



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**POTENCIAL FITOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS Y
PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR
LAS VARIANTES MORFOLÓGICAS DE *Edenia gomezpompae*:
EFECTO SOBRE LA RESPIRACIÓN Y LA FOTOSÍNTESIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
MARÍA EMMA RUIZ VELASCO SOBRINO



MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
VOCAL: Dr. José Fausto Rivero Cruz
SECRETARIO: Dra. Irma Susana Rojas Tomé
1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. SUPLENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATORIO 1-4. PRODUCTOS NATURALES
FACULTAD DE QUÍMICA. CIUDAD UNIVERSITARIA.
UNAM

ASESORA DEL TEMA:
DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

SUSTENTANTE:
MARÍA EMMA RUIZ VELASCO SOBRINO

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, nuestra máxima casa de estudios, por darme la oportunidad de vivir esta increíble experiencia de vida.

A la **Facultad de Química** y todos sus excelentes maestros, por brindarme la formación académica y las herramientas necesarias para desarrollarme en el mundo profesional y personal.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo, a través de los proyectos 81017 y 179194, y por la beca otorgada a través de ellos (número de becario: 16134).

A la **Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava** por permitirme participar en su grupo de trabajo, y ayudarme a desarrollar mi tesis; por transmitirme conocimiento y herramientas, por su enseñanza tanto de la vida profesional y de investigación, como de la vida personal. Por toda la paciencia que me tuvo durante ese período de aprendizaje, y todos los desvelos que por mi culpa tuvo; por su gran calidad humana, por escucharme, por sus excelentes consejos y su apoyo incondicional en todo momento.

Al **Instituto de Química** por permitirme realizar mi trabajo de tesis, y por el apoyo proporcionado durante mi estancia.

A la **Dra. Irma Susana Rojas Tomé** y al **Dr. José Fausto Rivero Cruz**, por su tiempo y observaciones que enriquecieron el presente trabajo.

A la **Dra. Ana Luisa Anaya** por permitirme desarrollar la parte inicial de mi investigación en el laboratorio de Alelopatía.

A la **Q.A. Blanca E. Hernández Bautista** por su invaluable compañía, amistad y apoyo cuando lo necesité.

A **Tere Romero** y a **Teresita Caudillo**, por su apoyo incondicional y su amistad.

Al **Laboratorio 116 del Conjunto E** de la Facultad de Química, en especial al **Dr. Blas Lotina Hensen** y a la **M. en C. Beatriz King Días** por su apoyo y enseñanza durante los experimentos de la fotosíntesis.

A mis compañeros y amigos de grupo de trabajo: **Jordi, Claudio, Rosita, Paulette, Lety, Kari, Lore, Marbella, Eva, Álvaro, Mariana, Félix** y **Olivia** que me compartieron herramientas y apoyaron con mi tesis, y me brindaron su amistad, apoyo incondicional, consejos de vida, y me hicieron sonreír en todo momento.

Dedicatorias

Le doy gracias a Dios, quien me ha permitido siempre lograr mis objetivos, minimizando la adversidad, y me deja una enseñanza en cada episodio; quien me ha permitido ser feliz.

Le dedico mi tesis a mi mamá, Emma, quien con su ejemplo y su amor me enseñó a enfrentar la vida, siendo una persona honesta, fuerte, responsable y tenaz; que me enseñó que no hay obstáculos que no se puedan superar, y que la mejor recompensa es el fruto del esfuerzo y la perseverancia. Al “Prof”, Antonio, por su incondicional apoyo, cariño, confianza y buenos consejos; por compartir su vida con nosotros y hacernos pasar momentos inolvidables juntos.

A mi papá, Miguel, quien con su cariño me ha apoyado en todo momento, quien me ha hecho sonreír hasta en los momentos más difíciles, y que sé que siempre estará a mi lado cuando lo necesite.

A mi abuelita, Ma. Dolores, quien me enseñó a ser una mujer buena y con valores; por la formación que me inculcó y tiempo en el que me cuidó con tanto cariño. A mis tíos y primos, por siempre ser tan amorosos; por todos sus consejos de vida y por su apoyo incondicional; por compartir con nosotros felices momentos.

A mi hermano Miguel, quien como hermano grande me cuidó y me ha enseñado cosas de la vida desde que yo era pequeña, y que estimo muchísimo. A Katya y Pili, quienes, aunque aparecieron en mi vida hace no mucho tiempo, las quiero y tengo en mi corazón.

A mi hermana y mejor amiga Loli, quien ha sido mi inseparable compañera de vida, quien me ha acompañado en mis mejores momentos, y me ha tendido la mano en las peores situaciones; que me ha cuidado y no me ha dejado caer; que me ha escuchado, regañado, y me ha hecho reír; pero sobre todo, ha hecho cada parte de mi vida muy feliz.

A mis amigos, aquéllas increíbles personas que Dios ha puesto en mi camino: Sandra, Ruth, Sofi, Itzel, Paulina, Paty, Óscar, Yazmín, Mau, Pily, Memo, Aracelia, Ana, Gaby, Fer, María José, Abraham, Natalia, Marco, y todos los que aquí no menciono. Muchas gracias a todos por brindarme su sincera amistad, por quererme como soy, y compartirme lo mejor de ustedes; por acompañarme en las buenas y apoyarme en las malas; por su alegría, consejos, paciencia y sabiduría. Los llevo en mi corazón.

A Andrés, quien en poco tiempo se ha ganado mi corazón, por todo el apoyo que me ha dado, y los excelentes momentos que hemos tenido juntos.

A todos ustedes, ¡muchísimas gracias!

Índice

Lista de Cuadros.....	ix
Lista de Figuras	xi
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
1. Plaguicidas.....	3
1.1 Herbicidas	4
2. Las plantas.....	7
2.1 Germinación y crecimiento de la raíz.....	7
2.2 Inhibidores de la germinación y del crecimiento de la raíz.....	9
2.3 Respiración	9
2.4 Inhibidores de la respiración mitocondrial	13
2.5 Fotosíntesis.....	14
2.6 Inhibidores de la fotosíntesis.....	20
3. Impacto toxicológico, ecológico y económico de los plaguicidas.....	23
4. Microorganismos como fuente de metabolitos secundarios con actividad herbicida	24
4.1 Hongos endófitos	33
4.2 El hongo endófito <i>Edenia gomezpompae</i>	34
4.3 Metabolitos secundarios producidos por <i>Edenia gomezpompae</i>	36
III. Hipótesis	42
IV. Objetivos	43
V. Metodología	45

1. Material fúngico	45
2. Composición de los medios de cultivo para el crecimiento de las variantes morfológicas del hongo endófito <i>E. gomezpompae</i>	45
3. Cultivo de las variantes morfológicas de <i>Edenia gomezpompae</i> y obtención de los extractos orgánicos	46
3.1 Cultivo en condiciones estáticas de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i>	46
3.2 Obtención de los extractos orgánicos del medio y del micelio	46
4. Obtención de los bisnaftoespirocetales producidos por <i>E. gomezpompae</i>	47
5. Evaluación del potencial fitotóxico en plantas	47
6. Evaluación de los extractos orgánicos y compuestos puros en la respiración mitocondrial	49
6.1 Extracción de mitocondrias	49
6.2 Medición de la respiración mitocondrial	50
7. Evaluación de los extractos orgánicos y compuestos puros sobre la fotosíntesis	50
7.1 Aislamiento de los cloroplastos	50
7.2 Cuantificación de la clorofila	51
7.3 Medición de la Síntesis de ATP	52
7.4 Medición de la velocidad de transporte de electrones	52
7.5 Medición del flujo de electrones de los PS II y PS I	53
7.6 Determinación del T_e^- desacoplado en las reacciones parciales del PS II ...	54
8. Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> empleando CLAR	55
VI. Resultados y discusión	56
1. Cultivo en pequeña escala de las variantes morfológicas de <i>Edenia gomezpompae</i>	57

2. Evaluación del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos sobre tres plantas de prueba.....	58
3. Evaluación del potencial fitotóxico de las preusomerinas y palmarumicinas producidas por <i>E. gomezpompae</i> sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de tres plantas de prueba.....	65
4. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos y compuestos puros de <i>E. gomezpompae</i> sobre respiración mitocondrial	74
5. Efecto de los extractos orgánicos y de los compuestos puros de <i>E. gomezpompae</i> sobre fotosíntesis	76
5.1 Síntesis de ATP	77
5.2 Transporte de electrones	79
5.3 Reacciones parciales del Fotosistema I (PS I) y Fotosistema II (PS II).....	82
6. Análisis por CLAR de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i>	89
VII. Conclusiones.....	92
VIII. Perspectivas.....	96
IX. Referencias	97
X. Anexos	107

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas de mayor uso y su organismo blanco.	3
Cuadro 2. Inhibidores de los complejos de la cadena transportadora de electrones.....	14
Cuadro 3. Inhibidores de los fotosistemas fotosintéticos más utilizados.	22
Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que inhiben a las plantas.....	26
Cuadro 5. Preusomerinas, palmarumicinas y compuestos relacionados con actividad biológica.	39
Cuadro 6. Rendimientos de los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo y de las cuatro variantes del hongo endófito <i>E. gomezpompae</i> cultivados en pequeña escala.	57
Cuadro 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>L. sativa</i> , expresado en valores de CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$).	64
Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los compuestos puros aislados de <i>E. gomezpompae</i> sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> a 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	69
Cuadro 9. Efecto fitotóxico de los compuestos puros aislados de <i>E. gomezpompae</i> sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de <i>S. lycopersicum</i> a 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	70
Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los compuestos puros aislados de <i>E. gomezpompae</i> sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de <i>E. crus-galli</i> a 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	71
Cuadro 11. Efecto fitotóxico de los preusomerinas y palmarumicinas producidas por el hongo endófito <i>E. gomezpompae</i> sobre la germinación, crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>E. crus-galli</i> , expresado en valores de CI_{50} (μM).....	72

Cuadro 12. Valores de Cl_{50} para la síntesis de ATP, Te^- basal, fosforilante y desacoplado, y las reacciones parciales del PS II, PS I, H_2O a SiMo y DPC a DCPIP de los extractos orgánicos de las cuatro variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> y las Pr EG ₁ , Pr EG ₄ , Pa CP ₂ y Pa CP ₁₇	88
Cuadro 13. Análisis por CLAR de las preusomerinas y palmarumicinas presentes en los extractos orgánicos de las variantes morfológicas del hongo endófito <i>E. gomezpompae</i>	91

