0.10	18.33	6301	0.02
3.38	273021	0.21	21.73	139866	0.11	2.59	66222	0.19	18.58	6620	0.02
3.73	689950	0.52	22.95	2083517	1.57	2.77	41338	0.12	18.99	114808	0.34
3.97	60539	0.05	23.95	5233358	3.95	3.39	94786	0.28	19.45	41540	0.12
4.44	844347	0.64	25.19	11666268	8.80	3.73	299941	0.88	19.74	592331	1.73
5.33	32041	0.02	27.22	36516	0.03	4.21	43156	0.13	20.44	55825	0.16
6.01	42944	0.03	27.66	925623	0.70	4.44	314592	0.92	20.78	3813	0.01
6.40	187120	0.14	29.60	96692	0.07	5.34	18471	0.05	20.85	6364	0.02
6.75	125143	0.09	31.17	162089	0.12	5.48	37061	0.11	21.71	76990	0.22
8.15	51371	0.04	31.64	15053306	11.36	5.97	57178	0.17	22.96	478776	1.40
8.90	101804	0.08	32.93	53812	0.04	6.13	8057	0.02	23.49	66252	0.19
9.07	72181	0.05	33.83	30394743	22.94	6.40	179724	0.52	23.95	4178961	12.21
9.23	98370	0.07	34.70	121064	0.09	6.75	91312	0.27	25.19	10293493	30.07
10.66	58678470	44.28	37.47	190326	0.14	6.93	136680	0.40	26.38	15689	0.05
12.56	154547	0.12				7.59	87193	0.25	27.62	7156	0.02
						7.99	87170	0.25	28.49	68379	0.20
						8.14	55238	0.16	28.70	98044	0.29
						8.43	44380	0.13	29.37	13264	0.04
						8.62	34006	0.10	29.53	16982	0.05
						8.91	90931	0.27	30.57	7152	0.02
						9.08	58166	0.17	30.72	17236	0.05
						9.24	131742	0.38	30.99	90937	0.27
						9.97	111002	0.32	31.64	3500150	10.22
						10.07	97882	0.29	32.88	8784	0.03
						10.68	472139	1.38	33.02	6332	0.02
						11.01	122891	0.36	33.45	73207	0.21
						12.05	7217	0.02	33.83	9666848	28.24
						12.55	401706	1.17	34.71	30912	0.09
						13.67	72264	0.21	37.47	47661	0.14
						13.94	79940	0.23			

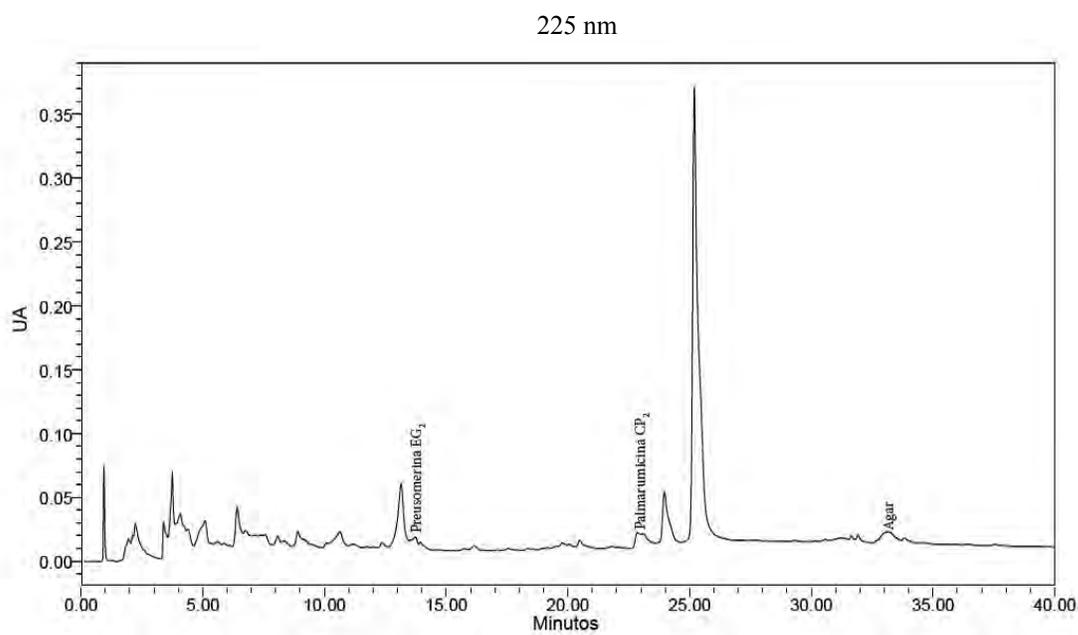
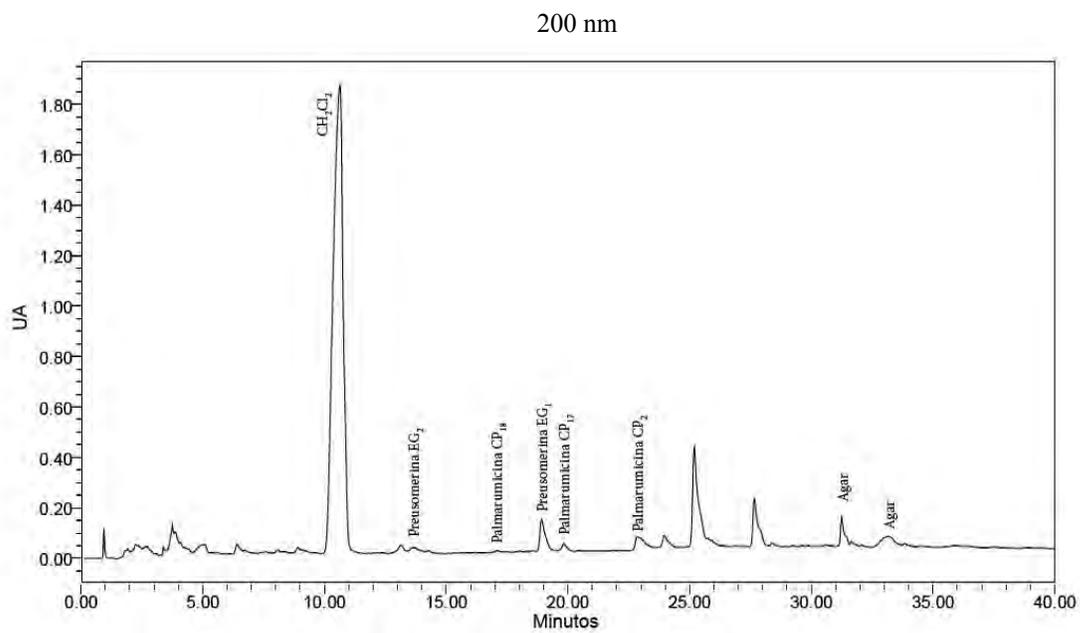
**Figura 21.** Cromatogramas del extracto de la zona de interacción de *E. amarilla* de los bioensayos con *G. mangiferae* (E. am I G)



**Cuadro 18.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de el control de *E. gomezpompae* de los bioensayos con *P. capsici* ( E. gmz P)

E. gmz P											
200 nm			200 nm			225 nm			225 nm		
TR (min)	área (μV s)	% área	TR (min)	área (μV s)	% área	TR (min)	área (μV s)	% área	TR (min)	área (μV s)	% área
0.95	469890	0.56	18.01	54547	0.06	0.95	268358	1.41	16.17	64635	0.34
1.84	263615	0.31	18.54	51174	0.06	1.30	7770	0.04	16.49	4202	0.02
1.92	336671	0.40	18.92	2097489	2.48	1.95	243201	1.28	17.13	5510	0.03
2.24	1160469	1.37	19.84	460105	0.54	2.13	127683	0.67	17.54	26909	0.14
2.72	1097132	1.30	22.85	1520188	1.80	2.24	582728	3.07	18.35	16609	0.09
3.30	44933	0.05	23.97	1024486	1.21	3.23	6009	0.03	18.57	8886	0.05
3.39	288338	0.34	24.60	37629	0.04	3.40	269843	1.42	18.96	9768	0.05
3.75	1254846	1.48	25.20	6734911	7.97	3.75	758310	3.99	19.16	22995	0.12
3.87	1324219	1.57	25.77	423528	0.50	4.08	734693	3.87	19.51	33588	0.18
4.13	719500	0.85	27.66	2840624	3.36	4.38	325124	1.71	19.77	86526	0.46
5.06	1207455	1.43	28.38	175951	0.21	5.10	904184	4.76	20.07	51014	0.27
5.56	122997	0.15	29.25	39328	0.05	5.60	225292	1.19	20.49	129276	0.68
6.42	530751	0.63	29.63	27040	0.03	5.88	187408	0.99	21.80	22377	0.12
6.76	256557	0.30	29.88	25328	0.03	6.13	82684	0.44	22.07	8378	0.04
7.61	185814	0.22	30.59	41325	0.05	6.42	631321	3.32	22.85	184795	0.97
8.08	218547	0.26	31.25	1310614	1.55	6.77	373139	1.96	23.10	205893	1.08
8.32	165472	0.20	31.65	267289	0.32	7.13	265954	1.40	23.97	792529	4.17
8.91	625012	0.74	32.07	103810	0.12	7.37	198978	1.05	25.20	6192062	32.61
10.64	53404150	63.18	33.15	1678715	1.99	7.55	321450	1.69	29.30	12586	0.07
13.15	605003	0.72	33.84	250885	0.30	8.08	252138	1.33	30.10	4645	0.02
13.65	641986	0.76	34.49	115608	0.14	8.33	252911	1.33	30.26	5111	0.03
14.29	130675	0.15	35.87	106008	0.13	8.91	706340	3.72	30.59	31069	0.16
17.10	89801	0.11				10.09	116304	0.61	30.92	18089	0.10
						10.64	564822	2.97	31.25	108528	0.57
						11.18	213269	1.12	31.65	55363	0.29
						11.76	79515	0.42	31.92	81178	0.43
						12.02	77269	0.41	33.15	364760	1.92
						12.37	135868	0.72	33.84	84243	0.44
						13.15	1056182	5.56	34.52	26597	0.14
						13.73	208781	1.10	36.41	9701	0.05
						13.95	107607	0.57	37.53	15894	0.08
						15.75	22075	0.12			

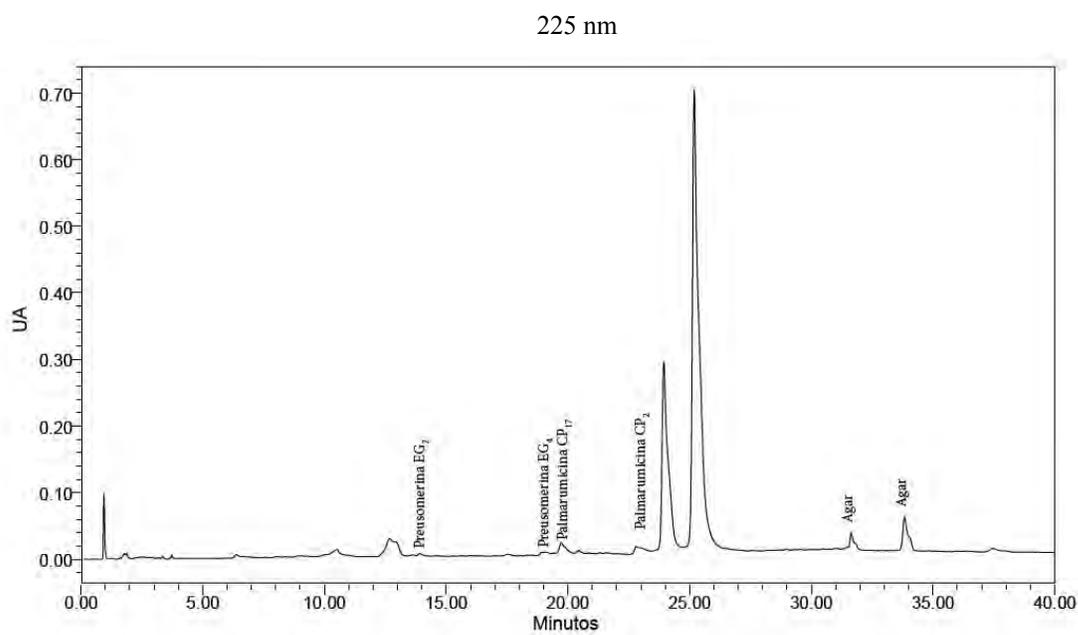
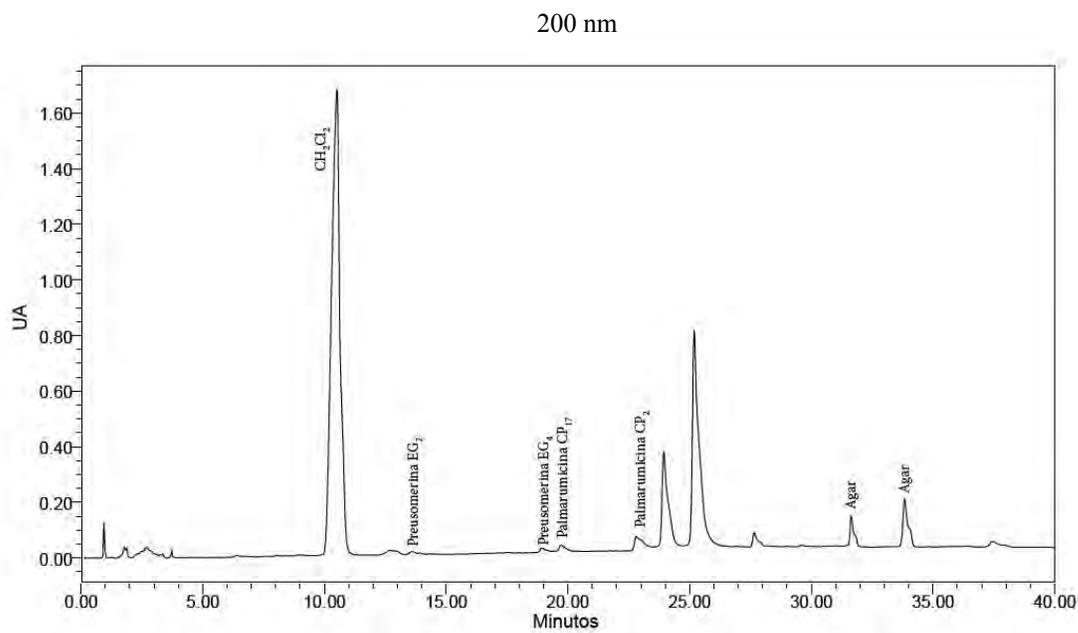
**Figura 22.** Cromatogramas del extracto de el control de *E. gomezpompae* de los bioensayos con *P. capsici* (*E. gmz P*)



**Cuadro 19.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de *E. gomezpompa* de los bioensayos con *P. capsici* (E. gmz NI P)

200 nm						225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.92	25866	0.03	21.76	470876	0.62	1.63	27770	0.18	18.73	51865	0.34
1.62	215057	0.28	22.84	1553289	2.06	1.70	21903	0.14	19.11	295096	1.92
2.30	174707	0.23	23.96	373010	0.49	1.77	33804	0.22	19.93	155586	1.01
2.71	1224141	1.62	25.18	4606634	6.10	2.29	50034	0.33	20.49	5222327	34.01
3.29	72937	0.10	25.89	736700	0.98	2.47	32155	0.21	21.42	12491	0.08
3.37	81815	0.11	26.35	223488	0.30	2.61	48432	0.32	21.76	286008	1.86
3.73	189521	0.25	26.94	251793	0.33	2.92	4978	0.03	22.84	281152	1.83
6.41	71797	0.10	27.22	97217	0.13	3.38	22889	0.15	23.40	28973	0.19
6.76	153397	0.20	27.64	8606386	11.39	3.74	59715	0.39	23.63	30982	0.20
8.08	60305	0.08	28.37	180136	0.24	3.83	27020	0.18	23.95	141160	0.92
8.90	128738	0.17	29.21	201891	0.27	4.21	8672	0.06	25.18	3683829	23.99
9.32	30085	0.04	29.60	116779	0.15	4.56	20468	0.13	27.06	9441	0.06
10.59	48274240	63.89	29.90	61633	0.08	6.41	50718	0.33	27.64	25995	0.17
13.11	1762474	2.33	31.26	831986	1.10	6.83	92739	0.60	27.83	12519	0.08
13.60	273202	0.36	31.66	148492	0.20	7.08	8365	0.05	28.21	8659	0.06
14.19	105809	0.14	32.06	50859	0.07	8.08	34504	0.22	28.49	11558	0.08
16.88	39870	0.05	33.14	506050	0.67	8.36	22196	0.14	29.19	201354	1.31
17.51	65399	0.09	33.85	76360	0.10	8.90	86818	0.57	29.98	20327	0.13
18.92	1207180	1.60	34.53	138971	0.18	9.32	99328	0.65	30.24	5579	0.04
19.82	874293	1.16	35.87	201844	0.27	10.11	27712	0.18	30.38	8566	0.06
20.49	1092112	1.45				10.59	272040	1.77	31.31	162093	1.06
						11.96	136248	0.89	31.65	36813	0.24
						13.11	2995585	19.51	31.93	178573	1.16
						13.95	6999	0.05	33.16	54884	0.36
						15.66	38110	0.25	33.25	30393	0.20
						16.14	36199	0.24	34.50	5398	0.04
						16.50	6208	0.04	34.58	14760	0.10
						17.53	25720	0.17	37.52	13692	0.09
						18.34	67712	0.44			