Lista de Figuras

Figura 1. Complejos I-IV y ATP sintasa mitocondriales.....	11
Figura 2. Complejos proteicos de la fase luminosa.	17
Figura 3. Reacción de Hill, transporte de electrones en las reacciones luminosas de la fotosíntesis.	19
Figura 4. <i>Edenia gomezpompae</i> aislado de las hojas de <i>Callicarpa acuminata</i> ; en la Figura 4a se puede observar su aspecto macroscópico en PDA, mientras que en las Figuras 4b y 4c se muestran micrografías de las hifas.....	35
Figura 5. Variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> en cultivos en PDA: C1c, C1e, C1e2a y C1e2b. Las imágenes de arriba muestran la vista superior de los micelios en las cajas Petri, mientras que las imágenes de abajo de la fotografía muestran vista inferior de los cultivos.	35
Figura 6. Secuencia metodológica empleada para el desarrollo de la presente investigación.....	57
Figura 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> a 100 µg/mL sobre la germinación de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>L. sativa</i>	59
Figura 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> a 100 µg/mL sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>L. sativa</i>	60
Figura 9. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> a 100 µg/mL sobre la respiración de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>L. sativa</i>	61
Figura 10. Efecto del extracto orgánico del medio de cultivo (A) y micelio (B) de la variante C1c, sobre el consumo de O ₂ de las plántulas de <i>S. lycopersicum</i>	65
Figura 11. Efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre la germinación de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>L. sativa</i> a 100 µg/mL.....	66

Figura 12. Efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>L. sativa</i> a 100 µg/mL.	67
Figura 13. Efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre la respiración de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>L. sativa</i> a 100 µg/mL	68
Figura 14. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> a 100 (azul) y 200 µg/mL (verde) sobre la respiración en mitocondrias aisladas de <i>S. oleracea</i>	75
Figura 15. Efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre la respiración en mitocondrias aisladas de <i>S. oleracea</i> a 200 µg/mL.	75
Figura 16. Efecto fitotóxico del 2,4-dinitrofenol (control positivo) sobre la respiración en mitocondrias aisladas de <i>S. oleracea</i>	76
Figura 17. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i>	78
Figura 18. Efecto inhibitorio de los compuestos puros evaluados.....	79
Figura 19. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> , sobre el transporte de electrones basal, fosforilante, desacoplado, y sobre las reacciones parciales en el PS II, H ₂ O a SiMo y DPC a DCPIP.....	85
Figura 20. Efecto inhibitorio de los compuestos puros de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> , sobre el transporte de electrones basal, fosforilante, desacoplado, y sobre las reacciones parciales en el PS II, H ₂ O a SiMo y DPC a DCPIP.....	87
Figura 21. Perfiles de HPLC a 225 nm de las diferentes preusomerinas y palmarumicinas presentes en los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de <i>E. gomezpompae</i>	90

Lista de abreviaturas

µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Grados Celsius
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AcOEt	Acetato de etilo
ADP	Adenosina difosfato
ALS	Acetolactato sintasa
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca	Calcio
CCCP	Carbonil cianuro-3-clorofenil hidrazona
CCF	Cromatografía en capa fina
CF ₀	Factor de acoplamiento cero de la ATPasa
CF ₁	Factor de acoplamiento uno de la ATPasa
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
Cit b ₅₆₃	Citocromo b ₅₆₃
Cit b ₆ /f	Citocromo b ₆ /f
Cit f	Citocromo f
Cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CPD	Caldo papa dextrosa
DBMIB	Dibromometilisopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCCD	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbidiimida
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPC	Difenilcarbazida
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EPSPS	Enolpiruvilsiquimato-fosfato sintasa
EtOH	Etanol
FAD ⁺	Flavina adenina dinucleótido oxidada

FADH ₂	Flavina adenina dinucleótido reducida
FCCP	Carbonil cianuro- <i>p</i> -trifluorometoxifenil hidrazona
Fe	Hierro
FMN	Flavina adenina mononucleótido
g	Gramos
GS	Glutamin sintetasa
h	Horas
H ⁺	Protón
H ⁺ -ATPasa	Complejo multienzimático encargado de sintetizar ATP
H ₂ O	Agua
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución (High Precision Liquid Chromatography)
HPPD	Hidroxifenil piruvato desoxigenada
IAA	Ácido indol-3-acético
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianuro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
kD	Kilodaltones
L	Litro
m	Metros
M	Molar
Malonil-CoA	Malonil coenzima A
MeOH	Metanol
Mg	Magnesio
mg	Miligramo
MGDG	Linolato monogalactosildiacilglicerol desaturasa
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mn	Manganeso
MV	Metilviológeno
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
O ₂	Oxígeno molecular
P ₆₈₀	Centro de reacción del PS II
P ₆₈₀ *	Centro de reacción oxidado del PS II
P ₇₀₀	Centro de reacción del PS I
P ₇₀₀ *	Centro de reacción oxidado del PS I

PC	Plastocianina
PDA	Agar papa dextrosa
PEP	Fosfoenolpiruvato
Ph	Feofitina
P _i	Fosfato inorgánico
PMS	Fenacinametasulfato
ppm	Partes por millón
PQ	Plastoquinona
PS I	Fotosistema I
PS II	Fotosistema II
Q	Aceptor primario del PS II
QA	Plastoquinona
QB	Segunda plastoquinona
red	Reducido
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SiMo	Silicomolibdato
Te ⁻	Transporte de electrones
Tricina	<i>N</i> -tri-(hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
%	Porcentaje

I. Introducción

El uso de los plaguicidas en los cultivos de importancia económica (aproximadamente 500,000 toneladas diarias), ha originado una gran preocupación a nivel mundial, en lo que se refiere a garantizar el abasto de alimentos, ya que anualmente ocasionan la pérdida de cerca del 10% de estos recursos, al ser utilizados en forma indiscriminada. A esta situación se suma el inconveniente de que algunas plagas son resistentes a los agroquímicos utilizados actualmente, lo cual incrementa de manera considerable el porcentaje de pérdidas de los cultivos. Por otra parte, la mayoría de las sustancias empleadas, ocasionan la degradación del suelo y permanecen por largos periodos en la vegetación circundante a los plantíos, con lo cual los ecosistemas resultan seriamente afectados. Con el objetivo de enfrentar esta problemática, en las últimas décadas se han intentado aislar compuestos naturales que sean más eficaces y seguros, de manera que puedan ser empleados en sustitución de los agroquímicos que se usan comúnmente (Pimentel, 2001; Strobel *et al.*, 2004).

Un grupo de compuestos de origen natural que han sido ampliamente utilizados como plaguicidas, es el de los llamados alelopáticos, los cuales son sustancias producidas por organismos específicos y que producen efectos dañinos o benéficos sobre otros cuando ambos interactúan en su medio natural. Sin embargo, los investigadores se han enfocado especialmente en estudiar los efectos inhibidores que poseen estas sustancias, con el fin de analizar su posible utilización en estrategias agrícolas, y así proponer un manejo más adecuado y óptimo de los recursos bióticos y que sea menos perjudicial para los ecosistemas (Anaya, 2003; Strobel, 2006).

Dentro de las interacciones que se presentan entre dos o más especies, se encuentra aquella que se establece entre un organismo endófito (bacterias, algas, insectos y hongos) y una planta. Los hongos endófitos pueden interactuar con el hospedero a través de todo su ciclo de vida, o bien, sólo durante una fase, sin causarle, aparentemente, ningún daño o beneficio, estableciéndose una relación de antagonismo balanceado. Cabe mencionar que, tanto la planta como el hongo endófito, pueden producir metabolitos

secundarios que los beneficien en forma directa o que antagonicen a sus depredadores. Este tipo de interacciones permite observar que los organismos no se asocian en forma aleatoria, sino que lo hacen con la finalidad de procurar mutuamente su defensa y su supervivencia (Tan y Zou, 2001; Stone *et al.*, 2004).

Las investigaciones recientes han conducido al descubrimiento de metabolitos producidos por hongos endófitos que pueden ser aplicados para el desarrollo de medicamentos (Strobel, 2006), agroquímicos (Schulz *et al.*, 2002; Strobel *et al.*, 2004) y para el estudio de los efectos de las interacciones químicas entre organismos (Schulz y Boyle, 1999). Estos estudios han permitido determinar que los compuestos aislados de los hongos endófitos generalmente presentan estructuras químicas muy novedosas, lo cual proporciona la posibilidad de encontrar sustancias que actúen sobre blancos de acción fisiológica específicos.

En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo determinar el potencial alelopático de los metabolitos producidos por las variantes morfológicas del hongo endófito *Edenia gomezpompae*, el cual, en estudios previos, ha demostrado un efecto antagonista significativo hacia hongos fitopatógenos (Macías *et al.*, 2008; Meléndez, 2009). En esta disertación se analiza el efecto de *E. gomezpompae* sobre la germinación y el crecimiento radicular de tres especies vegetales, así como sobre la respiración durante el proceso de germinación y la actividad fotosintética en cloroplastos, con lo cual se pretende establecer la viabilidad de esta especie para ser utilizada como una fuente de productos naturales con actividad plaguicida.

II. Antecedentes

1. Plaguicidas

De acuerdo al artículo 2° del *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas*, publicado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), un plaguicida o pesticida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. Incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte (FAO, 1990).

Considerando el organismo blanco, los plaguicidas se clasifican como insecticidas, herbicidas, fungicidas, antivirales, bactericidas, nematocidas, avicidas, alguicidas, mitocidas (acaricidas), molusquicidas, ovicidas, piscicidas, rodenticidas, reguladores del crecimiento de insectos, repelentes reguladores del crecimiento de plantas, defoliantes, desecantes, y agentes atrayentes. En el Cuadro 1 se presenta la clasificación química de los plaguicidas de uso más común según el organismo en el que actúan (Gavrilescu, 2005).

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas de mayor uso y su organismo blanco (Gavrilescu, 2005).

Clase de plaguicida	Clasificación química
Insecticidas	Organoclorados, organofosforados, ésteres de carbamato, piretroides
Fungicidas	Hexaclorobenceno, organomercuriales, pentaclorofenol, ftalimidas, ditiocarbamatos
Herbicidas	Compuestos clorofenoxi, derivados biperidílicos
Rodenticidas	Fosfuro de zinc, ácido fluoroacético, anticoagulante α -naftil tiourea (ANTU)

1.1 Herbicidas

Los herbicidas son un tipo de plaguicidas, y son compuestos diseñados para matar o lesionar a tipos específicos de plantas no deseadas en un cultivo determinado. Su función es bastante selectiva, afectando principalmente el crecimiento o viabilidad de la planta blanco. De acuerdo a la FAO (1990) por el lugar de aplicación, éstos se dividen en:

- Herbicidas de contacto. Ejercen su toxicidad en el lugar de aplicación.
- Herbicidas sistémicos. Tienen efecto en otro lugar diferente al de aplicación.
- Herbicidas residuales. Se aplican en el suelo y tienen que persistir un tiempo para ser efectivos.

Por otra parte, de acuerdo con el método de aplicación que tienen, se clasifican en (Copping *et al.*, 1998):

- Herbicidas de pre-siembra. Se utilizan directamente sobre el suelo antes de sembrar el cultivo y de que emerjan las malezas.
- Herbicidas pre-emergentes. Se emplean después de que fue sembrado el cultivo, pero antes de que éste y las malezas emerjan.
- Herbicidas post-emergentes. Se aplican después de que emergieron las malezas, aunque no necesariamente haya emergido el cultivo.

Aunque no se ha determinado el mecanismo de acción de todos los herbicidas utilizados comercialmente, el 60% de aquéllos que fueron introducidos en los últimos 40 años, interfieren con la función de los cloroplastos. A continuación se describen los mecanismos de acción más comunes (Wakabayashi, 2002):

1. **Síntesis y destrucción de los pigmentos fotosintéticos y componentes relacionados.** Interfieren con la síntesis de los pigmentos fotosintéticos, clorofilas y carotenoides, y son comúnmente llamados “decolorantes”, debido a que, éste es un

síntoma común después de su aplicación. Este tipo de herbicidas se divide en tres grandes grupos:

- **Inhibidores de la biosíntesis de la clorofila.** Dentro de éstos se encuentran aquéllos que causan la formación de hidrocarburos de cadena corta, resultando en la destrucción del pigmento fotosintético; se les conoce como “herbicidas peroxidantes”, debido a que provocan la aparición de radicales libres, que posteriormente dañarán la membrana celular y otros organelos. Ejemplos de estos inhibidores son: metil flutiacet, etil cinidon, azafenidín, pentil flumicorac, pentoxazona y SUAM 16476.
- **Inhibidores de la biosíntesis de carotenos.** Estos compuestos inhiben la enzima fitoen desaturasa (PDS), una enzima indispensable en la biosíntesis de carotenos. Algunos herbicidas que tienen este mecanismo de acción son: picolinafén, fluridona, diflufenican, norflurazon y metoxifenona.
- **Inhibidores de la biosíntesis de la plastoquinona.** La plastoquinona (PQ) es un aceptor de electrones en la síntesis de carotenos, así como en el transporte de electrones fotosintético; los inhibidores actúan mimetizando a la enzima 4-hidroxifenil piruvato desoxigenada (HPPD), que es esencial en su biosíntesis, impidiendo la formación del *p*-hidroxifenilpiruvato (Green *et al.*, 2010). Ejemplos de estos inhibidores son: isoxaflutol, mesotriona, sulcotriona y benzobiciclón.

2. **Metabolismo del amonio y biosíntesis de aminoácidos.** En general, afectan la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos y de los ramificados, así como la asimilación de amonio. En este grupo de compuestos se encuentran el glifosato, glufosinato y bialaphos, sulfonilureas, imidazolinonas, sulfonanilidas y salicilatos.

- **Glifosato.** Es la sal monopotásica o isopropilamínica de la *N*-(fosfometil) glicina, y es uno de los herbicidas más usados a nivel mundial. Su mecanismo de acción es competir fuertemente con el fosfoenolpiruvato (PEP), sustrato de la enzima enolpiruvilsiquimato-fosfato sintasa (EPSPS), inhibiendo así la ruta del ácido siquímico, e impidiendo que se sintetizen los aminoácidos aromáticos esenciales, así como otros

metabolitos de utilidad en la planta. Su éxito reside en sus propiedades fisicoquímicas, bajo costo, buena absorción en el suelo, baja toxicidad en mamíferos, además de ser un herbicida sistémico, por lo que no importa el sitio de aplicación en la planta. Desgraciadamente, el uso indiscriminado de este herbicida ha causado la aparición de malezas resistentes.

- **Glufosinato.** Es otro de los herbicidas más utilizados a nivel mundial, y consiste en la mezcla racémica de la D y L-fosfotricina, mientras que el bialaphos (bilanophos) es solamente el isómero L y el único con actividad herbicida; actúa inhibiendo la glutamin sintetasa (GS), enzima que cataliza la conversión del glutamato a glutamina. La desventaja es que es un herbicida de contacto y es más caro.
- **Sulfonilureas, imidazolinonas, sulfonanilidas y salicilatos.** Actúan inhibiendo la enzima acetolactato sintasa (ALS), enzima encargada de sintetizar aminoácidos ramificados; sin embargo, se han encontrado varias malezas resistentes a las sulfonilureas y a las imidazolinonas. Ejemplos de este grupo de herbicidas son: clorsulfuron, imazaquin, flumetsulam, metil piritiobac, metil bensulfuron y metil primisulfuron.

3. **Biosíntesis de lípidos.** Estos compuestos actúan inhibiendo a tres enzimas que son los principales blancos: la acetil-CoA carboxilasa, la cual convierte acetil-CoA a malonil-CoA; la elongasa, que sintetiza ácidos grasos de cadena muy larga; y la linolato monogalactosildiacilglicerol desaturasa (MGDG). Dentro de los inhibidores de la biosíntesis de lípidos se encuentran el propargil clodinafop, etil quizalofop, tepraloxdim y butroxydim; en los inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga están el cafenstrol, indanofan y flufenacet.

4. **Transporte de electrones en fotosíntesis.** Están considerados como uno de los más importantes debido a su selectividad hacia las plantas (este tema se discute con detalle en el inciso 2.6). Algunos ejemplos de inhibidores del fotosistema II (PS II) son la triazina, herbicidas derivados de la urea e inhibidores de la síntesis de lípidos, mientras que para el fotosistema I (PS I) es el paraquat.

5. **Respiración.** Incluye la inhibición en el Ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa o cadena transportadora de electrones; sin embargo, puede no ser selectivo para el organismo deseado. Algunos ejemplos de inhibidores de la respiración lo constituyen la rotenona, el amital y la antimicina A (este tema se discute con mayor amplitud en el inciso 2.4).

6. **Pared celular y su biosíntesis.** Este mecanismo de acción también es un blanco altamente selectivo; su efecto inhibitorio se restringe a aquellas células que apenas están en crecimiento, por lo que las células diferenciadas, es decir, aquéllas que ya hayan biosintetizado su pared celular, normalmente no son afectadas. Algunos ejemplos son: diclobenil, flupoxam y triaziflam.

7. **Interferencia de auxinas.** Se utilizan análogos del ácido indol-3-acético (IAA), hormona indispensable para el crecimiento de la planta, impidiendo el crecimiento y desarrollo de la planta, por lo que muere. Estos compuestos presentan la ventaja de que a pesar de que se han utilizado por más de 60 años, casi no han generado resistencia (Copping *et al.*, 1998).

2. Las plantas

2.1 Germinación y crecimiento de la raíz

Las semillas son la unidad de reproducción sexual y tienen la función de perpetuar y multiplicar su especie. Para cumplir con este objetivo, deben convertirse en plántulas y después en plantas adultas; todo esto comprende una serie de procesos metabólicos y morfogenéticos, cuyo resultado final es la germinación (García Breijo, 2006).

La germinación consta de tres fases:

- **Hidratación:** es el inicio de la germinación, y consiste en la intensiva toma de agua por la semilla seca (imbibición); esto se acompaña con un aumento en la respiración mitocondrial. Las mitocondrias dentro de las semillas son muy poco diferenciadas debido al proceso de desecación, pero contienen suficientes enzimas del ciclo de Krebs,

así como oxidasas terminales para producir ATP (Bewley y Black, 1985). Para que la germinación se pueda efectuar exitosamente, debe haber un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno para permitir la respiración aerobia, y una temperatura adecuada para que los procesos metabólicos se lleven a cabo (García Breijo, 2006).

- **Germinación:** es cuando se inicia la actividad metabólica que le permitirá desarrollarse; en este paso se disminuye de manera considerable la absorción de agua (García Breijo, 2006).
- **Crecimiento:** es el proceso por el cual la radícula (monocotiledóneas y gimnospermas) o eje embrionario (dicotiledóneas) se extiende rompiendo los tejidos envolventes, y pasa de un metabolismo anaerobio a uno aerobio; se lleva a cabo básicamente por la elongación celular y puede estar acompañado de actividad mitótica. La emergencia indica la finalización de la germinación y el comienzo del crecimiento de la plántula (Bewley y Black, 1985); esta fase es irreversible.

La respiración durante la germinación es el proceso mediante el cual las semillas comienzan la toma de oxígeno disuelto mediante la imbibición; están involucradas tres vías respiratorias: la glucólisis, la vía de las pentosas y el ciclo de Krebs. Este proceso consta de cuatro fases:

- La primera fase inicia con el incremento de la toma de oxígeno debido a la activación y la hidratación de las enzimas mitocondriales que participan en el ciclo de Krebs y en la cadena transportadora de electrones (fosforilación oxidativa). La respiración durante esta fase se incrementa de forma lineal según el grado de hidratación del tejido.
- En la segunda fase, se estabiliza la toma oxígeno o se incrementa de forma lenta; la hidratación de las semillas es completa y todas las semillas son activadas. Presumiblemente, hay un pequeño aumento en los niveles de enzimas respiratorias o en el número de mitocondrias durante este período. En algunas semillas, esta fase puede retardarse si: 1) en alguna estructura se presentan temporalmente condiciones anaerobias; 2) la vía glucolítica se active más rápido que el funcionamiento

mitocondrial, produciéndose una acumulación de piruvato a través de deficiencias en el ciclo de Krebs o en la fosforilación oxidativa.

- La tercera fase indica un segundo incremento respiratorio; esto puede ser atribuido a un incremento de la actividad en mitocondrias nuevas sintetizadas; el número de mitocondrias de los tejidos de reserva también aumentan en asociación a la movilización de las reservas. La germinación se completa durante la segunda y tercera fase.
- Por último, la cuarta fase, la cual sólo ocurre en tejidos almacenados, coincide con la senescencia, seguida del agotamiento de las reservas almacenadas.

2.2 Inhibidores de la germinación y del crecimiento de la raíz

La inhibición en el proceso de germinación puede ser efectuada de distintas maneras, siendo la más notoria y común aquélla que inhibe la respiración de la semilla (Cuadro 2). Otras formas de inhibición incluyen la perturbación del desarrollo celular y la reducción de la formación de la cutícula (Duke, 1990).

2.3 Respiración

La respiración celular es el proceso mediante el cual se obtiene energía en forma de ATP a partir de compuestos orgánicos que son oxidados hasta degradarse; este proceso se lleva a cabo en las mitocondrias. Las mitocondrias son organelos elipsoidales de tamaño alrededor de 0.5 μm de diámetro y 1 μm de longitud, conformados por una membrana externa lisa, un espacio intermembranal y una membrana interna con invaginaciones o crestas mitocondriales (el número de invaginaciones depende del tejido en el que se encuentren), dentro de la cual se encuentra la matriz mitocondrial. También en ellas se encuentra DNA circular, RNA y ribosomas, los cuales están encargados de codificar para algunas de las proteínas mitocondriales. Las mitocondrias llevan a cabo el metabolismo oxidativo, y son consideradas las productoras de energía en la célula (Lehninger, 2005).

La membrana externa contiene una porina, por lo que permite la difusión de moléculas pequeñas (hasta 10 kD) e iones; la membrana interna es impermeable a todas las

moléculas, exceptuando al CO_2 , O_2 y H_2O (permitiendo así la formación del gradiente protónico), y contiene a las proteínas de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa, ambas encargadas de proveer a la célula de energía, así como proteínas de transporte que controlan el paso de metabolitos como ATP, ADP, Ca^{2+} , piruvato y fosfato. En la matriz mitocondrial se lleva a cabo el Ciclo de Krebs, así como la oxidación de los lípidos (Voet *et al.*, 2006).