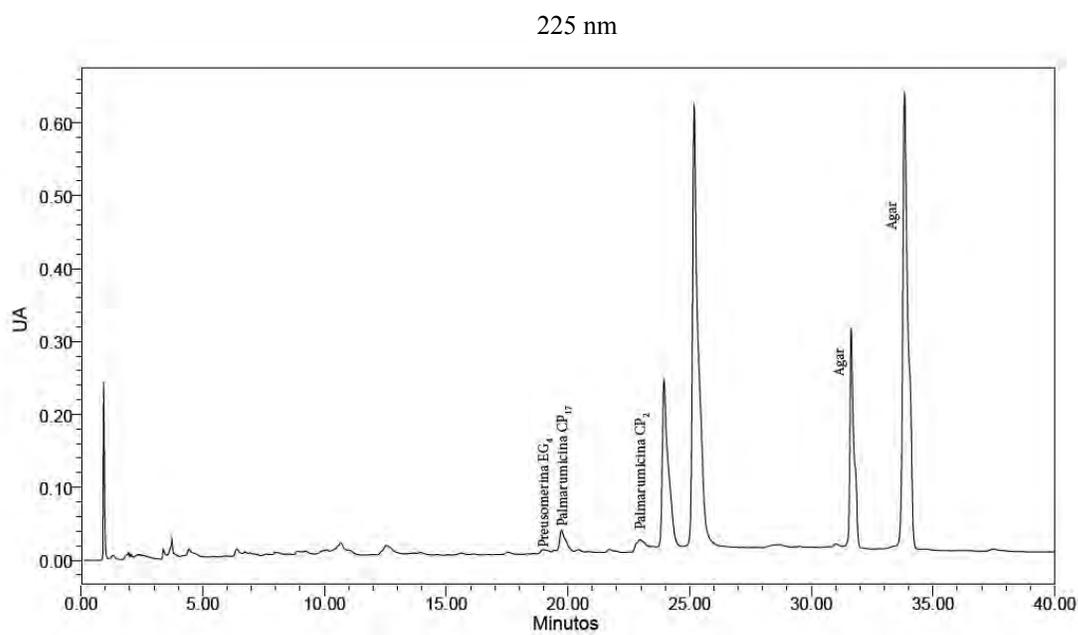
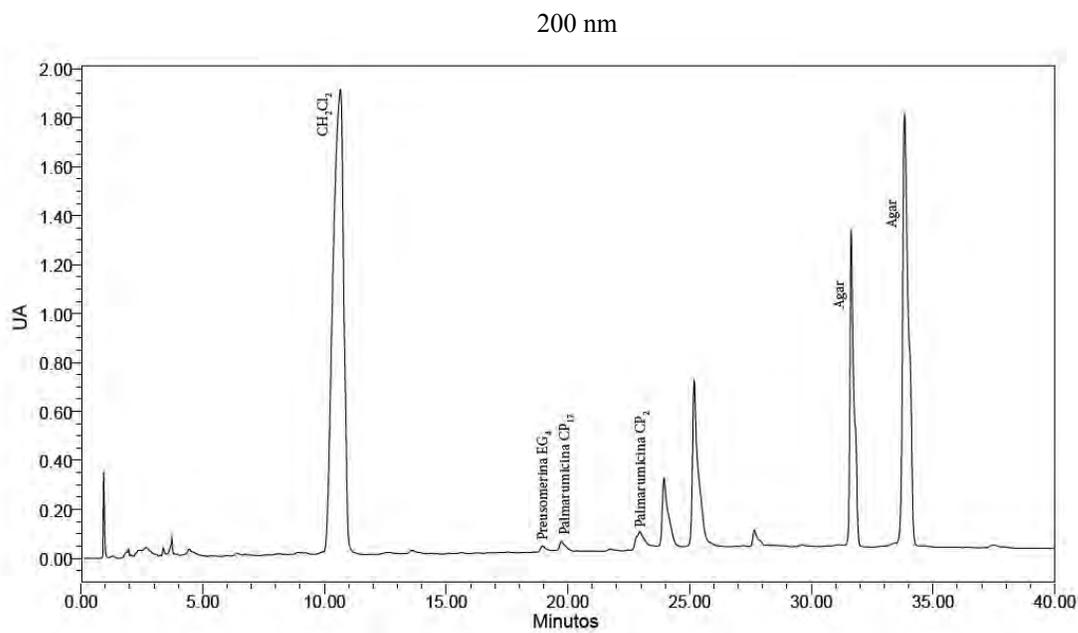
**Figura 23.** Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de *E. gomezpompae* de los bioensayos con *P. capsici* (E. gmz NI P)



**Cuadro 20.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción del bioensayo de antagonismo entre *E. gomezpompae* y *P. capsici* (E. y P. I) bajo las condiciones de análisis para *E. gomezpompae*

E. Y P. I											
200 nm						225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.97	95646	0.25	20.41	60322	0.16	0.97	29538	0.65	10.10	100955	2.22
1.71	315341	0.81	22.86	1381784	3.57	1.73	43646	0.96	10.43	129391	2.84
2.29	190530	0.49	23.58	141961	0.37	1.77	30415	0.67	11.05	147922	3.25
2.73	1310520	3.39	23.95	66618	0.17	1.88	32626	0.72	12.39	8877	0.20
3.30	74348	0.19	25.18	1168656	3.02	2.28	61793	1.36	12.82	172894	3.80
3.38	99478	0.26	25.57	1090655	2.82	2.48	35078	0.77	13.59	11957	0.26
3.75	182985	0.47	26.13	68634	0.18	2.59	69927	1.54	13.97	16254	0.36
4.22	53699	0.14	27.25	293313	0.76	2.93	9642	0.21	17.55	71775	1.58
4.47	45391	0.12	27.67	2013703	5.20	3.08	4256	0.09	18.01	91511	2.01
6.78	58590	0.15	28.47	34452	0.09	3.39	25080	0.55	18.61	66929	1.47
6.97	70549	0.18	29.62	65378	0.17	3.75	63639	1.40	19.13	15356	0.34
9.14	72512	0.19	29.97	86746	0.22	3.83	30002	0.66	19.45	13944	0.31
10.44	24858576	64.24	31.26	88865	0.23	4.22	33691	0.74	19.75	28807	0.63
12.83	84656	0.22	31.67	111431	0.29	4.46	31004	0.68	20.08	42531	0.94
13.61	49040	0.13	33.16	3607914	9.32	5.43	3706	0.08	20.44	198031	4.35
17.55	65729	0.17	34.73	31429	0.08	5.67	6689	0.15	22.86	133044	2.93
18.01	83779	0.22	35.92	131515	0.34	6.43	18227	0.40	23.12	354952	7.80
18.61	43003	0.11	36.47	79818	0.21	6.78	32873	0.72	23.97	66120	1.45
18.95	314240	0.81	36.47	79818	0.21	6.97	85255	1.87	24.90	5116	0.11
19.80	102918	0.27				7.45	6240	0.14	25.18	1236992	27.20
						8.22	7372	0.16	29.98	30567	0.67
						8.40	6089	0.13	31.67	15355	0.34
						8.94	18973	0.42	31.91	8913	0.20
						9.15	41480	0.91	33.16	798705	17.56
						9.32	46953	1.03	34.58	7015	0.15

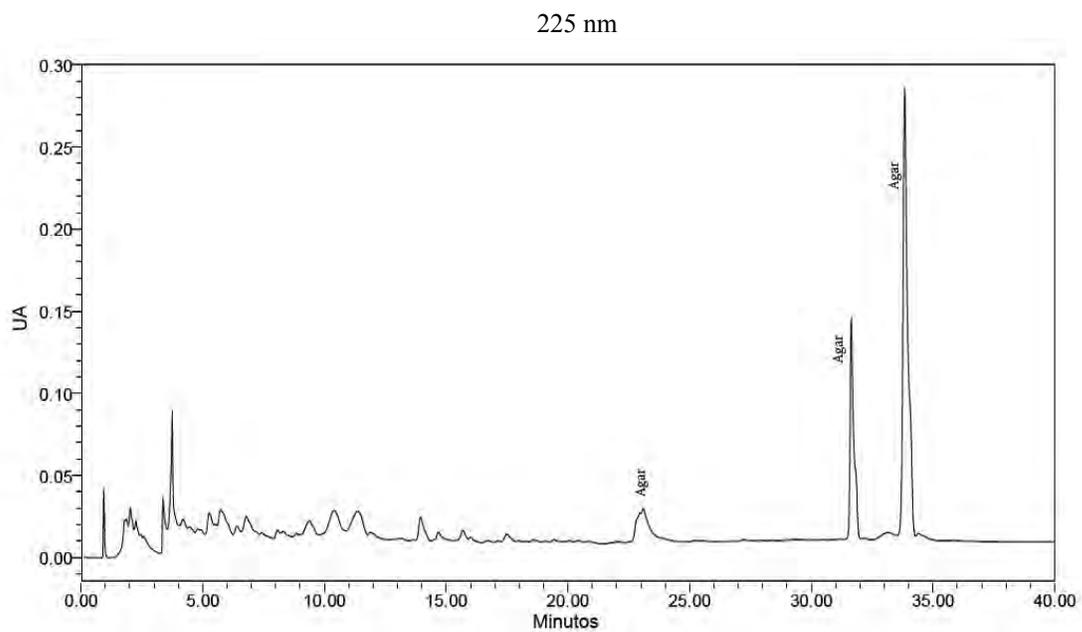
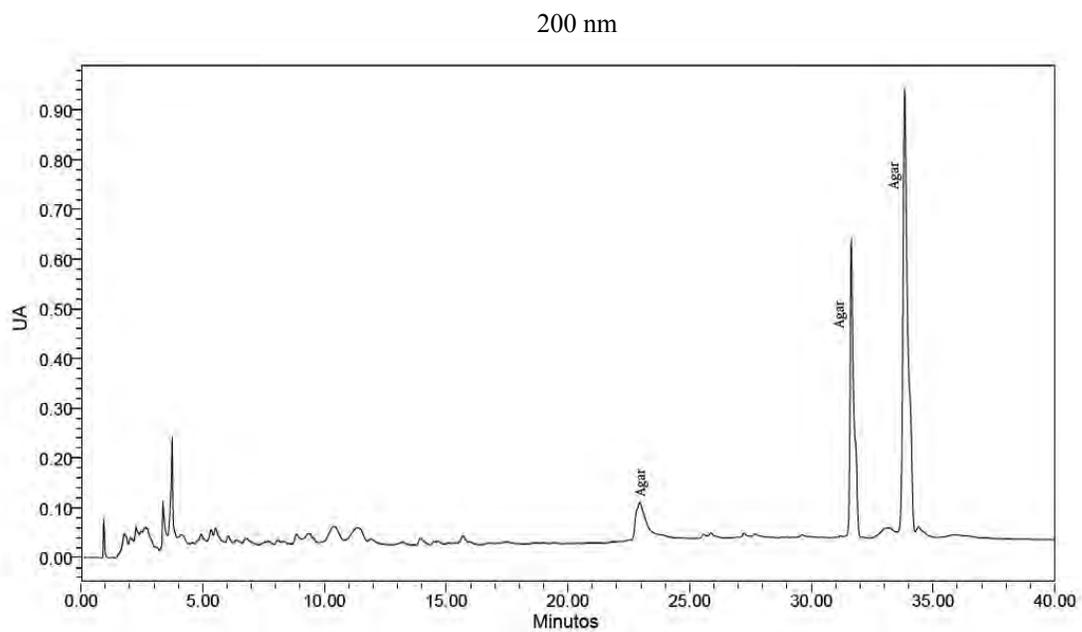
**Figura 24.** Cromatogramas del extracto de la zona de interacción del bioensayo de antagonismo entre *E. gomezpompae* y *P. capsici* (E. y P. I) bajo las condiciones de análisis para *E. gomezpompae*



**Cuadro 21.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del APD bajo las condiciones de análisis para *E. gomezpompae*

APD								
200 nm			225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.94	251887	0.60	10.40	1433511	3.41	0.94	129027	1.03
1.79	734105	1.75	11.36	1342731	3.20	1.86	312013	2.50
2.03	413739	0.99	11.91	226237	0.54	2.03	313821	2.52
2.27	660470	1.57	13.20	90812	0.22	2.26	518759	4.16
2.47	437217	1.04	13.95	191509	0.46	3.38	254870	2.04
2.65	1438878	3.43	14.51	54328	0.13	3.74	867479	6.96
3.37	932658	2.22	14.66	71114	0.17	4.20	332978	2.67
3.74	2012847	4.79	15.69	262992	0.63	4.46	220796	1.77
4.13	951150	2.27	17.49	98791	0.24	4.80	231131	1.85
4.56	281048	0.67	22.96	1998768	4.76	5.27	409162	3.28
4.94	833524	1.98	25.58	86399	0.21	5.74	516488	4.14
5.34	575289	1.37	25.88	154292	0.37	6.41	135638	1.09
5.53	942999	2.25	27.24	116550	0.28	6.80	329238	2.64
6.05	491731	1.17	27.68	101434	0.24	7.42	26065	0.21
6.39	451975	1.08	29.62	45537	0.11	8.08	45565	0.37
6.79	768672	1.83	31.20	32115	0.08	8.31	35552	0.29
7.55	259127	0.62	31.65	6445183	15.35	8.85	21210	0.17
7.70	282245	0.67	33.15	781511	1.86	9.39	251535	2.02
8.09	263370	0.63	33.84	12899165	30.72	10.40	531336	4.26
8.31	357062	0.85	34.40	497746	1.19			
8.86	464732	1.11	35.89	347013	0.83			
9.38	910239	2.17						

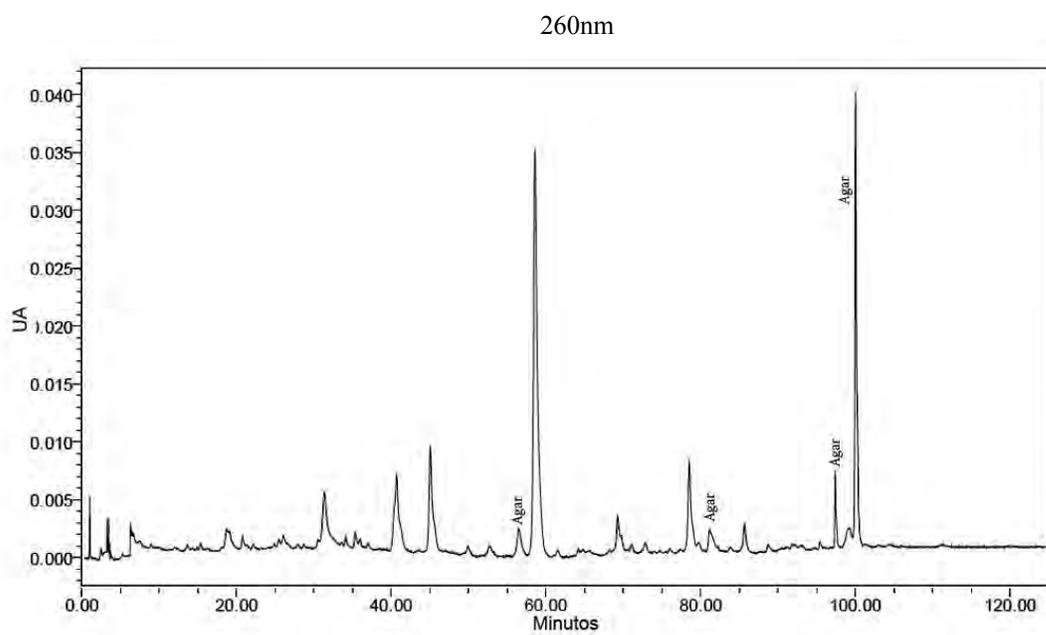
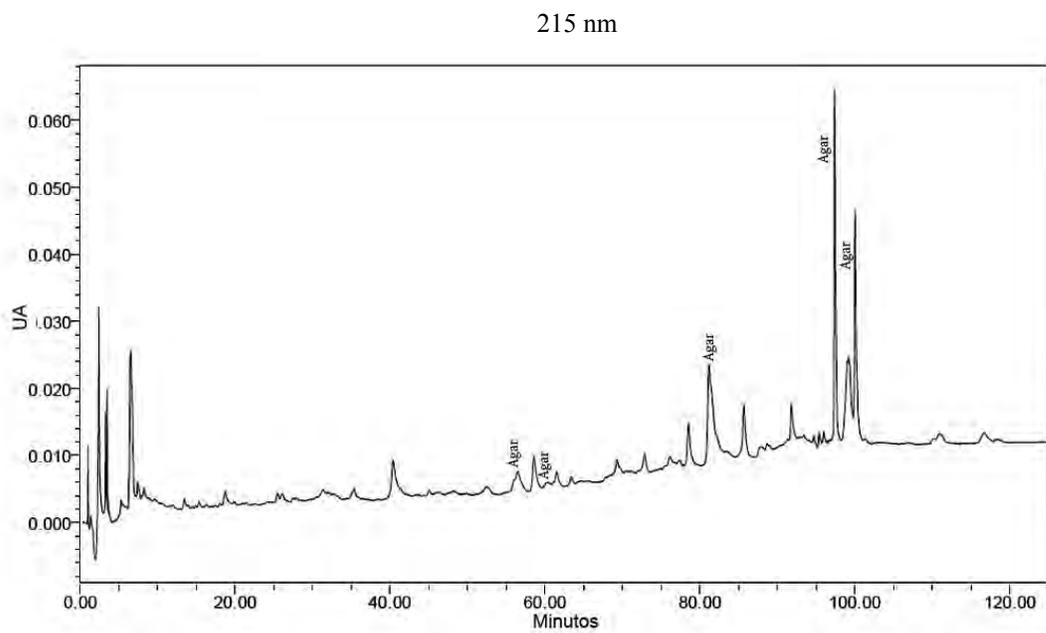
Figura 25. Cromatogramas del APD bajo las condiciones de análisis para *E. gomezpompae*