El proceso de obtención de energía celular comienza con la vía de la glucólisis en el citoplasma o citosol, donde las moléculas de glucosa son enzimáticamente degradadas a piruvato (dos moléculas de piruvato por cada molécula de glucosa), con la formación neta de dos ATP. La ecuación general de la glucólisis es la siguiente (Voet *et al.*, 2006):



A partir de este paso, el NAD^+ debe ser regenerado (oxidado) para volver a ser utilizado en la glucólisis (en su reducción por el 1,3-bifosfoglicerol), por lo cual, el piruvato sufre alguna de las siguientes reacciones: fermentación u oxidación. En condiciones aeróbicas, el piruvato se oxida dentro de las mitocondrias en tres procesos llamados Ciclo de Krebs, cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa.

Una vez obtenido el piruvato en condiciones aeróbicas, es trasladado con ayuda de proteínas transportadoras hacia la matriz mitocondrial, donde se lleva a cabo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o Ciclo de Krebs. El primer paso es convertir enzimáticamente al piruvato en acetil-CoA, que posteriormente se transforma por reacciones de oxidación a citrato, isocitrato, α -oxoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato y oxalacetato, éste último a su vez puede transformarse a citrato, completando el ciclo; también se puede generar oxalacetato mediante la condensación del piruvato con un CO_2 . Este ciclo está mediado por ocho enzimas que trabajan como una unidad funcional, transformando a su sustrato en un producto que a su vez será sustrato de la siguiente enzima. El resultado de este proceso es la producción de dos moléculas de CO_2 por cada acetil-CoA, además de tres NADH, un FADH_2 y un GTP (o ATP); los NADH y el FADH_2 serán oxidados en la fosforilación oxidativa.

Las moléculas de NADH y FADH₂ recién sintetizadas en el Ciclo de Krebs son los sustratos necesarios para el siguiente paso en la respiración; la cadena transportadora de electrones. En este evento, los NADH y el FADH₂ van a ser oxidados, y los electrones generados pasan por los cuatro complejos proteicos embebidos en la membrana interna mitocondrial, que al final van a resultar en la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa). En la Figura 1 están representados los cuatro complejos involucrados en la cadena transportadora de electrones, así como la ATP sintasa. Estos complejos tienen en conjunto más de diez centros redox unidos a ellos y con afinidad electrónica progresivamente mayor (potenciales de reducción estándar creciente) que van a ser reducidos y posteriormente oxidados antes de que los electrones lleguen al O₂ para reducirlo. Los Complejos I, III y IV son los encargados de la oxidación del NADH, generando tres ATP por cada NADH, mientras que el FADH₂ es oxidado en los Complejos II, III y IV, y se generan dos ATP por cada FADH₂. Para este proceso es necesario el transporte del P_i del citosol hacia el interior de la mitocondria, así como mantener constante la concentración citoplásmica de Ca²⁺, por lo que se necesitan proteínas transportadoras específicas.

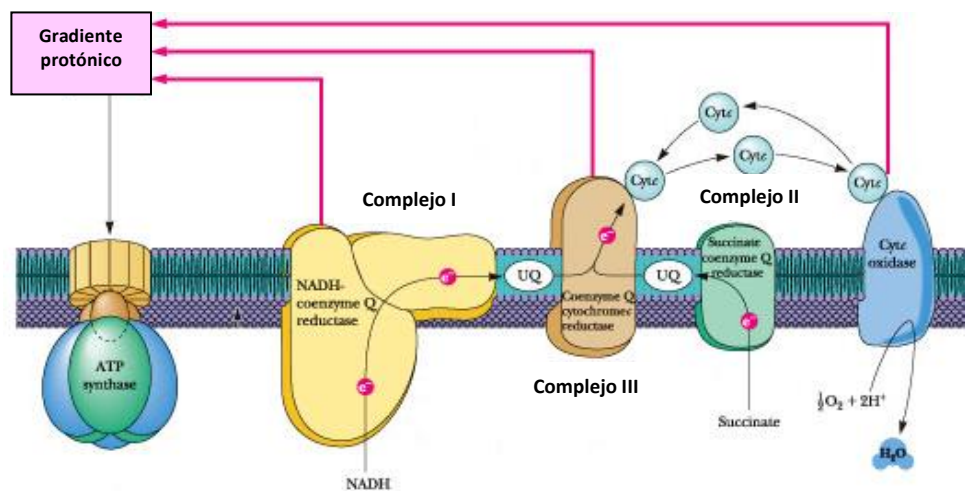
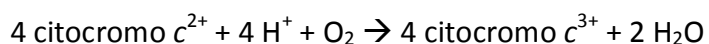


Figura 1. Complejos I-IV y ATP sintasa mitocondriales.

El Complejo I (NADH-CoQ reductasa) contiene mononucleótidos de flavina (FMN) y entre seis y siete agrupaciones Fe-S; este complejo transfiere los electrones del NADH a la coenzima Q o ubiquinona (CoQ), que es una pequeña molécula no polar que se difunde a través de la membrana. El Complejo II (succinato-CoQ reductasa) contiene la enzima succinato deshidrogenasa que transfiere sus electrones a partir del succinato también a CoQ, pero a partir del FADH₂ y una agrupación Fe-S. Posteriormente, el CoQ de los Complejos I y II transfiere sus electrones al Complejo III (CoQ-citocromo c reductasa), el cual contiene dos citocromos *b*, una agrupación Fe-S y un citocromo *c*₁; entonces, los electrones del citocromo *c*₁ son transferidos al citocromo *a* del Complejo IV (citocromo c oxidasa) a través de la proteína de membrana citocromo *c* (que se asocia alternativamente al Complejo III o IV). Así, el Complejo IV transfiere los electrones recibidos al citocromo *a*, que a su vez los transfiere a dos átomos de Cu, y después al citocromo *a*₃, generando cuatro electrones que finalmente llegan al O₂, reduciéndolo a H₂O. La reacción de este proceso es la siguiente (Voet *et al.*, 2006):



Los cuatro electrones generados son obtenidos a partir de redistribuciones electrónicas dentro de los citocromos y de la formación de intermediarios en los átomos de Cu.

Durante la oxidación del NADH y FADH₂ en la cadena transportadora de electrones (Complejos I, III y IV) se genera un gradiente electroquímico (protónico), ya que en los complejos se obliga la translocación de H⁺ hacia el espacio intermembranal, aumentando su concentración de manera importante. Al almacenamiento de la energía libre y a la conservación de esta energía se llama acoplamiento o transducción de energía. La ATP sintasa translocadora de protones (ATPasa bombeadora de protones o F₀-F₁-ATPasa), es una enzima que consta de dos partes: F₀, que es una proteína integral de membrana que contiene un canal para la translocación de protones; y F₁, que es una proteína periférica de membrana móvil al paso de los protones. Esta enzima aprovecha la alta concentración de protones en el espacio intermembranal, y permite su flujo por F₀ hacia la matriz mitocondrial, usando su energía libre almacenada para regenerar el ATP a partir del ADP +

P_i. Una vez sintetizado el ATP es transportado hacia el citosol para ser utilizado por la célula en las funciones que se requiera.

Debido a que el ATP no se regenera más rápido de lo que se necesita, hay estrictos puntos de control coordinados en todas las vías. De tal manera, su síntesis está fuertemente correlacionada con la oxidación de NADH y FADH₂ en la cadena transportadora de electrones, así como en el gradiente protónico intermembranal, de tal forma que cuando la concentración de H⁺ es muy elevada, se detiene el transporte de electrones; por eso es necesario disipar el gradiente protónico (transferido los H⁺ hacia la matriz mitocondrial), para que el transporte electrónico pueda continuar. Asimismo, la glucólisis y el ciclo de Krebs están coordinadas de tal manera que sólo producen NADH y FADH₂ a la velocidad requerida para satisfacer la demanda de ATP. El balance energético total de la respiración aerobia desde la glucólisis hasta la fosforilación oxidativa es de 38 moléculas de ATP sintetizadas por cada glucosa completamente utilizada hasta formar CO₂ y H₂O (Voet *et al.*, 2006).

2.4 Inhibidores de la respiración mitocondrial

Los inhibidores de la respiración mitocondrial se clasifican en (Yamaguchi *et al.*, 2005):

- Inhibidores de la cadena transportadora de electrones. Estos compuestos, inactivan el transporte de electrones dentro de los complejos proteicos I, II, III o IV (Cuadro 2).
- Inhibidores de la fosforilación oxidativa. Actúan en el complejo ATPasa, bloqueando la unión de ADP y P_i para generar ATP (Cuadro 2).
- Desacoplantes de la fosforilación oxidativa. Disipan el gradiente de H⁺ generado en el espacio intermembranal por el transporte de electrones, impidiendo la regeneración del ATP (Cuadro 2).

Cuadro 2. Inhibidores de los complejos de la cadena transportadora de electrones.

Inhibidor	Sitio de inhibición	Mecanismo de acción	Referencias
Rotenona	Complejo I	Inhibe reoxidación del NADH, al inhibir la oxidación del malato	Degli Esposti, 1997
Amital	Complejo I	Afecta oxidaciones dependientes de NAD ⁺	Degli Esposti, 1997
Tenoiltrifluoroacetona, carboxanilidas	Complejo II	Interrumpen el transporte de electrones entre la succinato deshidrogenasa y CoQ	Ramsay <i>et al.</i> , 1980
Antimicina A	Complejo III	Se une al citocromo <i>bc₁</i> , inhibiendo la reoxidación de NADH y FADH ₂	Rotsaert <i>et al.</i> , 2007
Monóxido de carbono (CO)	Complejo IV	Compite con el O ₂ por el sitio de unión	Collman <i>et al.</i> , 2009
Azida (N ₃ ⁻)	Complejo IV	Produce un efecto alostérico (inhibidor no competitivo)	Collman <i>et al.</i> , 2009
Oligomicina	ATP sintasa	Se une a la subunidad F ₀ , interfiriendo el paso de H ⁺	Hong <i>et al.</i> , 2008
Diciclohexilcarbodiimida (DCCD)	ATP sintasa	Inhibe transporte de protones en F ₀	Hong <i>et al.</i> , 2008
2,4-dinitrofenol	Transportador transmembranal de H ⁺	Desacopla la fosforilación oxidativa	Degli Esposti, 1997
Carbonilcianuro- <i>m</i> -colorofenilhidrazona	Transportador transmembranal de H ⁺	Agente desacoplante (en la fosforilación oxidativa)	Degli Esposti, 1997

Cabe mencionar que cualquier desregulación o inhibición que suceda en la glucólisis, vía de las pentosas o ciclo de Krebs, así como en el transporte de cualquier compuesto (piruvato, ADP/ATP, etc.) repercutirá en la respiración mitocondrial, pues se altera la cantidad de sustrato que se produce, llegando incluso a una inhibición de la respiración.