**Cuadro 22.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto del control de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. gomezpompae* (G. mang E)

G. mang E											
215 nm						260 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
1.03	168687	2.70	56.05	27488	0.44	0.26	13977	0.32	36.99	8565	0.20
1.38	87176	1.40	56.49	145610	2.33	1.03	36142	0.84	40.69	293891	6.80
1.59	44872	0.72	58.59	155352	2.49	1.71	3933	0.09	45.05	290134	6.72
2.41	597747	9.57	61.52	54358	0.87	2.51	16942	0.39	49.93	18066	0.42
3.29	151644	2.43	63.38	26164	0.42	3.00	18648	0.43	52.72	35952	0.83
3.48	99603	1.60	69.28	65284	1.05	3.47	32883	0.76	56.50	99249	2.30
3.62	34966	0.56	72.86	64191	1.03	3.62	5221	0.12	58.59	1279561	29.62
3.78	51119	0.82	76.11	29820	0.48	3.77	6941	0.16	61.54	14181	0.33
5.27	26174	0.42	77.39	15998	0.26	5.27	4623	0.11	64.15	11565	0.27
5.44	40936	0.66	78.53	162770	2.61	6.31	30984	0.72	64.80	14455	0.33
5.97	14609	0.23	81.17	654672	10.49	6.57	61748	1.43	65.61	10768	0.25
6.30	23955	0.38	82.18	74241	1.19	7.57	6222	0.14	68.23	7163	0.17
6.47	172793	2.77	85.67	207450	3.32	8.97	4782	0.11	69.28	80412	1.86
6.56	189844	3.04	87.70	39488	0.63	12.04	8506	0.20	69.73	25381	0.59
6.69	195789	3.14	88.66	9143	0.15	13.66	13359	0.31	71.09	13256	0.31
7.15	15434	0.25	91.80	101797	1.63	14.33	3809	0.09	72.87	20128	0.47
7.44	68753	1.10	93.19	1310	0.02	14.91	3357	0.08	74.76	4281	0.10
7.98	12747	0.20	93.44	5465	0.09	15.36	9799	0.23	76.01	6417	0.15
8.24	30272	0.48	94.09	1879	0.03	18.09	4187	0.10	77.44	7406	0.17
9.59	3741	0.06	94.71	19943	0.32	18.73	81162	1.88	78.53	245208	5.68
13.45	20447	0.33	95.39	30661	0.49	20.79	15713	0.36	79.67	29315	0.68
14.90	5148	0.08	95.98	29551	0.47	22.19	5456	0.13	81.16	89339	2.07
15.36	17443	0.28	96.33	2385	0.04	24.91	5439	0.13	83.83	8581	0.20
18.06	7249	0.12	96.55	3042	0.05	25.48	10843	0.25	85.67	65230	1.51
18.72	57944	0.93	96.86	1077	0.02	26.06	20924	0.48	88.74	17154	0.40
25.48	28771	0.46	97.40	639305	10.24	27.95	6121	0.14	91.80	5713	0.13
26.07	28959	0.46	99.03	248973	3.99	28.72	5867	0.14	92.16	6447	0.15
31.36	13637	0.22	99.19	144184	2.31	30.55	15127	0.35	93.17	4624	0.11
35.09	8480	0.14	99.32	201078	3.22	31.36	248610	5.76	95.38	10455	0.24
35.34	30031	0.48	100.03	581967	9.32	33.60	11214	0.26	97.40	82254	1.90
40.40	236042	3.78	101.46	1341	0.02	34.11	23540	0.54	99.20	79791	1.85
45.03	12118	0.19				35.35	27627	0.64	100.03	647934	15.00
						35.98	14765	0.34	101.27	8454	0.20

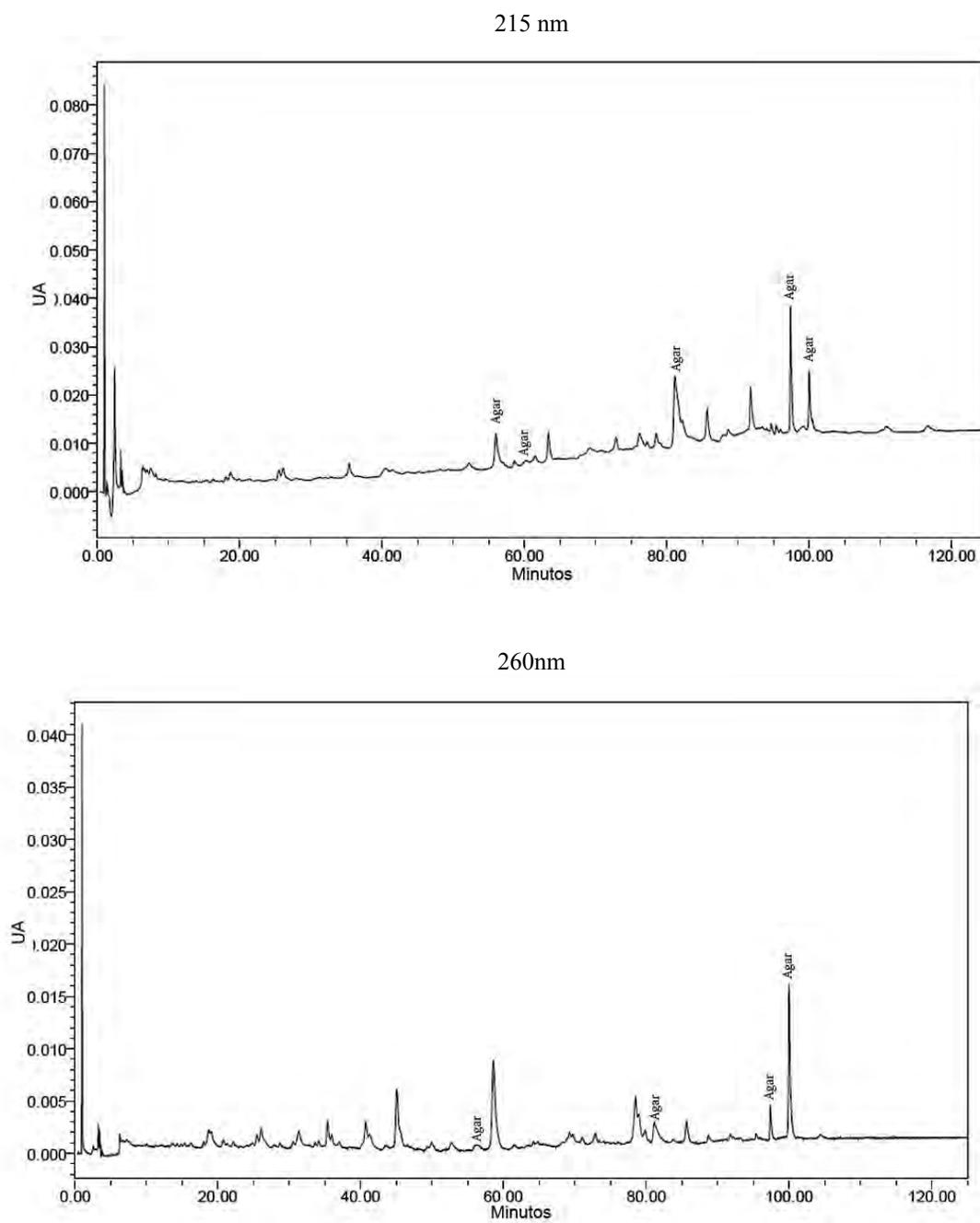
**Figura 26.** Cromatogramas del extracto del control de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. gomezpompae* (G. mang E)



**Cuadro 23.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. gomezpompa* (G. mang NI E)

215 nm						260 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.11	5744	0.11	60.13	10372	0.21	1.01	164264	7.18	36.99	13267	0.58
1.01	328639	6.50	61.53	38982	0.77	2.57	12059	0.53	40.73	78290	3.42
1.39	76994	1.52	63.39	131442	2.60	3.29	37794	1.65	41.26	47557	2.08
1.67	15808	0.31	67.78	9402	0.19	3.47	15216	0.66	43.53	10462	0.46
2.45	517792	10.24	68.95	11994	0.24	3.80	7052	0.31	45.07	169666	7.41
3.29	110864	2.19	69.24	14385	0.28	6.29	25567	1.12	49.38	7946	0.35
3.48	61524	1.22	72.88	74397	1.47	6.75	26621	1.16	49.94	25881	1.13
3.73	11642	0.23	75.54	12488	0.25	7.29	32744	1.43	52.79	17092	0.75
3.87	9700	0.19	76.19	131457	2.60	12.08	7216	0.32	56.25	22351	0.98
6.42	86666	1.71	77.25	28310	0.56	13.63	10228	0.45	58.60	295887	12.93
6.66	57573	1.14	78.52	51525	1.02	14.35	5455	0.24	61.51	7426	0.32
6.96	81713	1.62	81.16	620854	12.28	14.87	4759	0.21	64.20	8541	0.37
7.45	33494	0.66	82.19	123450	2.44	15.35	7707	0.34	64.78	8542	0.37
7.55	73796	1.46	85.67	169601	3.35	16.26	9905	0.43	68.21	5987	0.26
8.22	22758	0.45	87.93	37430	0.74	18.07	8376	0.37	69.29	36874	1.61
13.93	6642	0.13	88.64	54734	1.08	18.72	58301	2.55	69.73	18170	0.79
14.89	5558	0.11	90.25	4623	0.09	19.17	20288	0.89	71.04	10446	0.46
15.35	11082	0.22	91.03	22605	0.45	20.77	15638	0.68	72.86	21753	0.95
16.27	9825	0.19	91.39	26833	0.53	21.34	5361	0.23	78.51	119005	5.20
18.06	18876	0.37	91.78	259967	5.14	22.17	6727	0.29	78.97	75244	3.29
18.73	63548	1.26	92.89	26680	0.53	24.17	6802	0.30	79.89	38082	1.66
19.89	9339	0.18	93.18	20230	0.40	24.88	12708	0.56	81.15	68275	2.98
21.42	7946	0.16	93.41	48135	0.95	25.50	28778	1.26	83.82	4841	0.21
24.74	6559	0.13	94.07	29446	0.58	26.09	68471	2.99	85.66	50212	2.19
25.49	48172	0.95	94.67	39684	0.78	27.94	5088	0.22	88.70	14616	0.64
26.09	78034	1.54	95.37	30407	0.60	28.72	7128	0.31	91.78	5776	0.25
27.89	5194	0.10	95.97	16828	0.33	30.55	12767	0.56	95.37	11694	0.51
31.36	14627	0.29	97.39	362627	7.17	31.36	52199	2.28	96.01	7362	0.32
34.88	6585	0.13	99.00	23487	0.46	33.63	6732	0.29	97.39	48424	2.12
35.38	85493	1.69	99.19	25337	0.50	34.14	11195	0.49	100.02	260313	11.37
40.42	78557	1.55	100.02	197316	3.90	35.38	51788	2.26	104.40	6574	0.29
41.40	27562	0.55	100.48	32557	0.64	35.98	27151	1.19			
43.46	7088	0.14	110.10	4817	0.10						
45.07	6393	0.13	110.15	5319	0.11						
52.22	46813	0.93	110.84	55321	1.09						
55.99	199807	3.95	116.63	30135	0.60						
58.63	33769	0.67									

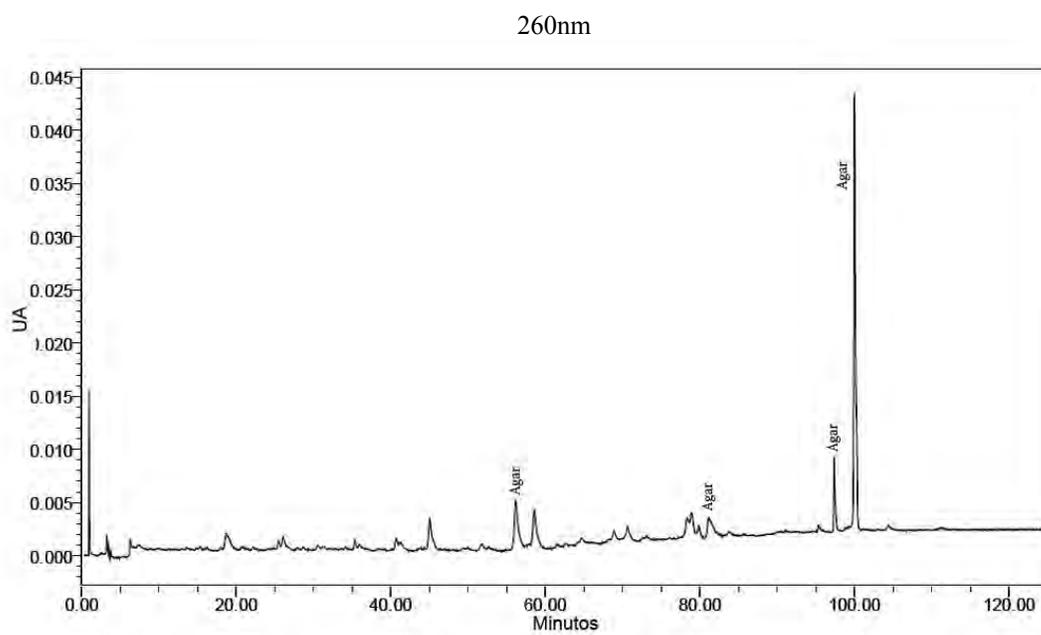
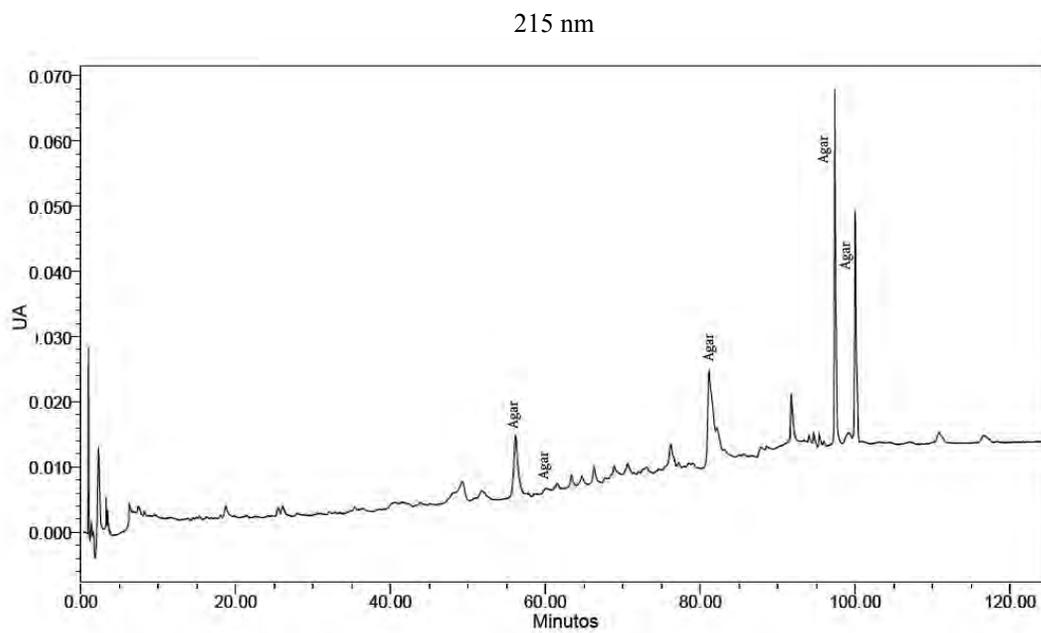
**Figura 27.** Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. gomezpompa* (G. mang NI E)



**Cuadro 24.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. gomezpompa* (G. mang I E)

215 nm						260 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.10	5721	0.11	61.20	3368	0.07	0.99	64614	3.42	45.05	85985	4.55
0.99	125709	2.51	61.50	18247	0.36	2.51	5427	0.29	49.94	16172	0.86
1.37	44944	0.90	63.36	44708	0.89	3.28	36911	1.95	51.75	15318	0.81
1.62	35525	0.71	64.71	41591	0.83	3.59	7043	0.37	56.18	153643	8.13
2.30	400107	8.00	66.28	57518	1.15	3.78	9492	0.50	58.57	110825	5.86
3.28	99541	1.99	67.70	7455	0.15	6.31	31311	1.66	61.51	6858	0.36
3.47	43081	0.86	68.55	6860	0.14	6.83	5267	0.28	62.65	5246	0.28
3.70	9787	0.20	68.89	67699	1.35	7.36	18804	0.99	64.27	4014	0.21
3.81	12244	0.24	70.63	72923	1.46	13.60	10074	0.53	64.70	14153	0.75
6.26	25910	0.52	71.47	6706	0.13	14.87	3390	0.18	68.18	4881	0.26
6.37	33792	0.68	72.00	5564	0.11	15.30	6036	0.32	68.87	25526	1.35
7.41	9896	0.20	72.63	14739	0.29	18.01	5182	0.27	70.65	38956	2.06
7.55	14627	0.29	73.09	19362	0.39	18.71	64980	3.44	72.59	6106	0.32
8.22	6975	0.14	74.62	17244	0.34	20.78	5050	0.27	73.10	11143	0.59
9.59	3628	0.07	75.49	18624	0.37	22.17	4145	0.22	78.33	62608	3.31
13.43	5212	0.10	76.18	163736	3.27	25.50	11993	0.63	78.92	74113	3.92
13.90	6484	0.13	77.21	29818	0.60	26.08	21359	1.13	79.87	30963	1.64
14.50	5050	0.10	77.89	10529	0.21	27.90	4908	0.26	81.11	70966	3.75
14.88	7433	0.15	78.50	27373	0.55	28.70	3810	0.20	83.74	8511	0.45
15.32	9338	0.19	79.07	15906	0.32	30.53	7940	0.42	95.35	9945	0.53
16.25	5180	0.10	81.13	652652	13.05	34.14	4607	0.24	97.37	82670	4.37
18.04	6417	0.13	82.17	178601	3.57	35.37	14634	0.77	98.98	3486	0.18
18.72	45214	0.90	83.07	24637	0.49	35.96	6410	0.34	99.22	6057	0.32
21.40	4710	0.09	85.08	6428	0.13	40.70	25314	1.34	100.00	633464	33.50
25.48	26943	0.54	85.64	9122	0.18	41.30	20950	1.11	104.36	9548	0.50
26.08	34351	0.69	87.85	41315	0.83						
27.88	6172	0.12	88.55	21615	0.43						
32.11	8275	0.17	91.42	9057	0.18						
35.37	11689	0.23	91.75	156206	3.12						
36.43	8365	0.17	94.04	18582	0.37						
40.18	15326	0.31	94.65	29989	0.60						
40.52	4529	0.09	95.35	31000	0.62						
43.84	7392	0.15	95.95	12411	0.25						
48.16	66689	1.33	97.37	678421	13.57						
48.36	13130	0.26	99.10	42037	0.84						
49.26	170704	3.41	99.17	37952	0.76						
51.77	48806	0.98	100.00	554177	11.08						
56.15	344560	6.89	110.81	64253	1.28						
60.12	15793	0.32	116.57	32695	0.65						

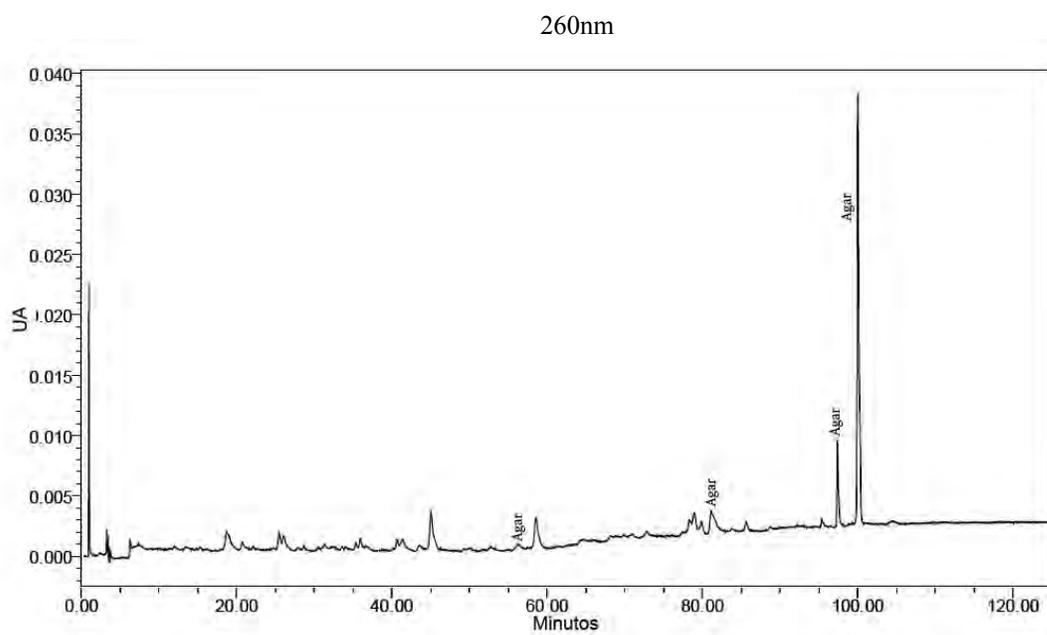
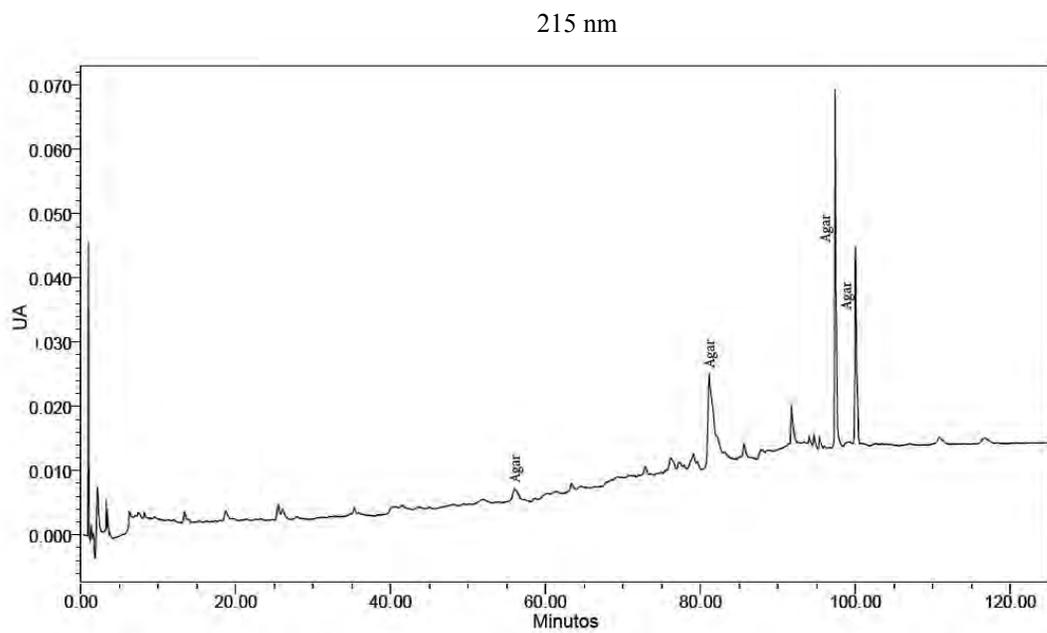
**Figura 28.** Cromatogramas del extracto de la zona de interacción de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. gomezpompa* (G. mang I E)



**Cuadro 25.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. amarilla* (*G. mang* NI *E. am*)

215 nm						260 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.87	48247	1.11	64.48	6188	0.14	0.99	94102	5.63	41.39	29642	1.77
1.00	220504	5.08	67.78	7998	0.18	2.58	11293	0.68	43.56	11289	0.68
1.37	55871	1.29	68.13	4376	0.10	3.29	35929	2.15	45.03	98485	5.89
1.64	39837	0.92	68.48	9414	0.22	3.59	7149	0.43	52.73	16696	1.00
2.17	263833	6.08	68.96	5474	0.13	3.78	9590	0.57	56.25	17526	1.05
2.70	34390	0.79	69.28	8728	0.20	6.28	11503	0.69	58.56	83755	5.01
3.28	101828	2.35	71.47	3122	0.07	12.04	4055	0.24	64.68	42155	2.52
3.46	42747	0.99	72.05	4326	0.10	13.47	10568	0.63	68.12	29900	1.79
3.71	9470	0.22	72.88	32623	0.75	15.30	4901	0.29	69.90	12145	0.73
3.80	12983	0.30	74.91	6954	0.16	18.72	70290	4.20	71.00	11521	0.69
6.26	25169	0.58	75.51	13524	0.31	20.77	11164	0.67	72.87	9993	0.60
6.38	55020	1.27	76.16	105798	2.44	22.15	3153	0.19	77.42	7539	0.45
6.97	47828	1.10	77.25	52023	1.20	25.47	31954	1.91	78.29	45785	2.74
7.42	58611	1.35	77.88	26138	0.60	26.05	36365	2.18	78.94	57509	3.44
8.22	15308	0.35	79.11	106645	2.46	27.88	3948	0.24	79.89	31154	1.86
9.56	3391	0.08	79.55	32913	0.76	28.67	5553	0.33	81.13	80760	4.83
13.42	22332	0.51	81.13	668078	15.40	30.49	4961	0.30	83.77	6597	0.39
15.30	4404	0.10	82.15	139483	3.22	31.32	8971	0.54	85.65	20203	1.21
18.70	40060	0.92	83.13	42959	0.99	33.59	3279	0.20	88.66	6473	0.39
25.47	51571	1.19	85.05	6340	0.15	34.11	3648	0.22	95.36	11067	0.66
26.06	42917	0.99	85.64	53156	1.23	35.36	10434	0.62	97.38	86486	5.17
27.86	6773	0.16	87.85	35295	0.81	35.96	17378	1.04	100.02	536445	32.09
35.32	29739	0.69	88.59	4725	0.11	40.70	18363	1.10			
35.96	7041	0.16	91.38	9355	0.22						
40.13	42558	0.98	91.76	120933	2.79						
41.41	13412	0.31	94.04	19806	0.46						
43.56	18282	0.42	94.65	32979	0.76						
45.01	4834	0.11	95.36	32716	0.75						
51.77	24809	0.57	95.97	7966	0.18						
56.04	85623	1.97	97.38	684318	15.77						
58.58	6653	0.15	98.85	6453	0.15						
60.07	31372	0.72	99.22	18013	0.42						
61.12	9598	0.22	100.02	465810	10.74						
61.44	7460	0.17	110.81	22307	0.51						
63.36	31294	0.72	116.64	20911	0.48						
64.41	4451	0.10									

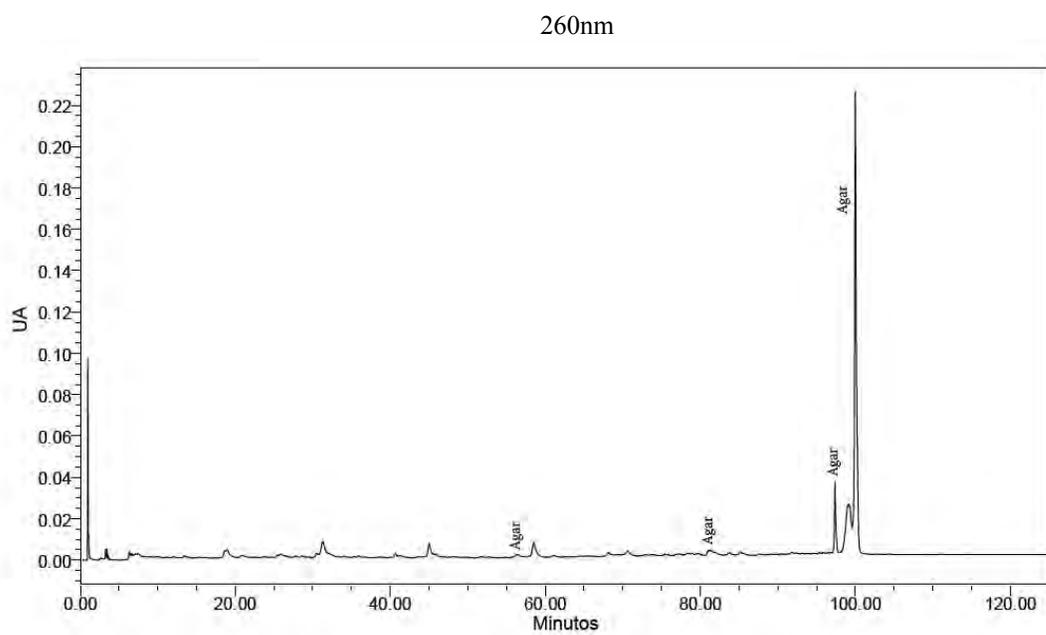
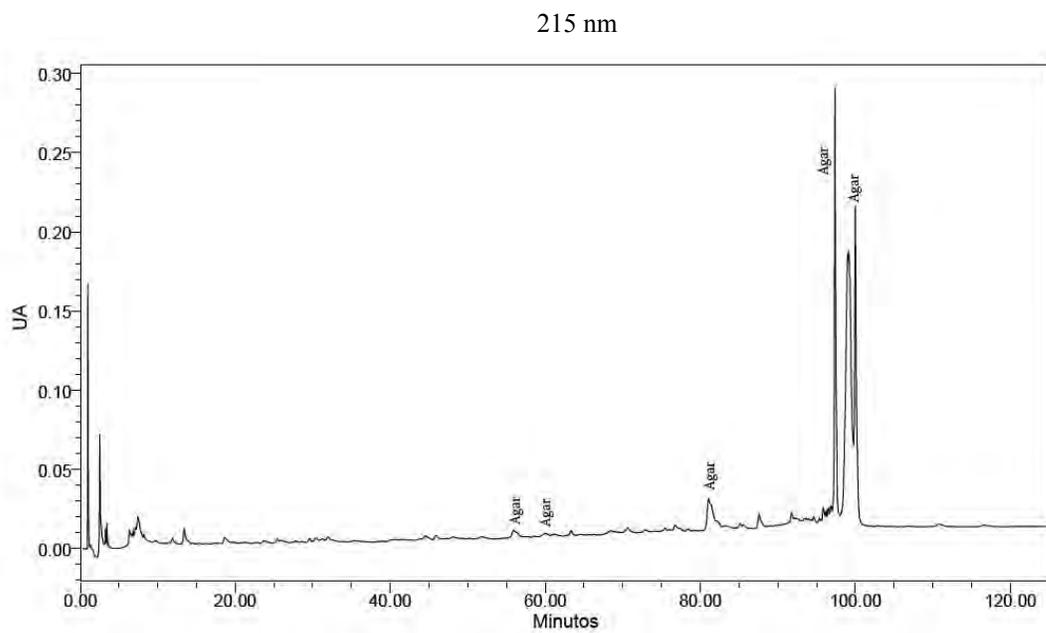
**Figura 29.** Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. amarilla* (G. mang NI E. am)



**Cuadro 26.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. amarilla* (G. mang I E. am)

215 nm						260 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.87	59369	0.25	51.72	47676	0.20	1.00	436049	5.08	52.70	7734	0.09
1.00	749504	3.14	55.92	210516	0.88	2.72	21623	0.25	56.36	46718	0.54
1.33	134265	0.56	58.50	16375	0.07	3.45	59678	0.70	58.51	231597	2.70
2.53	855396	3.58	59.98	93644	0.39	3.63	12700	0.15	61.05	35431	0.41
3.27	140911	0.59	61.10	45615	0.19	3.90	3031	0.04	62.68	12527	0.15
3.46	113421	0.47	62.75	7407	0.03	4.43	7659	0.09	64.38	4477	0.05
3.67	24698	0.10	63.32	79772	0.33	6.34	60403	0.70	64.69	9979	0.12
3.83	16250	0.07	64.63	18167	0.08	6.68	36831	0.43	65.28	6466	0.08
6.37	271818	1.14	66.26	5621	0.02	7.15	62843	0.73	68.12	39030	0.45
6.83	119007	0.50	68.46	89778	0.38	7.40	57207	0.67	69.45	4604	0.05
7.14	170324	0.71	68.86	41277	0.17	7.63	45321	0.53	70.07	5400	0.06
7.42	604387	2.53	69.38	25198	0.11	8.24	33572	0.39	70.61	79491	0.93
8.22	227682	0.95	70.60	122671	0.51	8.94	32773	0.38	72.89	16174	0.19
9.59	29798	0.12	72.87	51188	0.21	10.05	33524	0.39	73.63	9126	0.11
9.83	31852	0.13	74.16	6287	0.03	12.03	10071	0.12	73.91	9060	0.11
11.46	11712	0.05	75.44	65348	0.27	13.43	33414	0.39	75.44	11564	0.13
11.89	74814	0.31	76.10	31457	0.13	15.32	6436	0.07	77.02	19944	0.23
13.42	221553	0.93	76.74	121204	0.51	18.04	3812	0.04	77.38	18251	0.21
14.45	8225	0.03	77.37	35543	0.15	18.66	54587	0.64	78.37	36824	0.43
14.84	4770	0.02	78.36	24879	0.10	18.95	141844	1.65	78.90	30890	0.36
15.32	10495	0.04	81.07	471878	1.97	20.92	50763	0.59	79.50	16573	0.19
16.25	4492	0.02	81.35	578407	2.42	22.13	5371	0.06	79.84	21204	0.25
17.35	8358	0.03	83.17	11733	0.05	23.57	8993	0.10	81.10	48772	0.57
18.65	126627	0.53	85.14	56314	0.24	25.45	22016	0.26	81.38	114151	1.33
19.82	19880	0.08	85.59	52560	0.22	25.92	32820	0.38	83.75	43891	0.51
20.95	8726	0.04	87.58	255962	1.07	27.84	19978	0.23	85.15	44738	0.52
21.35	13435	0.06	88.72	6146	0.03	28.64	16031	0.19	85.56	20864	0.24
22.75	15837	0.07	88.94	3874	0.02	30.53	46711	0.54	87.59	10680	0.12
23.65	22522	0.09	89.08	2564	0.01	31.30	367956	4.29	89.10	3510	0.04
23.92	27869	0.12	91.76	111002	0.46	34.09	10068	0.12	91.77	11836	0.14
25.44	63779	0.27	92.20	5582	0.02	35.32	9150	0.11	93.14	3455	0.04
25.96	66313	0.28	92.33	12194	0.05	35.94	15677	0.18	94.62	3352	0.04
27.37	6328	0.03	93.46	32335	0.14	38.72	14290	0.17	95.34	12711	0.15
27.85	25733	0.11	93.63	28683	0.12	40.02	5253	0.06	95.90	15059	0.18
28.63	10135	0.04	94.01	37755	0.16	40.67	46360	0.54	96.32	4348	0.05
29.56	48611	0.20	94.24	11150	0.05	41.30	34204	0.40	96.52	10227	0.12
30.42	65074	0.27	94.62	62297	0.26	43.84	16297	0.19	96.98	13861	0.16
31.25	43970	0.18	95.34	45676	0.19	45.01	206220	2.40	97.37	421478	4.91
31.96	62167	0.26	95.84	151873	0.64	45.80	46415	0.54	99.16	805318	9.38
35.30	8328	0.03	96.13	56947	0.24	48.17	9344	0.11	99.23	392167	4.57
40.23	29972	0.13	96.32	69176	0.29	51.75	15005	0.17	99.99	3780314	44.03
40.48	8708	0.04	96.53	128505	0.54						
40.65	28402	0.12	96.84	169195	0.71						
41.37	40753	0.17	97.37	3443760	14.41						
42.34	16123	0.07	99.00	3847853	16.10						
43.83	14966	0.06	99.15	4764434	19.93						
44.56	104088	0.44	99.99	3392661	14.19						
45.89	72296	0.30	110.77	63441	0.27						
48.11	26471	0.11	116.58	18636	0.08						