2.5 Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual, a partir de luz solar, se biosintetizan moléculas orgánicas y se libera oxígeno; esto se lleva a cabo en los cloroplastos, que son estructuras dentro de las cuales se encuentra una cámara con un medio interno llamado estroma, el cual alberga a los tilacoides o lamelas, cuya membrana es permeable a ciertas moléculas incluyendo iones, y donde se encuentran los complejos fotosintéticos.

El proceso de la fotosíntesis está conformado por dos fases: 1) la luminosa, que se lleva a cabo en los tilacoides, y en donde se realiza la conversión de energía solar a química, generando NADPH, partir del cual se obtiene ATP; y 2) la oscura, en la cual se utilizan las moléculas obtenidas en la fase luminosa, para sintetizar carbohidratos a partir de H₂O y la fijación de CO₂, que serán de utilidad para el desarrollo y supervivencia de la planta; esta fase se lleva a cabo en el estroma. Ambas fases involucran reacciones en cadena de óxido-reducción. A continuación, se abarcarán los aspectos más importantes sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

Para que se lleven a cabo las reacciones luminosas, las clorofilas y pigmentos accesorios, ubicados dentro de los tilacoides, absorben energía de un fotón, resultando en una conversión del más bajo estado de energía al estado excitado. Una vez excitados, un electrón puede regresar a su estado basal por varios caminos, tomando la energía distintas formas: en el primer mecanismo, la energía se disipa en forma de calor durante la disminución de la radiación; el segundo mecanismo es la transferencia de energía, la cual se lleva a cabo en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, y que se explica con más detalle, posteriormente. Un tercer mecanismo es el llamado fluorescencia, en donde una molécula excitada regresa al nivel basal emitiendo un fotón; este fotón es generalmente de mayor longitud de onda (menor energía) respecto al fotón absorbido (Voet *et al.*, 2006).

Las reacciones luminosas de la fotosíntesis constituyen una fase de conversión de energía luminosa a química, que incluye la formación de una cadena redox de transferencia de electrones (cadena transportadora de electrones) con la consecuente generación de un gradiente de concentración de protones, que serán utilizados para la síntesis de ATP. El resultado de esto es el almacenamiento de energía química como agente reductor en forma de NADPH, y posteriormente, como potencial fosforilante en forma de ATP.

Los tilacoides contienen cuatro macro-complejos proteicos: los tres primeros están implicados en la transferencia de energía a lo largo de la membrana (que contienen moléculas con capacidad redox reversible) y en la transferencia protónica a través de la

membrana (del estroma al lumen), mientras que el cuarto complejo utiliza ADP y P_i para sintetizar ATP (ATP sintasa o ATPasa).

Ya que la función de la cadena transportadora de electrones es convertir la energía luminosa en química (NADPH), es necesaria la intervención dos complejos proteicos llamados fotosistemas (fotosistema II o PS II, y fotosistema I o PS I, por sus siglas en inglés), es decir, sistemas capaces de absorber y transformar la energía fotónica en energía electroquímica redox; estos fotosistemas remueven electrones del agua, con lo que pueden reducir el $NADP^+$ a NADPH. El PS II, denominado agua-plastoquinona-oxidoreductasa, cataliza a partir de un fotón, la oxidación del agua y con eso, la reducción de la plastoquinona. El PS I se denomina plastocianina-ferredoxina óxido-reductasa, ya que interviene en la parte final de la transferencia de electrones, tomándolos de la proteína del lumen de la plastocianina y cediéndolos a la proteína del estroma ferredoxina. El tercer complejo es un sistema conector entre los dos fotosistemas, llamado complejo citocromo *b₆f*. Existe un cuarto complejo proteínico distinto a los otros, este complejo utiliza el gradiente de protones que los otros complejos producen a través del tilacoide. Los protones, al fluir de vuelta del lumen al estroma a favor del gradiente, proporcionan energía (fuerza protomotriz) que es utilizada para regenerar el ATP. En la Figura 2 se ilustran estos cuatro complejos proteicos involucrados en la fase luminosa de la fotosíntesis (Lehninger, 2005).

El transporte de electrones comienza con la escisión de dos moléculas de agua con la ayuda de un complejo proteico de Mn, liberando cuatro protones y una molécula de oxígeno. A partir de ahí, una molécula llamada Z transfiere los electrones al centro de reacción del PS II (P_{680}), que posteriormente es excitado por un fotón (P_{680}^*). De aquí, se transfiere un electrón a una molécula de feofitina, que a su vez lo transfiere a un complejo de plastoquinona-Fe (II) (PQ_A), reduciéndola a plastosemiquinona. La PQ_A es una pequeña molécula liposoluble que se puede mover a lo largo de la membrana para poder funcionar como un mediador del flujo de electrones entre el PS II y los complejos citocrómicos que son considerablemente más grandes y, por lo tanto, relativamente inmóviles, respecto a esta molécula. Cuando este electrón es transferido de la plastosemiquinona a la quinona B

(PQ_B), ésta se convierte en una semiquinona y la pérdida del electrón regresa de PQ_A⁻ a PQ_A. El segundo electrón es entonces transferido de P₆₈₀ a PQ_A para producir por segunda vez PQ_A⁻; después, es transferido de PQ_A⁻ a PQ_B⁻ y de nuevo PQ_A⁻ se oxida, quedando PQ_A. Por último, PQ_B doblemente reducido toma dos protones del lado estromal de la membrana, generando el plastoquinol PQ_BH₂; esta desprotonización se desasocia con el PS II y se difunde en la bicapa lipídica de la membrana.

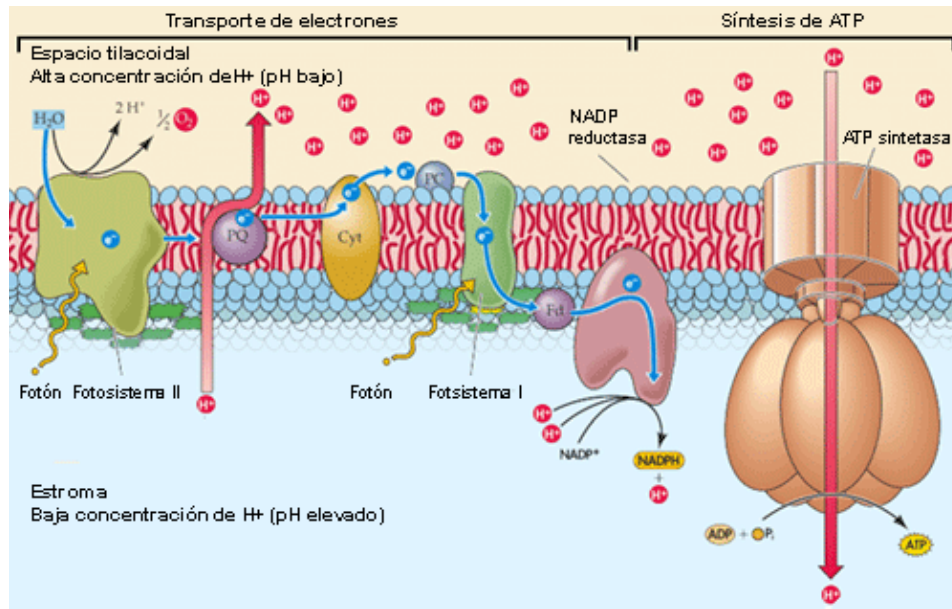
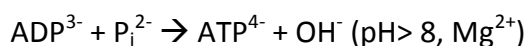


Figura 2. Complejos proteicos de la fase luminosa de la fotosíntesis.

El plastoquinol generado es oxidado por un complejo proteico integral de membrana llamado citocromo *b₆f*, que contiene tres acarreadores de electrones: un citocromo de tipo *c*, una proteína con complejo 2Fe-2S y un citocromo tipo *b*, el cual transfiere los electrones del plastoquinol a la plastocianina (una proteína que contiene cobre y que reside en el lumen de la membrana tilacoidal) (Figura 3). Esta transferencia de electrones es acompañada por un gradiente de pH alrededor de la membrana tilacoidal (del estroma al lumen), uniendo al transporte de electrones con la fosforilación; esta membrana es una vesícula sellada conformada por lípidos que contiene una fase acuosa que está química y eléctricamente aislada del estroma (Pessaraki, 2005).

Los electrones pasan del citocromo a la plastocianina, llegando rápidamente al PS I, en el cual los centros de reacción (P_{700}) sufren una segunda excitación por la luz solar (P_{700}^*); los acarreadores de electrones pasan de nuevo por un proceso de óxido-reducción junto con el aceptor clorofílico A_0 , la filoquinona A_1 y el enlazador Fx. En este paso los electrones del PS I pueden tomar dos rutas: una cíclica en la que vuelven al citocromo b_6f y de ahí a la plastoquinona, permitiendo la translocación de H^+ hacia el lumen tilacoidal, y por lo tanto, la síntesis de ATP, aunque no hay más producción de O_2 ; la segunda ruta es no cíclica (y es la que más frecuentemente sucede), en donde los electrones son transferidos a una ferredoxina (Fd) soluble en el estroma, que pasa de $2Fe-2S$ a $Fe-S$; este acarreador de electrones transfiere sus electrones al $NADP^+$ utilizando como intermediario a la enzima ferredoxina-NADP reductasa (FNR). Existen evidencias de que la ferredoxina y la FNR forman un complejo a través de la interacción electrostática de las dos proteínas, donde el primer electrón es reducido por la FNR a la flavinsemiquinona y el segundo electrón al completo estado reducido $FADH_2$; el FNR asimismo, transfiere dos electrones al $NADP^+$ y es pobremente asociado con la membrana tilacoidal y fácilmente desasociada produciendo de esta manera el NADPH (Pessaraki, 2005). En la Figura 3 se muestran los dos fotosistemas involucrados en el transporte de electrones en cloroplastos.

Como se mencionó anteriormente, al hidrolizarse el agua se liberan dos protones en el tilacoide, los cuales son llevados hacia la ATPasa (o CF_0 - CF_1 ATP sintasa) (Figura 3), que está constituida por dos segmentos: un canal de protones (CF_0) unido a la membrana, y una ATP sintasa reversible (CF_1) que protruye de la membrana externa del tilacoide hacia el estroma. La diferencia de pH comienza cuando los protones son depositados en la parte interna de la membrana por: 1) la oxidación del agua, y 2) la oxidación de la plastoquinona por el PS I y el complejo citocrómico b_6f : con esto se realizará la síntesis de ATP. La actividad de la ATP sintasa se asemeja a la mitocondrial, y es óptima a un pH de 8.2, donde la condensación de un ADP con un ortofosfato (P_i) requiere de la remoción de un OH^- . De alguna manera, CF_1 utiliza el gradiente de protones para la siguiente reacción:



El ATP generado será utilizado posteriormente en la fase oscura de la fotosíntesis.