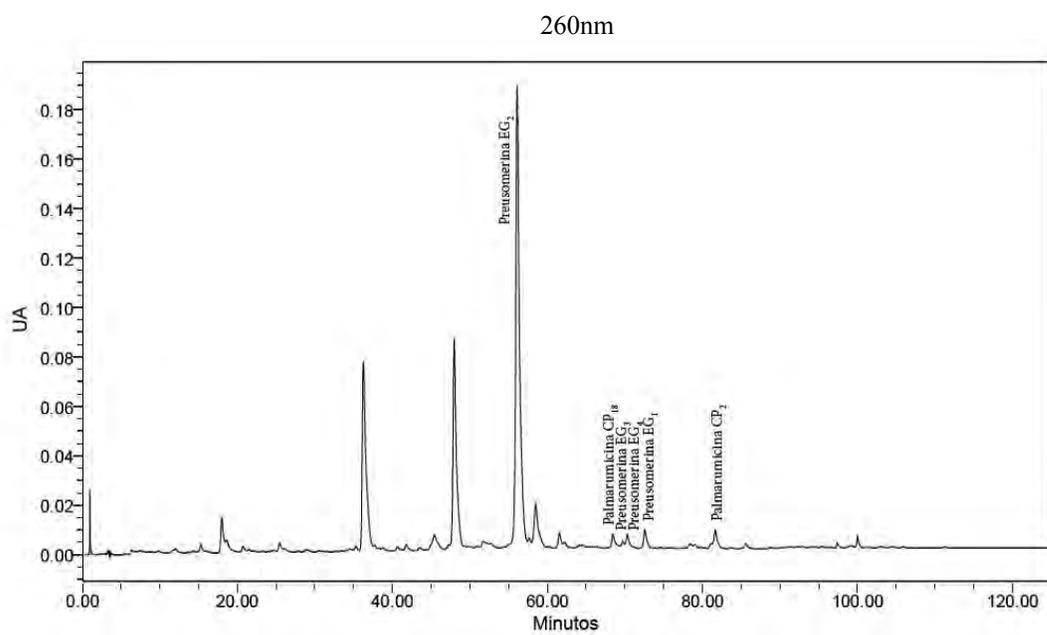
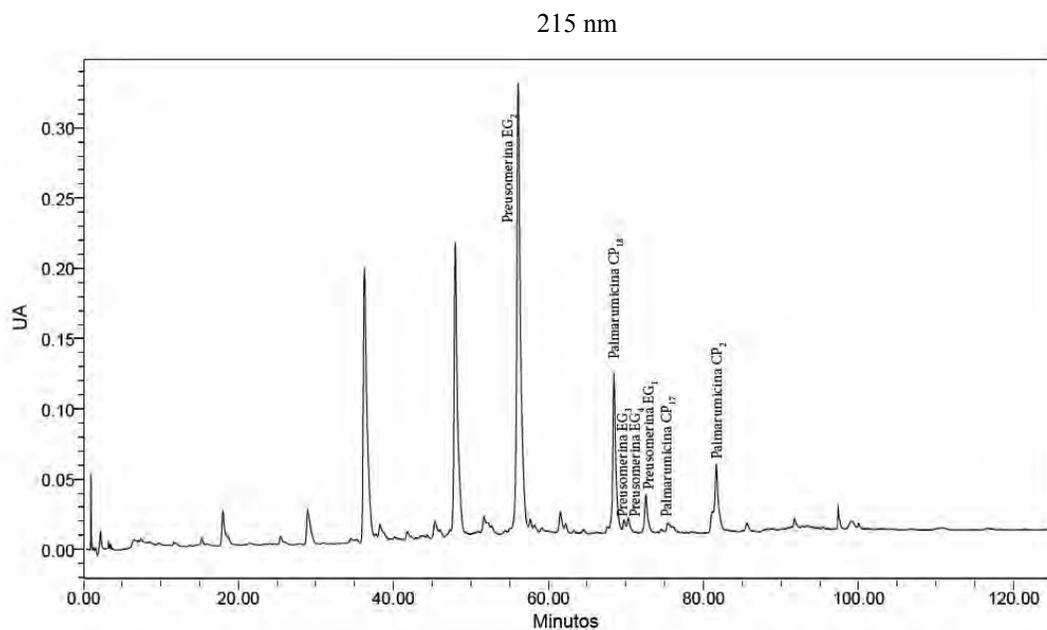
**Figura 30.** Cromatogramas del extracto de la zona I de *G. mangiferae* de los bioensayos con *E. amarilla* (*G. mang I E. am*)



**Cuadro 27.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de *G. mangiferae* del bioensayo de potencial antifúngico a 125 µg/mL (G 125)

215 nm						260 nm					
TR (min)	área (µV s)	% área									
0.10	4775	0.01	50.42	58656	0.15	0.99	102846	0.64	49.84	12753	0.08
0.99	216893	0.54	50.92	97067	0.24	2.44	5688	0.04	50.92	16065	0.10
1.31	39158	0.10	51.68	406840	1.01	3.44	25082	0.15	51.73	118398	0.73
1.59	50095	0.12	52.19	198862	0.49	3.56	15765	0.10	52.65	69965	0.43
2.22	349515	0.87	52.64	183192	0.46	3.73	19629	0.12	54.33	5960	0.04
2.82	59747	0.15	54.42	66650	0.17	6.36	55861	0.35	54.62	7050	0.04
3.27	60490	0.15	55.13	89490	0.22	7.52	39402	0.24	56.10	6335550	39.15
3.45	17163	0.04	56.10	10859989	27.02	7.83	25659	0.16	57.65	90429	0.56
3.54	24587	0.06	57.66	213661	0.53	8.90	6278	0.04	58.49	689549	4.26
3.72	24753	0.06	58.19	127425	0.32	9.81	16319	0.10	61.55	162339	1.00
5.63	6283	0.02	59.13	54131	0.13	11.68	15025	0.09	62.23	69494	0.43
6.56	265355	0.66	60.00	4650	0.01	12.02	42392	0.26	63.14	6488	0.04
7.13	71748	0.18	60.38	7878	0.02	14.32	18740	0.12	64.09	22915	0.14
7.41	99648	0.25	61.54	399909	0.99	14.87	9846	0.06	64.52	25876	0.16
7.57	113827	0.28	62.23	162409	0.40	15.30	76327	0.47	66.28	6413	0.04
8.21	57039	0.14	63.28	40938	0.10	15.95	24789	0.15	67.55	4283	0.03
8.54	126405	0.31	63.79	11637	0.03	18.00	334379	2.07	68.45	179413	1.11
9.80	66615	0.17	64.51	73597	0.18	18.62	194391	1.20	69.70	61824	0.38
11.69	22432	0.06	65.50	6511	0.02	20.72	63533	0.39	70.30	144051	0.89
13.67	15607	0.04	66.27	17935	0.04	21.48	32083	0.20	72.56	216030	1.33
14.48	14393	0.04	67.59	86152	0.21	22.05	17496	0.11	74.62	11102	0.07
15.29	103939	0.26	68.45	3166246	7.88	23.09	3546	0.02	75.39	3811	0.02
15.96	8242	0.02	69.76	231151	0.58	24.04	4554	0.03	75.94	8717	0.05
18.00	589977	1.47	70.30	315293	0.78	24.71	22821	0.14	78.44	45015	0.28
18.61	210115	0.52	71.26	19157	0.05	25.46	126984	0.78	78.97	29885	0.18
19.82	7807	0.02	72.56	778583	1.94	27.85	7991	0.05	81.65	268031	1.66
20.77	5416	0.01	74.01	18280	0.05	28.95	39399	0.24	83.77	5817	0.04
21.48	27184	0.07	74.60	75120	0.19	30.52	5658	0.03	85.59	54905	0.34
23.39	17636	0.04	75.40	253412	0.63	33.53	6708	0.04	88.66	5552	0.03
24.05	26092	0.06	76.05	151361	0.38	34.05	8755	0.05	90.42	4620	0.03
24.67	22442	0.06	77.17	18070	0.04	34.50	30647	0.19	90.89	6860	0.04
25.46	154041	0.38	77.76	7880	0.02	35.29	51906	0.32	91.27	14662	0.09
25.97	54820	0.14	78.47	17720	0.04	36.26	2622085	16.20	92.13	8476	0.05
27.85	18579	0.05	80.14	4755	0.01	37.72	59559	0.37	92.74	12905	0.08
28.95	834526	2.08	81.11	277739	0.69	38.26	23927	0.15	95.34	11881	0.07
30.91	10646	0.03	81.65	1533623	3.82	38.77	37940	0.23	97.38	28989	0.18
31.85	4108	0.01	85.60	163313	0.41	40.64	48500	0.30	99.18	34433	0.21
32.79	5143	0.01	88.12	52195	0.13	41.81	66805	0.41	100.00	88716	0.55
34.51	108035	0.27	88.56	33850	0.08	43.56	32731	0.20	101.19	8935	0.06
35.27	54604	0.14	88.95	22428	0.06	44.30	3401	0.02	103.01	11722	0.07
36.26	6561943	16.32	90.93	18072	0.04	45.40	293550	1.81	104.38	6905	0.04
37.73	117342	0.29	91.35	29144	0.07	47.28	37954	0.23	105.86	8704	0.05
38.27	480087	1.19	91.74	179920	0.45	47.98	2573960	15.91	111.25	6297	0.04
39.57	23235	0.06	92.75	38545	0.10						
40.13	52430	0.13	93.40	40312	0.10						
40.53	10094	0.03	94.05	6939	0.02						
41.80	181577	0.45	94.65	10806	0.03						
42.94	19851	0.05	95.35	33131	0.08						
43.55	40013	0.10	95.95	9102	0.02						
43.85	54163	0.13	97.37	254234	0.63						
44.36	50397	0.13	99.15	266923	0.66						
45.38	372749	0.93	100.00	73973	0.18						
46.01	138532	0.34	102.92	9733	0.02						
47.30	146569	0.36	110.10	28125	0.07						
47.98	6548380	16.29	110.80	65078	0.16						
49.86	28488	0.07	116.54	28428	0.07						

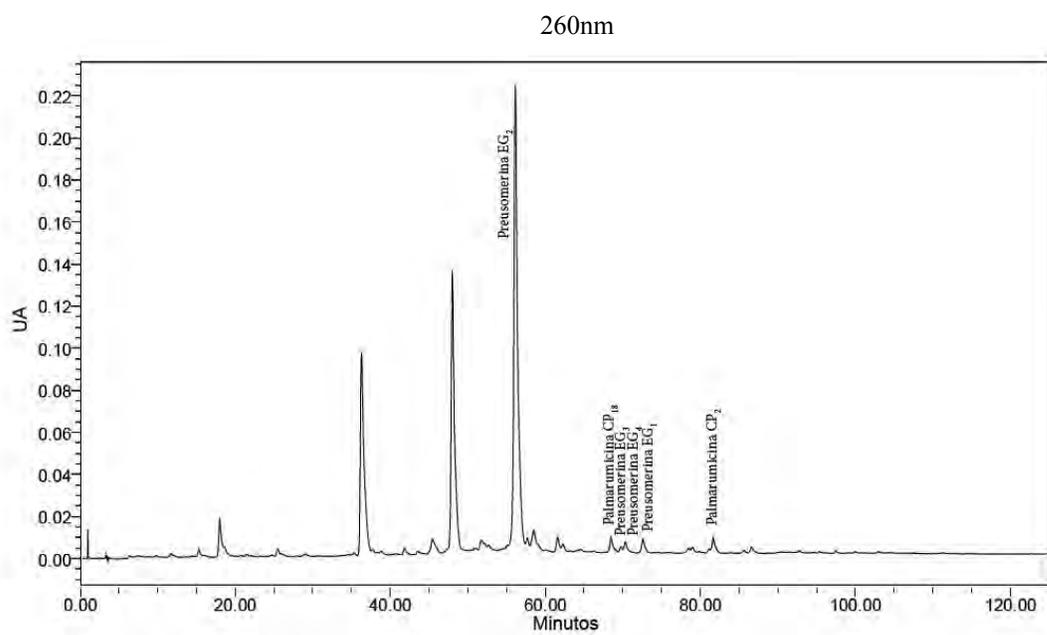
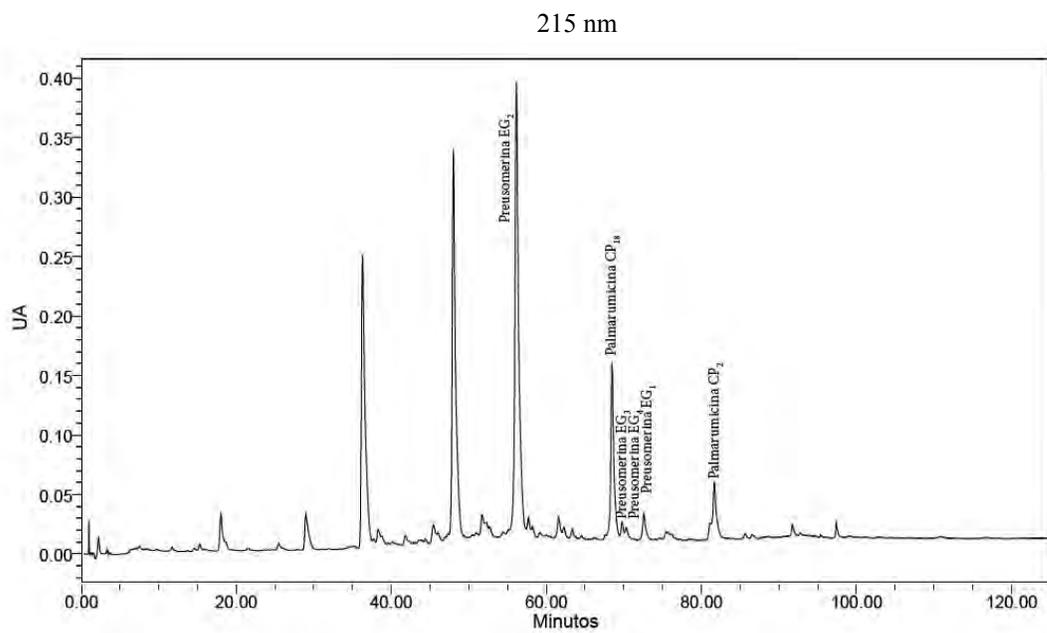
**Figura 31.** Cromatogramas del extracto *G. mangiferae* del bioensayo de potencial antifúngico a 125 µg/mL (G 125)



**Cuadro 28.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de *G. mangiferae* del bioensayo de potencial antifúngico a 250 µg/mL (G 250)