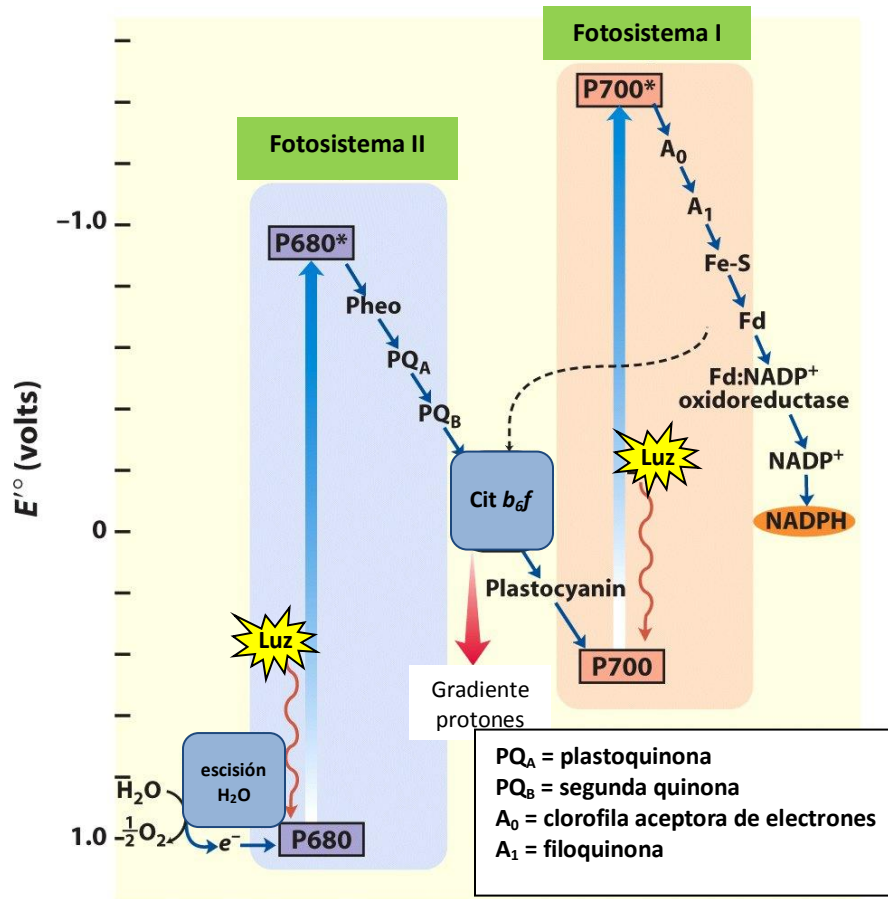


Figura 3. Reacción de Hill, transporte de electrones en las reacciones luminosas de la fotosíntesis: PS II y PS I (Lehninger, 2005).

Cuando no hay ADP disponible para CF_1 , no se puede utilizar el gradiente de protones, y esto hace que la cadena transportadora de electrones se detenga. El movimiento de protones generado por el transporte de electrones está correlacionado con la salida de Mg^{2+} del tilacoide (para mantener su neutralidad eléctrica en el exterior). En presencia de luz, el estroma tiene un incremento de pH y en la actividad de Mg^{2+} , con lo cual se activan las enzimas clave de la ruta de reducción de carbono. Durante este y otros procesos, las enzimas encargadas de la fijación de CO_2 están reguladas por el transporte de electrones de la membrana tilacoidal (Pessaraki, 2005).

Normalmente, los estudios de transporte de electrones y fotofosforilación se realizan con preparaciones de cloroplastos rotos. Cuando la envoltura externa del cloroplasto se

rompe por choque osmótico, se pierde el contenido del estroma, por lo que no se puede realizar la fijación de CO_2 , a menos que se reconstituya el estroma en el laboratorio. Sin embargo, la remoción de la membrana externa del cloroplasto permite el uso de muchos oxidantes y reductores (pues la membrana externa impone una barrera a la permeabilidad), además de la adición de ADP y P_i , con lo que se puede utilizar para el estudio de las reacciones parciales de la fotofosforilación y la actividad de pequeños fragmentos de la cadena transportadora de electrones. Con esto, se puede obtener información valiosa acerca de: 1) los mecanismos fundamentales del transporte de electrones y protones, 2) el sitio de acción de herbicidas y demás tratamientos tóxicos en plantas, entre otras cosas.

2.6 Inhibidores de la fotosíntesis

La bioproductividad en las plantas es propiciada por la conversión de la energía solar en los complejos pigmento-proteína de la membrana tilacoidal; si estos complejos son de alguna forma modificados, es inevitable que haya cambios en la fisiología de la célula, crecimiento y rendimiento de biomasa. Es por eso que el funcionamiento normal de los tilacoides debe ser el primer paso a buscar cuando se perciben cambios en el desarrollo de una planta. El acoplamiento de la membrana tilacoidal puede influenciar profundamente la cantidad de electrones transportados, es por eso que los estudios de los inhibidores del transporte de electrones se realizan en membranas totalmente desacopladas. Los agentes desacoplantes impiden que los protones migren del interior del tilacoide, con lo que no se puede tener un gradiente de pH que permita la fotofosforilación.

Los metabolitos secundarios que inhiben la fotosíntesis ejercen su acción principalmente interfiriendo con las reacciones luminosas. Los estudios correspondientes se llevan a cabo en cloroplastos recién aislados y los compuestos activos son llamados frecuentemente inhibidores de la reacción de Hill, y se clasifican en los grupos que se describen a continuación (Duke, 1990):

- **Inhibidores del transporte de electrones:** sucede cuando uno o más intermediarios del transporte de electrones son llevados, removidos o inactivados; la mayoría de ellos inhiben el PS II. Algunos ejemplos son: derivados de la urea como DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea), diquat, paraquat, DBMIB (2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona) (Duke, 1990).
- **Agentes desacoplantes:** son aquéllos que disipan el gradiente protónico generado en el tilacoide por el transporte de electrones, impidiendo la regeneración del ATP; un ejemplo de estos inhibidores es el NH_4Cl (Duke, 1990).
- **Inhibidores de la transferencia de energía:** actúan directamente en la fotofosforilación al interferir el flujo de electrones. Estos inhibidores, en compañía de un desacoplante, proveen una ruta alternativa para disipar gradiente protónico, resultando en la inhibición del flujo de electrones. Ejemplo de éstos son: NEM, Dio-9, formamida (Duke, 1990).
- **Aceptores artificiales de electrones:** son aquéllos capaces de tomar los electrones de algún componente (reducirse) de la vía de transporte de electrones. Este grupo de inhibidores está representado por: MV (metil viológeno), SiMO (silicomolibdato), DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol) y benzofuranos (Kirkwood, 1976; Duke, 1990; Hallet, 2005).

En el Cuadro 3 se muestran algunos de los inhibidores tanto de PS II como de PS I, indicando su(s) mecanismo(s) de acción (Pessaraki, 2005):

Cuadro 3. Inhibidores fotosintéticos más utilizados.

Inhibidor	Sitio de inhibición	Mecanismo de acción	Referencias
Falta de Mn ²⁺	Complejo de oxidación del agua	Inactiva la oxidación de agua	Kawamoto <i>et al.</i> , 1995; Ahlbrink <i>et al.</i> , 2001
Hidroxilamina	Complejo de oxidación del agua	Inactivación de la evolución de O ₂	Mino <i>et al.</i> , 2000
Trinitrofenol, dinoseb	Complejo de oxidación del agua Transporte de electrones en PS II	Inhibición de la oxidación del agua Inhibe en el sitio Q _B	Ahlbrink <i>et al.</i> , 2001 Roberts <i>et al.</i> , 1998; Roberts <i>et al.</i> , 2003
Azida	Complejo de oxidación del agua Transporte de electrones en PS II	Evolución de O ₂ Inhibe entre Y ₂ y Q _A	Haddy <i>et al.</i> , 2000 Kawamoto <i>et al.</i> , 1995;
Óxido nítrico	Hierro no hemo del PS II	Inhibición del transporte de electrones entre Q _A y Q _B	Petrouleas <i>et al.</i> , 1990
CN ⁻	Hierro no hemo del PS II	Elimina la señal EPR, y forma un aducto de -NO	Diner <i>et al.</i> , 1990
3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU)	Transporte de electrones en PS II	Inhibe transporte de electrones de Q _A a Q _B	Diner <i>et al.</i> , 1987
Ortoquinonas heterocíclicas	Transporte de electrones en PS II	Inhibe transporte de electrones en Q _B Minimizan la presencia de Q _A ⁻	Kirilovsky <i>et al.</i> , 1994 Oettmeier <i>et al.</i> , 2001
2-(4-promobencil-amino)-4-metil-6-triflurometil pirimidina	Transporte de electrones en PS II	Inhibe el transporte de electrones en el sitio Q _B	Ohki <i>et al.</i> , 2001
2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona (DBMIB)	Transporte de electrones en PS II Complejo citocrómico <i>b₆f</i>	Actúa a nivel de Q ₀ Inhibe la oxidorreductasa plastoquinol-citocromo <i>c₅₅₂</i> Inhibe la reducción del citocromo <i>b₆</i> , y el transporte de electrones dentro del complejo citocrómico <i>b₆f</i>	Vener <i>et al.</i> , 1997 Hurt <i>et al.</i> , 1981 Jones <i>et al.</i> , 1988; Lee <i>et al.</i> , 2002; Rich <i>et al.</i> , 1991
DBMIB reducido	Complejo citocrómico <i>b₆f</i>	Se une al sitio Q ₀	Schaepf <i>et al.</i> , 1999

3. Impacto toxicológico, ecológico y económico de los plaguicidas

Acorde a la Organización de las Naciones Unidas, aproximadamente más de 2 billones de humanos se encuentran en desnutrición y se espera que en menos de 50 años se duplique esta cantidad. En este contexto, es necesario un aumento en la producción alimentaria, así como la conservación de los recursos y del ambiente. No obstante, del 37 al 40% de la producción mundial alimentaria se pierde debido a la destrucción de los cultivos por plagas, enfermedades y malezas, aún cuando se utilizan aproximadamente 2.5 millones de toneladas de plaguicidas al año. Es importante mencionar que la aplicación de estos agentes provoca una pérdida alimentaria adicional del 20%, lo cual deja a la población mundial con la mitad de sus recursos alimenticios (Pimentel, 1997; Azevedo *et al.*, 2000; ONU, 2009).

Además de la pérdida alimentaria, la mayoría de los plaguicidas actúan adversamente sobre la salud de los seres humanos. Se sabe que 3 millones de personas se intoxican con plaguicidas cada año, de las cuales 220,000 llegan a morir. En cuestiones ambientales, los plaguicidas causan una pérdida considerable de la biodiversidad, especialmente en el caso de aves y peces, perdurando y resistiendo notoriamente en el suelo y en el agua (Pimentel, 1999; FAO, 2009).

La práctica agrícola tradicional involucra el uso de plaguicidas sintéticos o agroquímicos como una técnica accesible y económica, sobre todo en los países subdesarrollados. Sin embargo, en los últimos años se han propuesto diversas técnicas biotecnológicas y ecológicas alternativas para reducir el impacto ecológico y económico, tales como el control biológico, la modificación genética, la inducción hormonal y la utilización de productos naturales novedosos que actúan selectivamente sobre las plagas (Pimentel, 1997; Azevedo *et al.*, 2000).

4. Microorganismos como fuente de metabolitos secundarios con actividad herbicida

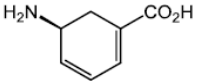
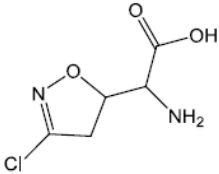
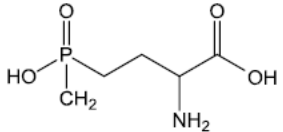
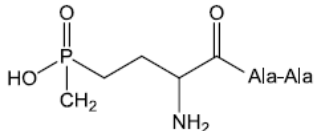
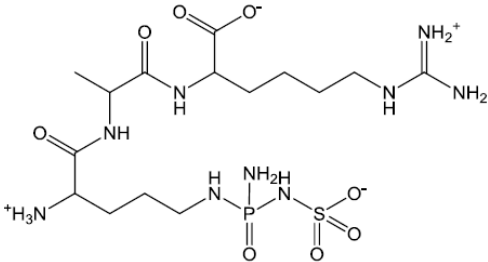
En la actualidad, las estrategias para identificar compuestos con actividad herbicida son los mismos que los utilizados en la industria farmacéutica para diferentes propósitos, por lo que hay tres principales vertientes para su investigación (Short, 2005). La primera consiste en la evaluación sistemática o “screening” de diversas moléculas, con la subsecuente optimización de las moléculas que resultaron activas; es la estrategia más utilizada por las compañías agroquímicas. La segunda consiste en un diseño racional de moléculas que puedan fungir como inhibidores específicos de ciertas enzimas clave en el metabolismo; sin embargo, esta estrategia no ha sido exitosa para obtener herbicidas comerciales. La tercera estrategia consiste en el uso de moléculas obtenidas a partir de fuentes naturales, ya sea directamente como herbicidas, o como prototipos de moléculas activas. Esto ha sido atractivo por varios motivos, tales como que la mayoría son hidrosolubles, presentan alta actividad a baja concentración; son específicas para cierto organismo, sin dañar otros organismos ni el medio ambiente; pueden tener diferentes sitios de acción a los ya utilizados, con lo cual se evita resistencia por parte de la planta (Najafpour, 2012).

Como se había mencionado antes, los herbicidas inicialmente eran sintéticos, presentando baja selectividad para el organismo blanco y por lo tanto, alta toxicidad en todos los organismos, incluyendo animales y el humano, además de persistir gran cantidad de tiempo en el medio ambiente. Estos problemas, aunados a la creciente resistencia que las malezas presentan hacia los herbicidas convencionales, ha conducido al estudio y extracción de aquellas moléculas de origen natural, ya que se ha demostrado que, en general, tienen sitios de acción más específicos (son más selectivas para el organismo deseado), y por lo tanto son menos tóxicas para el medio ambiente.

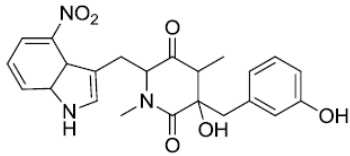
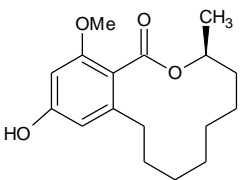
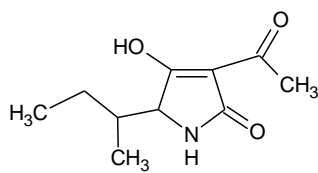
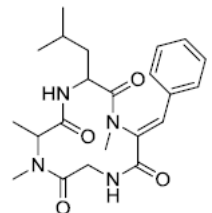
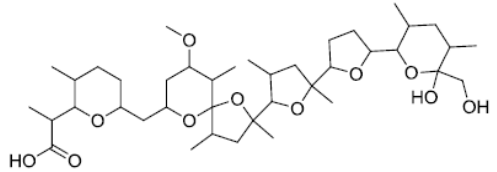
Se ha observado que los microorganismos son grandes productores de metabolitos secundarios, y en específico, de compuestos con actividad herbicida; además, aunque algunos de éstos tienen mecanismos de acción similares a los herbicidas sintéticos, la

mayoría de ellos presenta novedosos sitios de unión, por lo que tienen potencial para ser usados comercialmente (Rosell *et al.*, 2008). Dentro de los microorganismos productores de fitotoxinas, se encuentran bacterias y hongos (incluyendo a los actinomicetos) tanto patógenos como no patógenos (Duke *et al.*, 2011). En especial los hongos endófitos constituyen una fuente importante de metabolitos secundarios, pertenecientes a diversas clases químicas y con diferentes mecanismos de acción. En el Cuadro 4 se muestran ejemplos de metabolitos secundarios aislados de microorganismos, así como su mecanismo de acción fitotóxico.

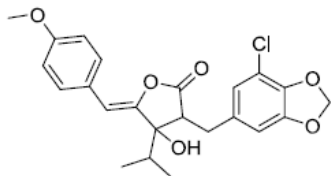
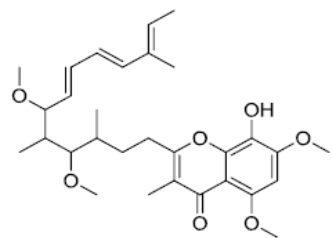
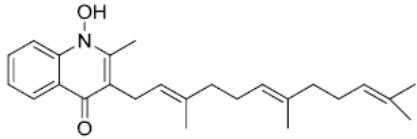
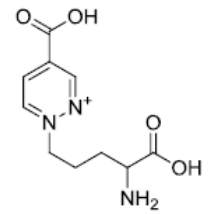
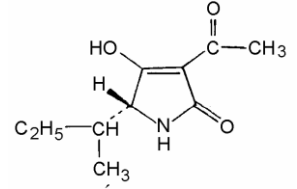
Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que inhiben a las plantas.

Nombre	Estructura	Productor	Mecanismo de acción	Referencias
Gabaculina		<i>Streptomyces toyacaenis</i>	Inhibidor de la glutamato-1-semialdehído aminotransferasa, inhibiendo la síntesis de porfirinas (grupos hemo y clorofilas)	Rajaram <i>et al.</i> , 2008; Rando <i>et al.</i> , 1977; May <i>et al.</i> , 1987
Acivicina (herbicida comercial)		<i>Streptomyces svuceu</i>	Análogo de glutamina; inhibe enzimas dependientes de glutamina, como la glutamato sintasa y la aminofosforribosiltransferasa	Gould <i>et al.</i> , 1989; Williams <i>et al.</i> , 2009
Fosfinitricina (herbicida comercial)		<i>Pseudomonas syringae</i>	Análogo de glutamato; inhibe la glutamin sintasa (GS)	Lyndon <i>et al.</i> , 1998
Bialaphos (herbicida comercial)		<i>Streptomyces hygrosopicus</i> , <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Su metabolismo en plantas produce L-fosfinitricina; la acumulación de GS provoca la interrupción de la fotosíntesis	Ziegler <i>et al.</i> , 1989
Faseolotoxina		<i>Pseudomonas savastanoi</i> vp. <i>Phaseolicola</i>	Al metabolizarse produce Nδ-(N1-sulfodiaminofosfinil)-L-ornitina (PSorn), un inhibidor de la ornitina transcarboxilasa (OCTasa), impidiendo la biosíntesis de citrulina (precursor de la arginina)	Templeton <i>et al.</i> , 2005

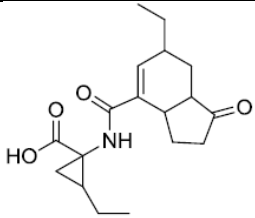
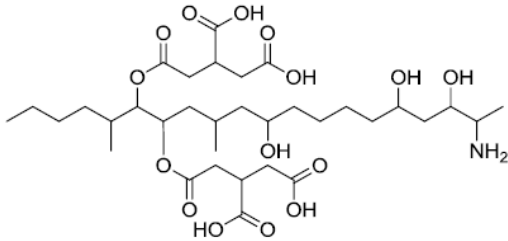
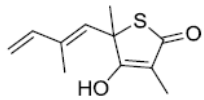
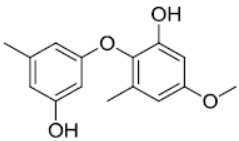
Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que inhiben a las plantas (continuación).

Nombre	Estructura	Productor	Mecanismo de acción	Referencias
Taxtomina A		<i>Streptomyces scabies</i> , <i>Streptomyces eubacteria</i>	Inhibe la síntesis de celulosa	King <i>et al.</i> , 2009; Bischoff <i>et al.</i> , 2009
Lasiodiplodina		<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Inhibidor del transporte de electrones de P ₆₈₀ a Q _A , e inhibidor de la enzima ATPasa en el complejo CF ₁	Veiga <i>et al.</i> , 2007
Toxina AAC (<i>Alternaria alternata</i> Crofton weed)		<i>Alternaria alternata</i>	Inhibidor del transporte de electrones del PS II a nivel de Q _B , así como posible inhibidor de la transferencia de energía a nivel de la Mg ²⁺ -ATPasa	Liu <i>et al.</i> , 2007
Tentoxina		<i>Alternaria alternata</i>	Inhibición de la transferencia de energía en la porción CF ₁ de la ATPasa	Selman <i>et al.</i> , 1978; Quick <i>et al.</i> , 1989
Nigericina		<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Agente desacoplante, hiperreductor de Q _A ; ionóforo de potasio	Shavit <i>et al.</i> , 1967; Quick <i>et al.</i> , 1989; Sze, 1989

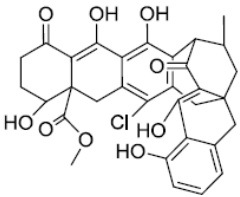
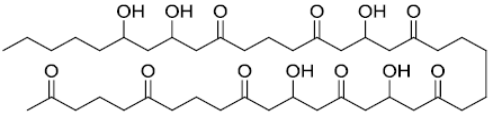
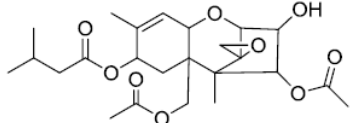
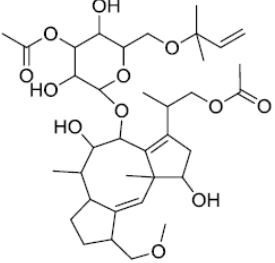
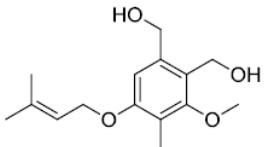
Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que inhiben a las plantas (continuación).