215 nm						260 nm					
TR (min)	área (µV s)	% área									
0.99	106555	0.18	52.67	749097	1.30	0.99	51925	0.26	57.69	182896	0.90
1.32	36575	0.06	54.45	479170	0.83	2.80	18347	0.09	58.51	500780	2.47
1.59	46074	0.08	55.13	337223	0.58	3.29	52913	0.26	60.06	47688	0.24
2.24	288597	0.50	56.13	13872935	23.99	3.58	12123	0.06	61.58	193104	0.95
3.28	27326	0.05	57.69	618758	1.07	3.73	18878	0.09	62.26	100048	0.49
3.55	7835	0.01	58.21	479790	0.83	6.26	12897	0.06	63.16	9018	0.04
3.72	3506	0.01	59.16	381359	0.66	6.50	3813	0.02	64.14	19752	0.10
3.84	3298	0.01	59.74	67299	0.12	7.54	11193	0.06	64.53	28551	0.14
6.26	20977	0.04	60.02	182187	0.31	8.91	4770	0.02	66.33	11937	0.06
6.55	58832	0.10	60.39	196113	0.34	9.81	17747	0.09	67.57	3394	0.02
6.92	69350	0.12	61.57	781457	1.35	11.69	52887	0.26	68.47	221851	1.09
7.14	33183	0.06	62.26	456125	0.79	14.33	8669	0.04	69.74	61879	0.31
7.42	139728	0.24	63.33	458032	0.79	15.31	59381	0.29	70.32	135945	0.67
8.22	20768	0.04	64.54	268540	0.46	18.00	559788	2.76	72.59	198284	0.98
8.54	21545	0.04	65.46	100276	0.17	20.74	11051	0.05	74.02	4316	0.02
9.80	29777	0.05	66.17	200415	0.35	21.51	17203	0.08	74.66	9478	0.05
11.69	91087	0.16	67.22	32162	0.06	23.08	9014	0.04	75.38	3403	0.02
13.68	10677	0.02	67.62	135936	0.24	24.03	5045	0.02	75.99	11245	0.06
14.53	63497	0.11	68.47	4310810	7.45	24.74	18328	0.09	78.46	56794	0.28
15.30	135894	0.23	69.78	414888	0.72	25.47	127681	0.63	79.00	71255	0.35
15.98	45067	0.08	70.31	375668	0.65	27.89	11005	0.05	79.84	12711	0.06
18.00	925718	1.60	71.25	56873	0.10	28.97	46620	0.23	81.12	37966	0.19
21.51	45072	0.08	72.58	746286	1.29	34.08	3722	0.02	81.67	223748	1.10
24.05	14581	0.03	74.04	34412	0.06	34.53	10752	0.05	83.87	8191	0.04
24.70	9668	0.02	74.63	72590	0.13	35.33	36554	0.18	85.61	36701	0.18
25.47	98364	0.17	75.43	156712	0.27	36.29	3231574	15.94	86.59	93931	0.46
27.89	8864	0.02	75.65	127765	0.22	37.71	72184	0.36	89.99	9153	0.05
28.97	1019549	1.76	76.11	182479	0.32	38.32	30766	0.15	90.48	33000	0.16
30.93	5577	0.01	77.21	16137	0.03	38.81	54998	0.27	91.60	21327	0.11
31.92	9455	0.02	78.47	31150	0.05	40.68	8025	0.04	92.14	7753	0.04
33.51	6216	0.01	79.02	17034	0.03	41.85	84640	0.42	92.42	8251	0.04
34.20	16482	0.03	80.15	6108	0.01	43.56	50552	0.25	92.75	30912	0.15
34.56	55810	0.10	81.12	282877	0.49	44.35	13135	0.06	94.66	15959	0.08
35.29	88435	0.15	81.67	1531334	2.65	45.45	341810	1.69	95.35	12774	0.06
36.29	8262285	14.29	85.62	121154	0.21	48.01	4218868	20.81	97.39	23349	0.12
37.71	188674	0.33	86.59	110239	0.19	49.89	47348	0.23	99.11	7523	0.04
38.31	464787	0.80	88.10	21896	0.04	50.42	41914	0.21	100.01	13010	0.06
38.75	293369	0.51	88.55	13423	0.02	50.93	93689	0.46	103.03	14736	0.07
39.60	103059	0.18	90.56	6020	0.01	51.73	313452	1.55	104.39	15543	0.08
40.17	308403	0.53	91.75	236361	0.41	52.69	182366	0.90	111.28	8229	0.04
41.83	435246	0.75	92.76	82788	0.14	56.13	7799263	38.47			
42.97	105542	0.18	93.40	24110	0.04						
43.88	294836	0.51	93.70	21122	0.04						
44.39	201938	0.35	94.06	38048	0.07						
45.43	642965	1.11	94.66	24188	0.04						
46.03	389819	0.67	95.35	33929	0.06						
46.97	159887	0.28	95.96	5099	0.01						
47.33	212677	0.37	97.39	213502	0.37						
48.01	10845685	18.75	99.13	42840	0.07						
49.96	97517	0.17	102.88	11000	0.02						
50.43	299496	0.52	110.17	5949	0.01						
50.93	387074	0.67	110.78	70213	0.12						
51.71	872396	1.51	116.59	6281	0.01						
52.24	459826	0.80									

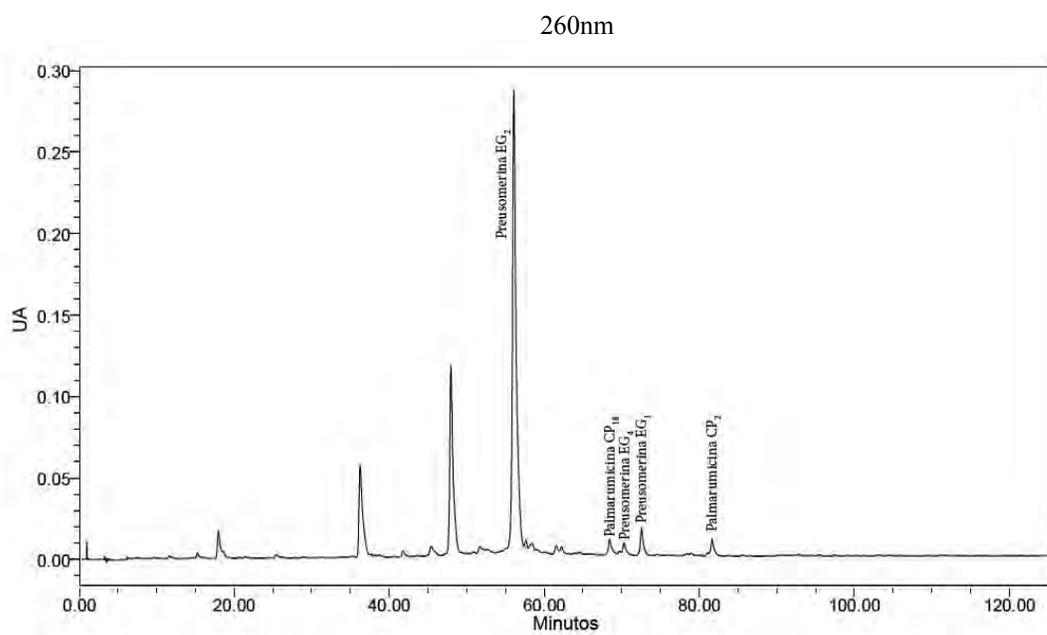
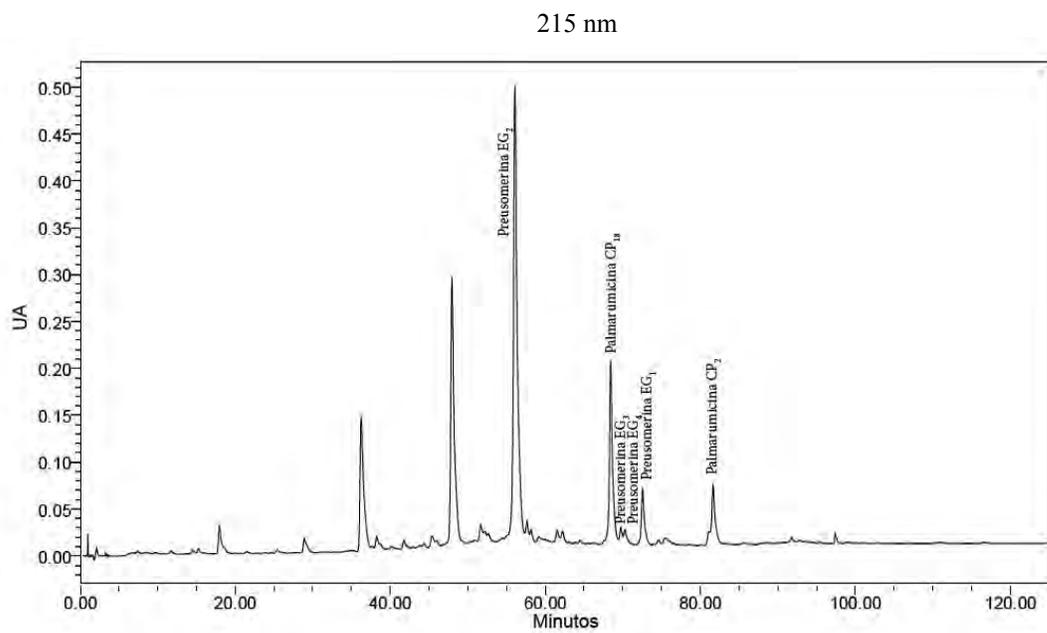
**Figura 32.** Cromatogramas del extracto *G. mangiferae* del bioensayo de potencial antifúngico a 250 µg/mL (G 250)



**Cuadro 29.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de *G. mangiferae* del bioensayo de potencial antifúngico a 500 µg/mL (G 500)

215 nm						260 nm					
TR (min)	área (µV s)	% área									
0.11	3677	0.01	50.90	347242	0.60	0.99	38940	0.19	51.69	268270	1.30
0.99	90451	0.16	51.66	809762	1.39	2.68	14628	0.07	52.66	203962	0.99
1.36	40631	0.07	52.19	477244	0.82	3.27	62253	0.30	56.09	10049508	48.56
1.62	38629	0.07	52.63	744471	1.28	3.59	12903	0.06	57.63	229070	1.11
2.11	270697	0.47	54.42	539812	0.93	3.73	23930	0.12	58.43	288781	1.40
2.72	33571	0.06	55.20	408041	0.70	6.25	14200	0.07	59.06	121411	0.59
3.27	86818	0.15	56.09	17519667	30.18	6.50	13472	0.07	60.01	75511	0.36
3.56	18307	0.03	57.64	742714	1.28	7.28	24543	0.12	61.53	155837	0.75
3.72	23478	0.04	58.17	556293	0.96	9.79	13420	0.06	62.22	131532	0.64
6.24	31680	0.05	59.16	582302	1.00	11.67	51304	0.25	63.10	10843	0.05
6.54	52157	0.09	59.98	173772	0.30	14.36	8687	0.04	63.82	8626	0.04
6.77	54260	0.09	60.34	246127	0.42	14.79	3803	0.02	64.08	10029	0.05
7.11	22226	0.04	61.53	650197	1.12	15.28	56134	0.27	64.50	27902	0.13
7.41	118425	0.20	62.22	581050	1.00	17.97	522940	2.53	66.26	8357	0.04
8.22	33806	0.06	63.11	165074	0.28	20.71	10573	0.05	68.43	308770	1.49
8.53	76055	0.13	63.80	100275	0.17	21.47	15761	0.08	69.72	62357	0.30
9.70	20955	0.04	64.49	302900	0.52	23.03	4930	0.02	70.30	238430	1.15
9.79	22706	0.04	65.55	103377	0.18	24.69	11847	0.06	72.55	462286	2.23
11.67	84067	0.14	66.13	185865	0.32	25.43	80238	0.39	74.60	15879	0.08
13.65	10903	0.02	67.09	24772	0.04	27.88	6519	0.03	76.58	5020	0.02
14.51	104448	0.18	68.43	5755202	9.91	28.92	27323	0.13	78.42	27346	0.13
15.27	110206	0.19	69.75	474934	0.82	31.21	11948	0.06	78.96	34750	0.17
15.90	3982	0.01	70.28	535505	0.92	34.05	6101	0.03	81.65	339262	1.64
17.97	858926	1.48	72.55	1677907	2.89	34.69	10308	0.05	83.77	5489	0.03
21.46	46213	0.08	74.00	6509	0.01	35.26	27107	0.13	85.63	16952	0.08
23.86	12026	0.02	74.59	109578	0.19	36.25	1932154	9.34	86.54	10814	0.05
24.66	5216	0.01	75.39	105350	0.18	37.65	49713	0.24	89.96	5202	0.03
25.43	65449	0.11	75.63	162525	0.28	38.29	31520	0.15	90.47	15015	0.07
27.80	4320	0.01	78.44	9001	0.02	38.73	42254	0.20	91.59	13210	0.06
28.91	493734	0.85	80.12	11458	0.02	40.63	3996	0.02	92.11	3533	0.02
30.89	7131	0.01	81.11	267765	0.46	41.78	94718	0.46	92.37	3098	0.01
31.28	7929	0.01	81.65	2004072	3.45	42.90	4174	0.02	92.75	18348	0.09
31.88	7575	0.01	85.17	5448	0.01	43.60	26829	0.13	95.35	11006	0.05
34.12	17857	0.03	85.62	69739	0.12	44.34	8730	0.04	97.38	21818	0.11
34.98	54502	0.09	86.53	15830	0.03	45.41	280896	1.36	99.11	5789	0.03
35.23	33550	0.06	88.03	28296	0.05	47.96	3702933	17.89	102.99	13348	0.06
36.25	4913395	8.46	88.54	13171	0.02	49.78	37849	0.18	104.38	8656	0.04
37.65	133728	0.23	90.61	8457	0.01	50.36	40235	0.19	111.21	45648	0.22
38.24	650370	1.12	90.87	6573	0.01	50.89	83249	0.40			
39.55	57422	0.10	91.74	143995	0.25						
40.12	268981	0.46	92.75	48457	0.08						
41.77	406052	0.70	93.39	4371	0.01						
42.93	100106	0.17	94.05	2890	0.00						
43.87	223614	0.39	94.65	6613	0.01						
44.34	214996	0.37	95.34	31656	0.05						
45.39	527156	0.91	97.38	190049	0.33						
45.97	327706	0.56	99.11	10344	0.02						
46.91	127681	0.22	102.99	8820	0.02						
47.96	9794164	16.87	110.13	6272	0.01						
49.90	26032	0.04	110.77	51139	0.09						
50.38	262021	0.45	116.58	18570	0.03						

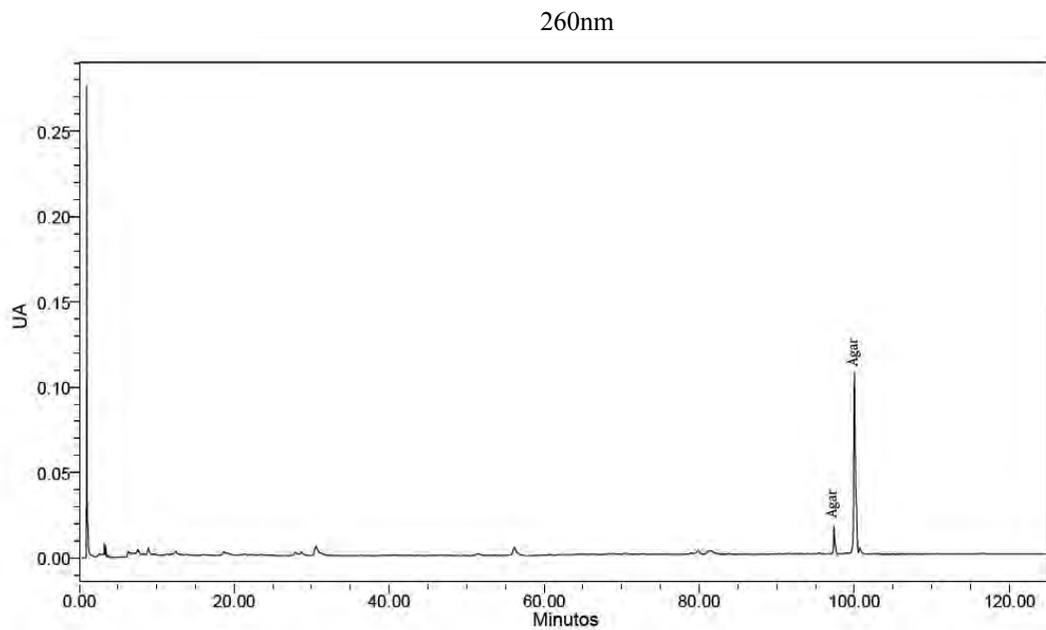
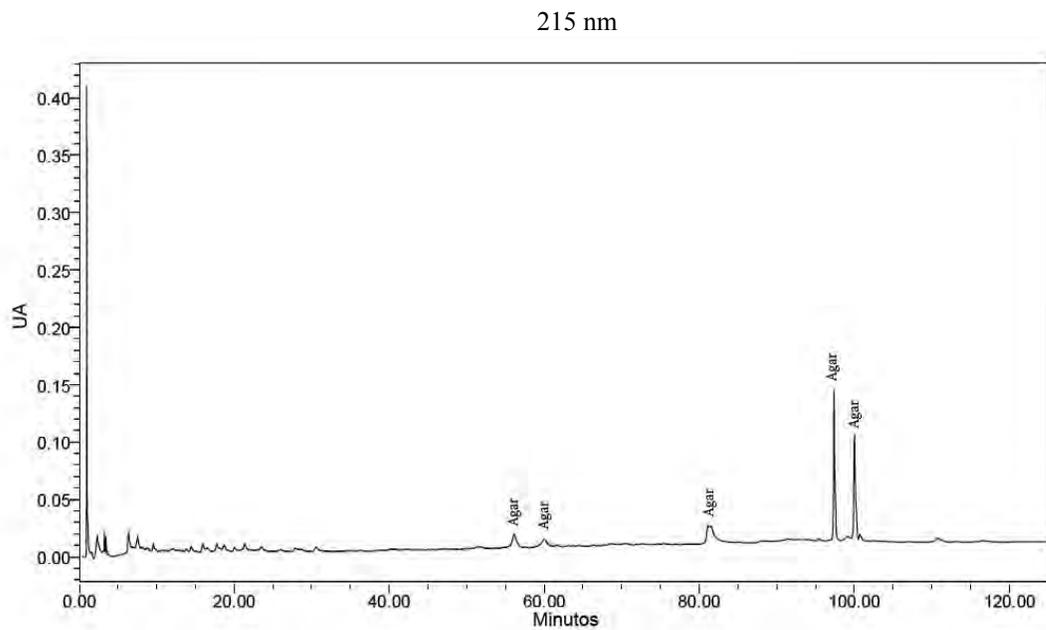
**Figura 33.** Cromatogramas del extracto *G. mangiferae* del bioensayo de potencial antifúngico a 500 µg/mL (G 500)



**Cuadro 30.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del APD bajo las condiciones de análisis para *G. mangiferae*

APD											
215 nm						260 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.98	1618383	11.58	45.58	9821	0.07	0.98	1105441	23.13	55.46	3618	0.08
1.59	71203	0.51	46.62	9278	0.07	2.61	69159	1.45	56.15	164406	3.44
2.34	576772	4.13	49.73	21088	0.15	3.14	34703	0.73	64.42	27771	0.58
3.23	90987	0.65	50.37	14928	0.11	3.27	60488	1.27	68.14	7321	0.15
3.27	108545	0.78	51.48	150840	1.08	3.63	20087	0.42	68.87	15090	0.32
3.46	101501	0.73	52.81	13445	0.10	6.32	97069	2.03	70.35	14752	0.31
3.64	37827	0.27	53.78	16301	0.12	7.56	144013	3.01	78.99	17344	0.36
3.81	42745	0.31	54.83	36300	0.26	8.20	31795	0.67	79.87	64163	1.34
5.20	77812	0.56	56.13	549970	3.93	8.94	93980	1.97	81.14	36153	0.76
6.38	592317	4.24	57.40	23653	0.17	9.71	16024	0.34	81.44	82147	1.72
6.88	135065	0.97	60.02	432661	3.09	11.28	7050	0.15	83.83	9613	0.20
7.15	75743	0.54	61.61	64923	0.46	12.46	50407	1.05	91.20	40605	0.85
7.55	447708	3.20	63.05	24839	0.18	13.82	7618	0.16	91.48	37666	0.79
7.98	87639	0.63	63.61	15844	0.11	15.97	9601	0.20	93.96	6879	0.14
8.21	155570	1.11	64.45	15144	0.11	18.70	89223	1.87	94.64	9165	0.19
8.70	254489	1.82	66.38	17294	0.12	21.37	14784	0.31	95.37	14101	0.30
9.58	306679	2.19	67.89	14513	0.10	23.41	5647	0.12	96.00	5129	0.11
10.41	67835	0.49	68.50	28089	0.20	27.90	54733	1.15	97.39	206714	4.32
10.73	91607	0.66	68.80	19075	0.14	28.65	58441	1.22	99.13	14911	0.31
11.04	121471	0.87	70.37	22222	0.16	30.56	199186	4.17	100.03	1730164	36.20
12.10	258901	1.85	70.70	22912	0.16	51.38	40087	0.84	100.72	62276	1.30
12.77	127301	0.91	71.97	10037	0.07						
13.40	54533	0.39	72.65	31607	0.23						
13.84	108415	0.78	74.63	12585	0.09						
14.46	207901	1.49	75.46	17138	0.12						
15.95	181408	1.30	77.13	5319	0.04						
16.51	137302	0.98	81.14	346920	2.48						
17.77	176731	1.26	81.42	776009	5.55						
18.16	72235	0.52	85.03	8950	0.06						
18.70	182103	1.30	88.08	46631	0.33						
20.04	74951	0.54	88.53	19980	0.14						
21.05	26555	0.19	90.41	9969	0.07						
21.38	125741	0.90	90.77	6924	0.05						
23.08	11118	0.08	91.31	48323	0.35						
23.51	101836	0.73	91.84	26283	0.19						
25.86	63329	0.45	92.36	7975	0.06						
26.81	8711	0.06	92.68	9086	0.06						
27.90	67451	0.48	93.26	5790	0.04						
28.30	38180	0.27	94.06	12030	0.09						
28.65	64935	0.46	95.37	34682	0.25						
29.67	7303	0.05	95.98	7697	0.06						
30.56	124977	0.89	96.75	15819	0.11						
36.39	9739	0.07	97.39	1615774	11.56						
38.28	7138	0.05	99.18	135505	0.97						
38.93	9982	0.07	99.37	35220	0.25						
40.10	13629	0.10	100.03	1520731	10.88						
41.91	12515	0.09	100.72	124579	0.89						
42.43	10058	0.07	110.77	149886	1.07						
43.76	5630	0.04	116.69	55121	0.39						
45.04	8028	0.06									

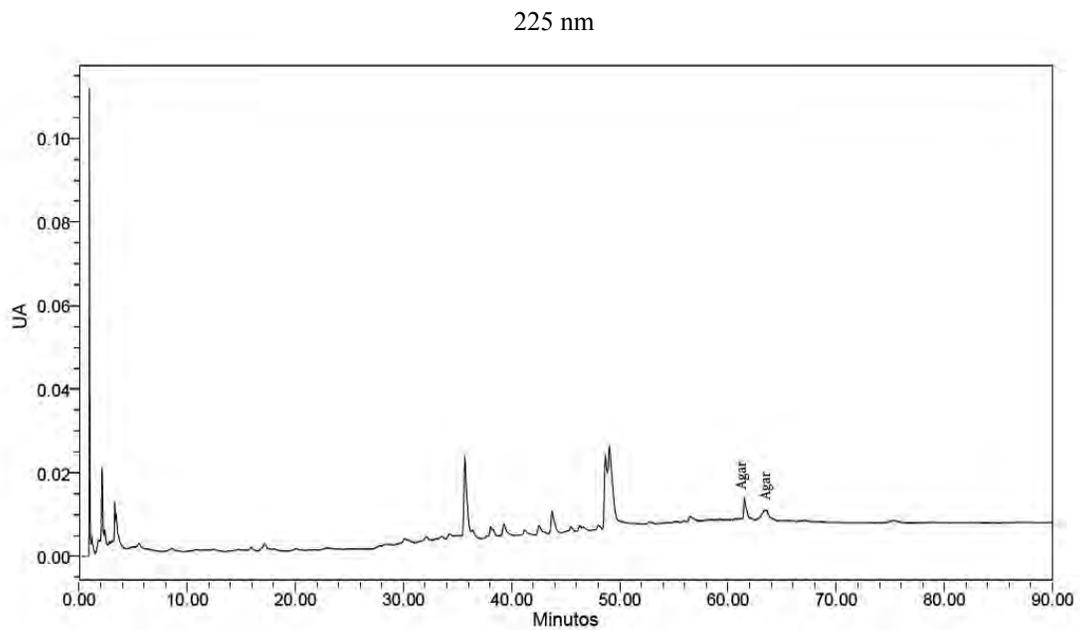
Figura 34. Cromatogramas del APD bajo las condiciones de análisis para *G. mangiferae*



**Cuadro 31.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto del control de *P. capsici* de los bioensayos de antagonismo (P. cap)

P. cap					
225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.97	364,000	10.26	34.88	28,803	0.81
1.20	47,848	1.35	35.20	15,794	0.45
1.80	59,768	1.68	35.68	404,150	11.39
2.14	210,332	5.93	36.38	51,843	1.46
2.38	79,705	2.25	37.72	8,162	0.23
2.81	37,700	1.06	38.07	36,974	1.04
3.09	45,148	1.27	38.28	34,424	0.97
3.31	96,324	2.71	39.29	81,960	2.31
3.45	171,743	4.84	41.21	17,606	0.50
4.97	31,606	0.89	42.52	36,467	1.03
5.55	41,847	1.18	43.74	112,094	3.16
8.56	21,231	0.60	45.49	25,650	0.72
15.94	14,483	0.41	46.28	24,435	0.69
17.20	36,844	1.04	46.63	25,689	0.72
20.10	10,703	0.30	48.01	22,220	0.63
27.73	9,860	0.28	48.67	292,434	8.24
28.31	20,148	0.57	49.04	594,219	16.74
30.12	12,357	0.35	52.77	8,745	0.25
32.11	40,550	1.14	52.83	5,940	0.17
33.03	16,455	0.46	56.49	36,378	1.03
33.55	34,999	0.99	61.52	103,743	2.92
34.27	48,391	1.36	63.47	129,209	3.60

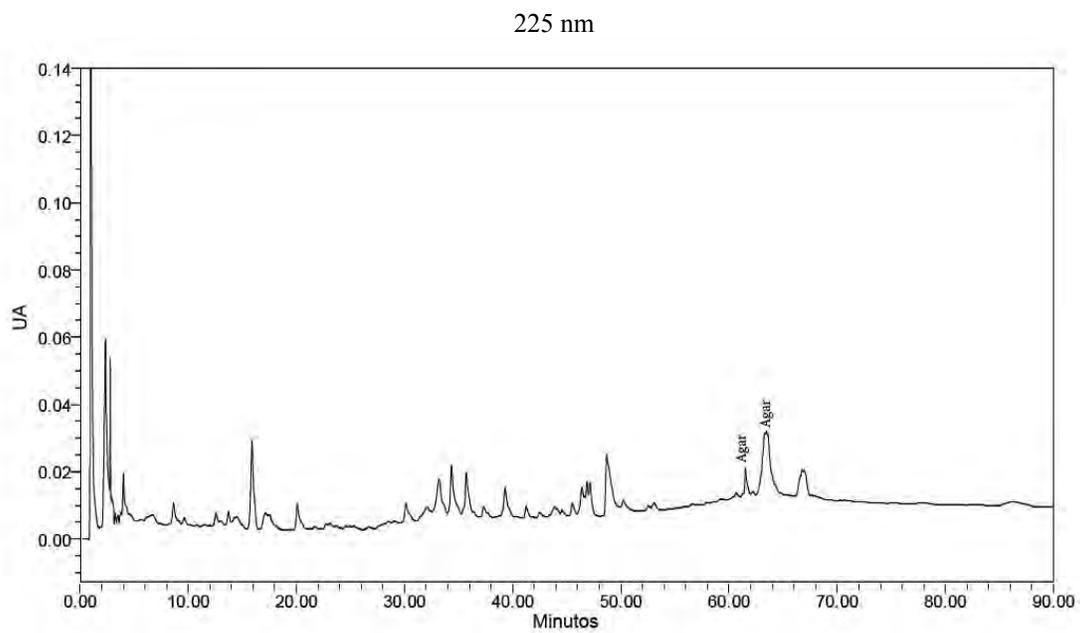
**Figura 35.** Cromatogramas del extracto del control de *P. capsici* de los bioensayos de antagonismo (*P. cap*)



**Cuadro 32.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de no interacción de *P. capsici* de los bioensayos de antagonismo (P. cap NI)

P. cap NI					
225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.97	10,379,488	47.62	34.34	536,578	2.46
1.90	35,241	0.16	35.70	420,857	1.93
2.34	1,254,576	5.76	36.39	67,021	0.31
2.90	165,115	0.76	37.31	159,188	0.73
3.25	63,776	0.29	38.39	11,293	0.05
3.52	80,895	0.37	38.76	22,748	0.10
3.78	81,269	0.37	39.30	268,490	1.23
4.03	355,570	1.63	40.35	9,307	0.04
4.53	194,674	0.89	41.24	58,217	0.27
5.57	161,239	0.74	42.49	36,171	0.17
6.16	77,450	0.36	43.89	76,123	0.35
6.68	290,741	1.33	44.08	42,706	0.20
8.64	200,085	0.92	44.54	49,271	0.23
9.63	46,669	0.21	45.51	92,598	0.42
10.82	7,898	0.04	46.41	208,751	0.96
11.59	16,795	0.08	46.87	145,597	0.67
12.03	10,332	0.05	47.14	178,511	0.82
12.58	89,993	0.41	48.70	660,723	3.03
13.01	46,613	0.21	50.23	171,577	0.79
13.73	92,240	0.42	51.45	9,506	0.04
14.10	21,010	0.10	51.83	11,896	0.05
14.27	38,736	0.18	52.51	43,024	0.20
14.48	106,774	0.49	53.08	66,392	0.30
15.90	502,168	2.30	56.62	11,548	0.05
17.13	148,037	0.68	57.92	4,972	0.02
17.52	128,461	0.59	59.19	17,956	0.08
20.09	179,739	0.82	59.44	14,557	0.07
21.16	9,687	0.04	60.66	96,212	0.44
21.71	24,219	0.11	61.25	24,519	0.11
22.76	33,016	0.15	61.52	180,751	0.83
23.10	52,737	0.24	62.21	54,015	0.25
23.71	30,862	0.14	63.29	418,731	1.92
24.51	17,657	0.08	63.45	253,455	1.16
24.86	17,830	0.08	63.59	393,339	1.80
25.31	34,413	0.16	64.25	83,460	0.38
26.69	16,971	0.08	64.76	29,533	0.14
27.80	16,104	0.07	65.32	25,936	0.12
28.20	31,427	0.14	66.77	207,520	0.95
28.51	50,698	0.23	66.94	135,790	0.62
29.08	72,509	0.33	86.12	46,918	0.22
30.13	266,689	1.22	86.27	26,218	0.12
32.08	289,061	1.33	86.50	68,218	0.31
33.20	616,038	2.83			

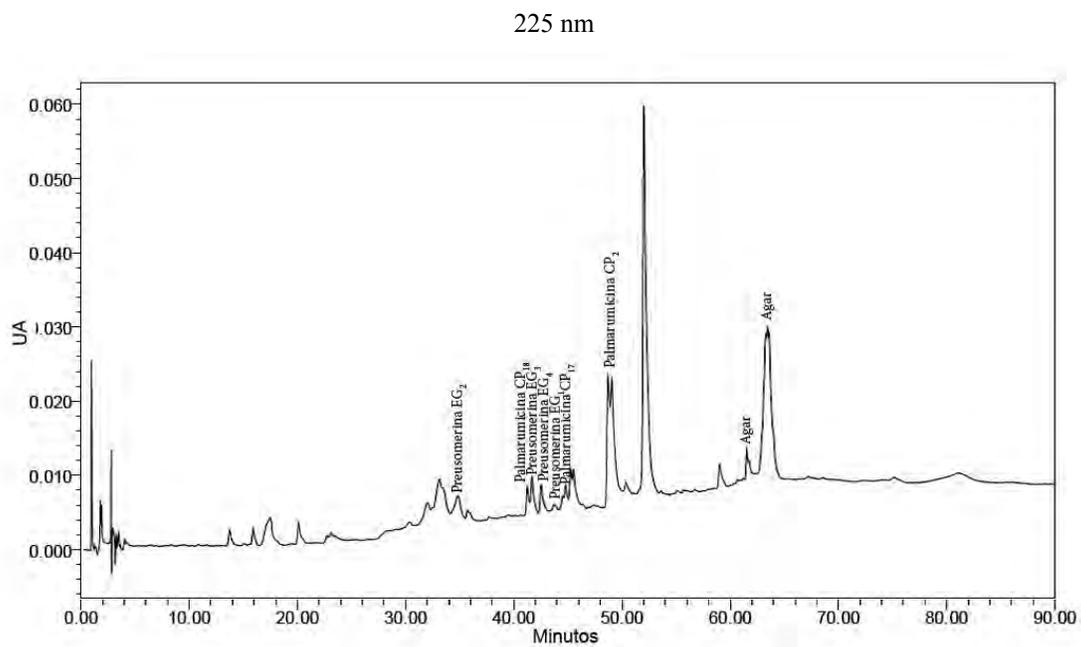
**Figura 36.** Cromatogramas del extracto de la zona de no interacción de *P. capsici* de los bioensayos de antagonismo (P. cap NI)



**Cuadro 33.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de la zona de interacción del bioensayo de antagonismo entre *E. gomezpompae* y *P. capsici* (E. y P. I) bajo las condiciones de análisis para *P. capsici*

E. Y P. I					
225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.55	12,181	0.19	42.53	83,764	1.24
0.86	17,689	0.28	43.75	30,859	0.34
0.97	128,728	2.06	44.53	33,723	0.54
1.29	29,136	0.47	44.80	63,520	1.02
1.80	71,276	1.14	45.26	81,133	1.30
1.90	116,082	1.86	45.52	124,067	1.98
2.50	48,064	0.77	46.34	12,533	0.20
2.62	39,463	0.63	47.37	8,793	0.14
2.80	58,286	0.93	48.71	307,370	4.91
2.93	89,130	1.42	49.06	477,412	7.63
3.27	33,534	0.54	50.36	86,720	1.39
3.49	70,556	1.13	51.03	20,343	0.33
4.04	26,458	0.42	52.03	1,258,566	20.12
4.17	9,959	0.16	53.60	4,728	0.08
13.75	35,426	0.65	55.14	8,945	0.14
15.05	5,399	0.09	56.74	4,977	0.08
15.92	41,007	0.74	59.02	75,395	1.21
17.50	178,142	1.16	60.38	6,126	0.10
20.11	56,346	0.90	60.68	16,033	0.26
22.77	13,802	0.26	60.98	8,225	0.13
23.12	24,800	0.32	61.22	12,597	0.20
28.40	44,231	0.25	61.52	59,353	0.95
29.05	32,560	0.25	61.76	66,361	1.06
29.84	20,911	0.26	62.36	15,225	0.24
30.38	70,533	0.44	63.28	402,838	6.44
32.01	166,261	1.13	63.45	357,816	5.72
32.49	44,322	0.89	63.63	309,954	4.95
33.12	395,311	2.02	67.20	4,506	0.07
34.83	188,068	1.19	75.11	11,571	0.18
35.72	46,216	0.49	80.90	18,686	0.30
37.73	5,566	0.11	63.63	309,954	4.95
39.51	4,825	0.07	67.20	4,506	0.07
41.26	59,369	1.22	75.11	11,571	0.18
41.68	100,398	1.60	80.90	18,686	0.30

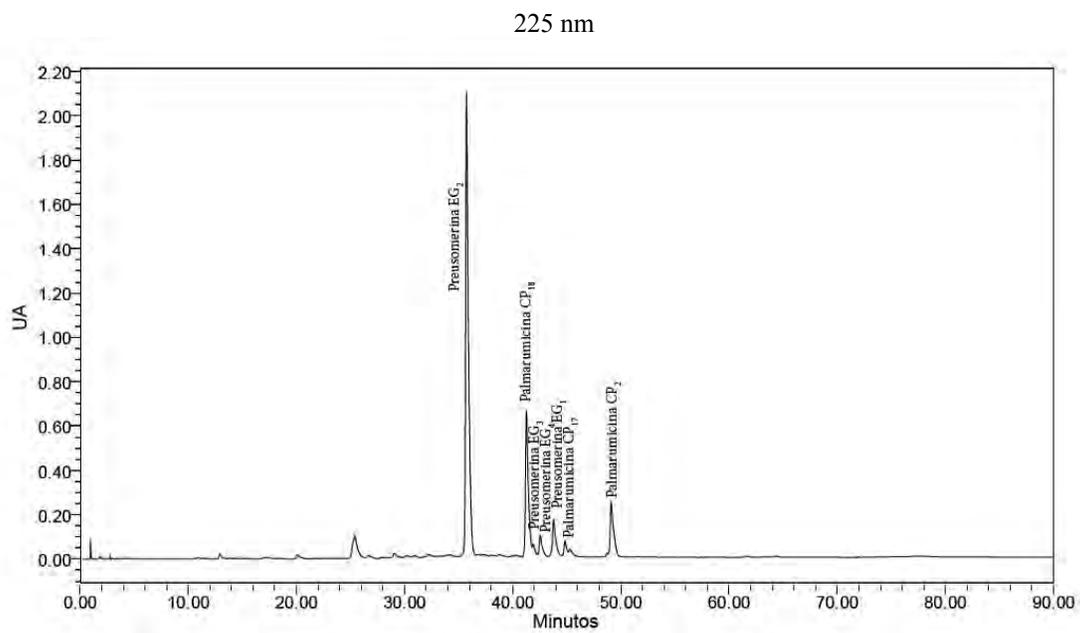
**Figura 37.** Cromatogramas del extracto de la zona de interacción del bioensayo de antagonismo entre *E. gomezpompae* y *P. capsici* (E. y P. I) bajo las condiciones de análisis para *P. capsici*



**Cuadro 34.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de *P. capsici* del bioensayo de potencial antifúngico a 125 µg/mL (P 125)

P 125					
225 nm					
TR (min)	área (µV s)	% área	TR (min)	área (µV s)	% área
0.97	308,871	0.40	31.33	69,724	0.09
1.30	18,470	0.02	32.20	351,166	0.46
1.85	179,436	0.23	32.40	258,668	0.34
2.52	31,219	0.04	32.85	97,674	0.13
2.67	33,345	0.04	33.11	127,941	0.17
2.80	40,060	0.05	33.46	129,944	0.17
2.94	74,036	0.10	33.89	271,992	0.35
3.27	35,836	0.05	34.15	250,112	0.33
3.47	48,736	0.06	34.37	247,156	0.32
3.69	29,685	0.04	35.73	38,296,667	49.81
4.04	40,764	0.05	36.70	124,345	0.16
4.16	29,306	0.04	36.86	221,283	0.29
4.35	57,877	0.08	37.18	178,639	0.23
4.52	85,898	0.11	37.38	318,052	0.41
5.27	38,708	0.05	37.93	214,976	0.28
5.54	36,203	0.05	38.30	155,233	0.20
6.21	18,142	0.02	38.69	137,401	0.18
10.31	6,806	0.01	38.86	345,682	0.45
10.89	131,497	0.17	40.00	182,112	0.24
11.47	60,006	0.08	40.36	229,396	0.30
12.92	420,470	0.55	41.27	12,218,160	15.89
13.78	66,984	0.09	41.91	1,008,268	1.31
14.32	18,419	0.02	42.54	1,994,086	2.59
14.54	45,260	0.06	43.78	3,654,923	4.75
15.16	35,417	0.05	44.83	1,311,243	1.71
15.59	34,302	0.04	45.30	837,965	1.09
17.03	67,694	0.09	46.42	14,678	0.02
18.39	27,703	0.04	47.61	14,303	0.02
20.12	424,626	0.55	48.11	17,759	0.02
21.72	19,717	0.03	48.73	200,905	0.26
22.52	6,671	0.01	49.11	5,498,759	7.15
23.76	8,796	0.01	51.24	10,383	0.01
24.07	5,111	0.01	51.59	34,589	0.04
24.45	5,355	0.01	52.04	14,265	0.02
25.39	3,309,392	4.30	52.70	6,165	0.01
26.64	365,297	0.48	53.86	8,072	0.01
27.88	62,144	0.08	54.29	9,972	0.01
28.14	55,046	0.07	61.53	105,030	0.14
28.59	58,202	0.08	63.47	41,495	0.05
29.05	497,057	0.65	63.61	29,061	0.04
29.61	77,717	0.10	64.31	89,289	0.12
30.10	170,506	0.22	75.18	15,419	0.02
30.35	178,683	0.23	77.25	20,457	0.03
30.91	255,449	0.33			

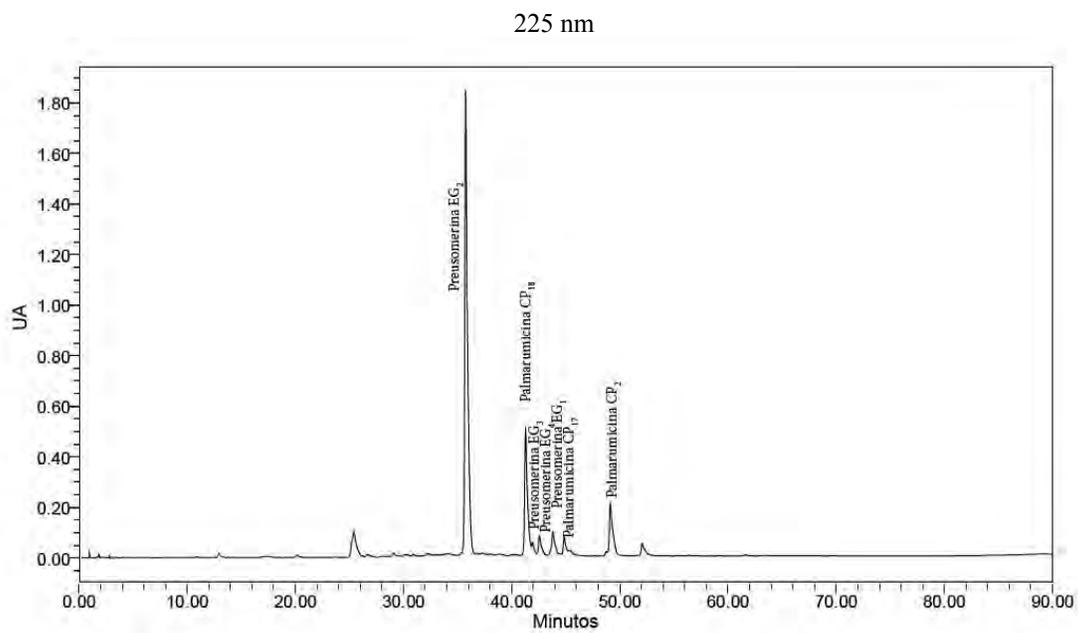
**Figura 38.** Cromatogramas del extracto *P. capsici* del bioensayo de potencial antifúngico a 125 µg/mL (P 125)



**Cuadro 35.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de *P. capsici* del bioensayo de potencial antifúngico a 250 µg/mL (P 250)

P 250					
225 nm					
TR (min)	área (µV s)	% área	TR (min)	área (µV s)	% área
0.98	82,314	0.12	32.21	331,877	0.49
1.32	5,351	0.01	32.42	229,222	0.34
1.84	105,638	0.16	32.87	100,678	0.15
2.67	12,692	0.02	33.14	123,279	0.18
2.81	45,523	0.07	33.44	144,260	0.21
2.95	85,967	0.13	33.91	302,861	0.45
3.27	40,876	0.06	34.16	157,722	0.23
3.49	50,794	0.08	34.35	340,725	0.50
3.67	37,797	0.06	35.74	33,393,818	49.33
4.06	47,626	0.07	36.71	159,547	0.24
4.16	28,296	0.04	36.86	171,985	0.25
4.36	44,807	0.07	37.19	189,984	0.28
4.45	86,431	0.13	37.37	321,132	0.47
5.27	37,293	0.06	37.94	228,143	0.34
5.56	44,681	0.07	38.31	165,016	0.24
6.19	18,563	0.03	38.69	126,368	0.19
10.31	4,502	0.01	38.89	190,043	0.28
10.90	65,664	0.10	39.17	178,116	0.26
11.48	25,023	0.04	40.01	201,187	0.30
12.14	8,371	0.01	40.38	227,091	0.34
12.93	316,355	0.47	41.29	9,324,854	13.77
13.77	35,819	0.05	41.93	1,019,951	1.51
14.15	11,873	0.02	42.56	1,721,328	2.54
14.29	18,096	0.03	43.81	2,386,726	3.53
14.67	17,186	0.03	44.85	1,442,684	2.13
15.12	20,977	0.03	45.33	868,340	1.28
15.57	22,926	0.03	47.68	52,563	0.08
17.13	115,145	0.17	48.12	38,107	0.06
17.64	166,660	0.25	48.75	244,538	0.36
18.38	49,013	0.07	49.12	4,691,676	6.93
20.13	227,996	0.34	50.37	57,878	0.09
21.73	9,554	0.01	50.80	38,327	0.06
22.54	5,257	0.01	51.26	18,301	0.03
23.67	6,439	0.01	51.62	49,679	0.07
23.77	8,557	0.01	52.07	1,289,248	1.90
24.09	4,584	0.01	53.65	10,094	0.01
24.47	6,840	0.01	53.86	19,167	0.03
25.41	3,108,629	4.59	54.27	14,902	0.02
26.66	229,215	0.34	55.23	4,600	0.01
26.93	91,711	0.14	56.38	39,407	0.06
27.90	60,356	0.09	59.10	21,302	0.03
28.17	52,522	0.08	61.54	80,120	0.12
28.61	66,664	0.10	62.28	5,091	0.01
29.06	387,580	0.57	63.47	55,825	0.08
29.63	75,039	0.11	63.67	21,395	0.03
30.11	183,481	0.27	64.32	26,448	0.04
30.35	170,663	0.25	65.52	6,462	0.01
30.92	254,818	0.38	69.45	7,364	0.01
31.34	76,814	0.11	88.70	181,206	0.27

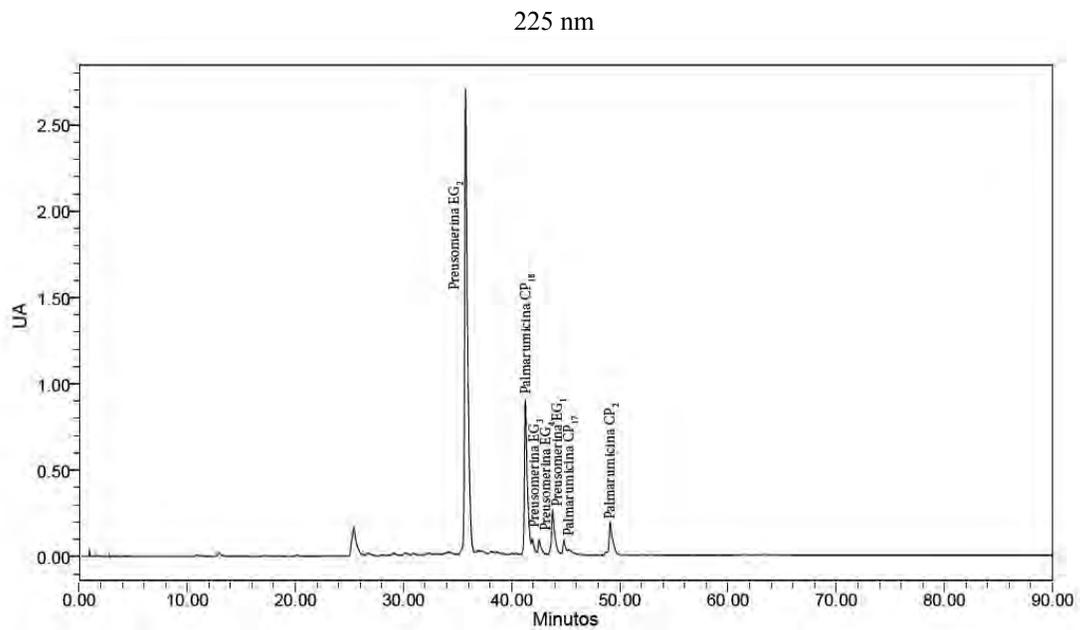
**Figura 39.** Cromatogramas del extracto *P. capsici* del bioensayo de potencial antifúngico a 250 µg/mL (P 250)



**Cuadro 36.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del extracto de *P. capsici* del bioensayo de potencial antifúngico a 500 µg/mL (P 500)

P 250					
225 nm					
TR (min)	área (µV s)	% área	TR (min)	área (µV s)	% área
0.98	82,314	0.12	32.21	331,877	0.49
1.32	5,351	0.01	32.42	229,222	0.34
1.84	105,638	0.16	32.87	100,678	0.15
2.67	12,692	0.02	33.14	123,279	0.18
2.81	45,523	0.07	33.44	144,260	0.21
2.95	85,967	0.13	33.91	302,861	0.45
3.27	40,876	0.06	34.16	157,722	0.23
3.49	50,794	0.08	34.35	340,725	0.50
3.67	37,797	0.06	35.74	33,393,818	49.33
4.06	47,626	0.07	36.71	159,547	0.24
4.16	28,296	0.04	36.86	171,985	0.25
4.36	44,807	0.07	37.19	189,984	0.28
4.45	86,431	0.13	37.37	321,132	0.47
5.27	37,293	0.06	37.94	228,143	0.34
5.56	44,681	0.07	38.31	165,016	0.24
6.19	18,563	0.03	38.69	126,368	0.19
10.31	4,502	0.01	38.89	190,043	0.28
10.90	65,664	0.10	39.17	178,116	0.26
11.48	25,023	0.04	40.01	201,187	0.30
12.14	8,371	0.01	40.38	227,091	0.34
12.93	316,355	0.47	41.29	9,324,854	13.77
13.77	35,819	0.05	41.93	1,019,951	1.51
14.15	11,873	0.02	42.56	1,721,328	2.54
14.29	18,096	0.03	43.81	2,386,726	3.53
14.67	17,186	0.03	44.85	1,442,684	2.13
15.12	20,977	0.03	45.33	868,340	1.28
15.57	22,926	0.03	47.68	52,563	0.08
17.13	115,145	0.17	48.12	38,107	0.06
17.64	166,660	0.25	48.75	244,538	0.36
18.38	49,013	0.07	49.12	4,691,676	6.93
20.13	227,996	0.34	50.37	57,878	0.09
21.73	9,554	0.01	50.80	38,327	0.06
22.54	5,257	0.01	51.26	18,301	0.03
23.67	6,439	0.01	51.62	49,679	0.07
23.77	8,557	0.01	52.07	1,289,248	1.90
24.09	4,584	0.01	53.65	10,094	0.01
24.47	6,840	0.01	53.86	19,167	0.03
25.41	3,108,629	4.59	54.27	14,902	0.02
26.66	229,215	0.34	55.23	4,600	0.01
26.93	91,711	0.14	56.38	39,407	0.06
27.90	60,356	0.09	59.10	21,302	0.03
28.17	52,522	0.08	61.54	80,120	0.12
28.61	66,664	0.10	62.28	5,091	0.01
29.06	387,580	0.57	63.47	55,825	0.08
29.63	75,039	0.11	63.67	21,395	0.03
30.11	183,481	0.27	64.32	26,448	0.04
30.35	170,663	0.25	65.52	6,462	0.01
30.92	254,818	0.38	69.45	7,364	0.01
31.34	76,814	0.11	88.70	181,206	0.27

**Figura 40.** Cromatogramas del extracto *P. capsici* del bioensayo de potencial antifúngico a 500 µg/mL (P 500)



**Cuadro 37.** Datos obtenidos en el análisis por CLAR del APD bajo las condiciones de análisis para *P. capsici*

APD					
225 nm					
TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área	TR (min)	área ( $\mu\text{V s}$ )	% área
0.94	532,377	3.54	32.51	45,656	0.30
1.29	9,412	0.06	33.34	633,679	4.21
1.97	199,173	1.32	33.99	96,463	0.64
2.01	173,682	1.15	34.73	641,827	4.27
2.18	287,439	1.91	35.73	262,065	1.74
2.80	83,339	0.55	36.04	197,208	1.31
2.95	105,682	0.70	36.62	81,713	0.54
3.23	23,264	0.15	37.69	246,547	1.64
3.27	38,430	0.26	38.35	135,017	0.90
3.68	32,963	0.22	39.28	44,902	0.30
4.04	161,220	1.07	39.57	42,755	0.28
4.48	368,264	2.45	39.90	50,747	0.34
5.30	19,333	0.13	40.31	29,270	0.19
6.18	31,478	0.21	40.60	59,247	0.39
7.41	18,849	0.13	40.84	49,141	0.33
8.67	63,891	0.42	41.27	76,832	0.51
8.94	40,200	0.27	41.70	77,294	0.51
9.68	16,820	0.11	42.54	66,846	0.44
10.30	84,849	0.56	42.91	70,351	0.47
10.86	71,348	0.47	43.78	97,193	0.65
11.65	220,279	1.46	44.41	31,408	0.21
12.97	151,453	1.01	44.82	42,523	0.28
13.30	73,390	0.49	45.27	24,156	0.16
13.83	74,848	0.50	45.55	46,840	0.31
14.36	70,524	0.47	46.13	24,695	0.16
15.17	49,574	0.33	47.48	17,301	0.11
15.52	74,458	0.49	47.76	15,131	0.10
16.72	21,031	0.14	48.73	257,036	1.71
17.21	20,007	0.13	48.89	216,391	1.44
17.71	37,311	0.25	49.05	616,314	4.10
18.71	61,347	0.41	51.07	8,781	0.06
20.10	73,462	0.49	52.66	6,543	0.04
21.91	14,011	0.09	55.20	20,010	0.13
25.36	12,921	0.09	57.90	11,141	0.07
27.43	18,006	0.12	60.70	7,314	0.05
28.37	80,813	0.54	60.78	7,993	0.05
29.14	64,226	0.43	61.52	1,742,018	11.58
29.55	42,917	0.29	63.45	127,429	0.85
29.80	43,624	0.29	63.61	62,514	0.42
30.19	59,290	0.39	64.30	4,476,948	29.75
30.54	78,613	0.52	65.03	84,136	0.56
31.82	347,300	2.31	75.21	68,131	0.45
32.17	75,375	0.50			

**Figura 41.** Cromatogramas del APD bajo las condiciones de análisis para *P. capsici*