Nombre	Estructura	Productor	Mecanismo de acción	Referencias
Cianobacterina		<i>Scytonema hofmanni</i>	Inhibe transporte de electrones en PS II	Lee <i>et al.</i> , 1994
Estigmatelina		<i>Stigmatella aurantica</i>	Inhibe el transporte de electrones en el citocromo <i>b₆f</i>	Oettmeier <i>et al.</i> , 1985
Auraquina C		<i>Stigmatella aurantica</i>	Inhibe transporte de electrones en el complejo citocrómico <i>b₆f</i>	Oettmeier <i>et al.</i> , 1990
Piridazocidina		<i>Streptomyces</i> sp.	Toma electrones de PS I para reducirse, y genera radicales libres	Gerwick <i>et al.</i> , 1997
Ácido tenuazónico		<i>Alternaria alternata</i>	Bloquea el flujo de electrones de Q _A a Q _B en PS II	Chen <i>et al.</i> , 2007

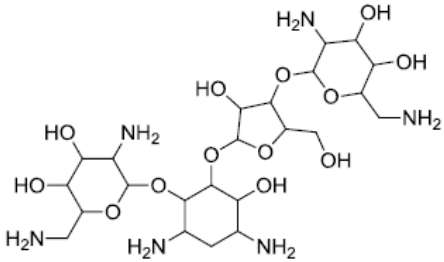
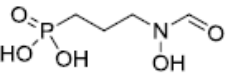
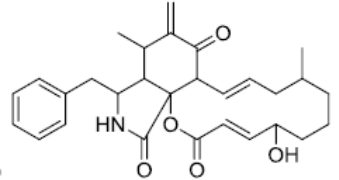
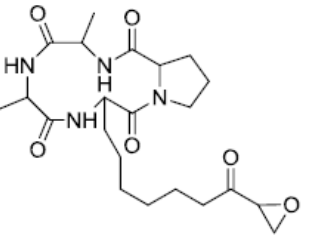
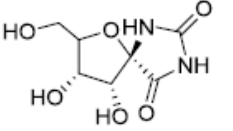
Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que inhiben a las plantas (continuación).

Nombre	Estructura	Productor	Mecanismo de acción	Referencias
Coronatina		<i>Pseudomonas coronafaciens</i>	Usurpa las vías de señalización del ácido jasmónico (hormona esencial para el crecimiento y desarrollo)	Ichihara <i>et al.</i> , 1977; Block <i>et al.</i> , 2005
Fumonisina B ₁		<i>Fusarium</i> sp.	Análogo del sustrato de la ceramida sintasa: los precursores de esfingolípidos elevan su concentración, provocando pérdida de la integridad y función de la membrana plasmática	Abbas <i>et al.</i> , 1993; Abbas <i>et al.</i> , 1994; Abbas <i>et al.</i> , 2002
Tiolactomicina		<i>Nocardia</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.	Inhibidor de la ácido graso disociado sintetasa tipo II, impidiendo la incorporación de acetato a los ácidos grasos	Focke <i>et al.</i> , 1990; Brown <i>et al.</i> , 2003
Ciperina		<i>Preussia fleischhakkii</i> , <i>Phoma sorghina</i> , <i>Ascochita cypericola</i>	Inhibidor de la enoil reductasa (ENR), que es un acarreador de grupos acilo, rompiendo la integridad de la membrana plasmática. A altas concentraciones inhibe la protoporfirinogen oxidasa, enzima clave para la síntesis de porfirinas	Weber <i>et al.</i> , 1990; Stierle <i>et al.</i> , 1992; Venkatasubbaiah <i>et al.</i> , 1992; Dayan <i>et al.</i> , 2008; Harrington <i>et al.</i> , 1995

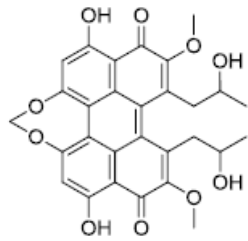
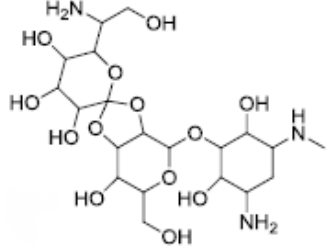
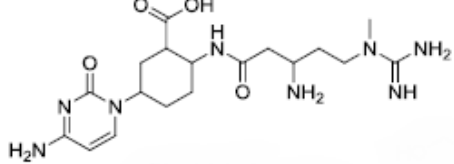
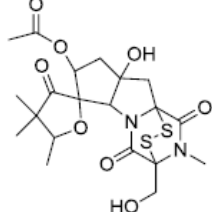
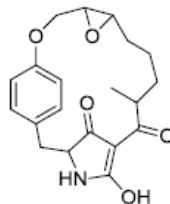
Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que inhiben a las plantas (continuación).

Nombre	Estructura	Productor	Mecanismo de acción	Referencias
Beticolina		<i>Cercospora beticola</i>	Se une a canales iónicos, provocando la ruptura de la membrana	Goudet <i>et al.</i> , 1998; Goudet <i>et al.</i> , 1999
Toxina T		<i>Cochiobolus heterostrophus</i> , <i>Phyllostica maydis</i> , <i>Bipolaris maydis</i>	Inhibición mitocondrial al unirse a su membrana interna y provocar la formación de poros, lo que permite la salida de iones y la disfunción de ésta	Tugeon <i>et al.</i> , 2006; Levings <i>et al.</i> , 1995
Toxina T-2		<i>Fusarium</i> spp.	Causa la fuga de electrolitos a bajas concentraciones; inhibe la síntesis de proteínas	Iacobellis <i>et al.</i> , 1981
Fusicoccina		<i>Fusicoccum (Phomopsis) amygdali</i>	Activa irreversiblemente la H ⁺ -ATPasa, impidiendo que se cierre	Gomarasca <i>et al.</i> , 1993; Aducci <i>et al.</i> , 1995
Zinniol		<i>Alternaria</i> sp., <i>Phoma</i> sp.	Se une a los protoplastos y estimula la entrada de Ca ²⁺ a la célula	Thuleau <i>et al.</i> , 1988

Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que inhiben a las plantas (continuación).

Nombre	Estructura	Productor	Mecanismo de acción	Referencias
Neomicina		<i>Streptomyces fradiae</i>	Interrumpe la mitosis: inhibe la ciclación de la polifosfoinositida al inhibir la hidrólisis del fosfatidilinositol, que produciría 1,4,5-trifosfato inositol y 1,2-diacilglicerol	Larson <i>et al.</i> , 1991
Fosmidomicina		<i>Streptomyces lavendulae</i>	Inhibe la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa, con lo cual se inhibe la vía por la cual la mayoría de los terpenoides se sintetizan	Okuhara <i>et al.</i> , 1980; Lichtenthaler <i>et al.</i> , 2000
Citocalacina B		<i>Phoma exigua</i> , <i>Zygosporium masonii</i>	Se une a la actina, previniendo que se polimerice para formar filamentos, y que por lo tanto, haya mitosis	Wyss <i>et al.</i> , 1980; Yang <i>et al.</i> , 2007
Toxina HC		<i>Cochiobolus carbonum</i>	Inhibe el crecimiento y división celular: actúa sobre la histona desacetilasa (HDAC) hiperacetilando las histonas	Walton <i>et al.</i> , 2006
Hidantocidina (herbicida comercial)		<i>Streptomyces hydroscopicus</i>	Su metabolito producido <i>in vivo</i> (5'-fosfohidantocidina) inhibe la adenilosuccinato sintetasa (ASS), enzima para la síntesis de purinas	Nakajima <i>et al.</i> , 1991; Siehl <i>et al.</i> , 1996; Walters <i>et al.</i> , 1997

Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos que inhiben a las plantas (continuación).

Nombre	Estructura	Productor	Mecanismo de acción	Referencias
Cercosporina		<i>Cercospora</i> sp.	En presencia de luz, produce singulete de oxígeno (1O_2) y superóxido (O_2^-), que inducen peroxidación membranal y posteriormente, muerte celular	Daub <i>et al.</i> , 1983; Daub <i>et al.</i> , 1987
Higromicina B		<i>Streptomyces</i> sp.	Inhibe la síntesis de proteínas por interacción con los ribosomas tanto en células procariontes como en eucariontes	Torregrosa <i>et al.</i> , 1998
Blasticidina S		<i>Streptomyces setonii</i> , <i>Streptomyces morookaensis</i>	Inhibe la de la peptidil transferasa, lo que inhibe la formación del enlace peptídico de las proteínas asociadas a los ribosomas	Scacchi <i>et al.</i> , 1992; Kalpaxis <i>et al.</i> , 1986
Sirodesmina PL		<i>Leptosphaeria maculans</i>	El puente disulfuro interno se une a diversas proteínas (incluso a cisteínas), inactivándolas la mayoría de las veces	Rouxel <i>et al.</i> , 1988
Macrocidina A		<i>Phoma macrostoma</i>	Inhibe la síntesis de carotenos por inhibición de la HPPD, enzima esencial para la síntesis de plastoquinona, cofactor de la síntesis de carotenos	Graupner <i>et al.</i> , 2003; Graupner <i>et al.</i> , 2006

4.1 Hongos endófitos

Un microorganismo endófito es una bacteria (incluyendo actinomiceto), un virus o un hongo que pasa toda o gran parte de su ciclo de vida colonizando los tejidos inter o intracelularmente de la planta hospedera, sin causarle síntomas aparentes de enfermedad; éstos microorganismos se han encontrado en casi todas las plantas vasculares que han sido estudiadas, inclusive en musgos y algas. La relación entre el endófito y su planta hospedera puede ir desde una patogénesis latente hasta un mutualismo simbiótico. En este grupo de microorganismos se encuentran principalmente bacterias y hongos, sin embargo, desde su descubrimiento en 1904, no se han hecho muchos trabajos con ellos (Tan y Zou, 2001).

En particular, los hongos endófitos resultan de particular interés debido a la estrecha relación que establecen con su hospedera. Estos microorganismos tienen una relación de antagonismo balanceado con su planta hospedera, permitiendo que ambos puedan desarrollarse sin causarse daño: mientras que la planta le provee de alimento y protección, el endófito aumenta su bienestar mediante la producción de diversos metabolitos secundarios. Este bienestar puede verse reflejado en varios aspectos, desde promover el crecimiento de la planta, hasta mejorar su adaptabilidad, reduciendo la incidencia a ciertas enfermedades, promoviendo la tolerancia a los metales pesados, incrementando la tolerancia a la sequía, reduciendo el herbivorismo y el ataque de fitopatógenos. Sin embargo, bajo diversas condiciones, como lo son el estrés o la senescencia de la hospedera, este equilibrio se rompe y el endófito puede expresarse como fitopatógeno, dañando así a la planta hospedera (Tan y Zou, 2001; Aly *et al.*, 2010).

Se estima que de los 1.5 millones de especies de hongos que existen, aproximadamente 1.3 corresponden a hongos asociados a plantas. En México se calculan de 261 a 200 mil especies endémicas, aunque sólo se conocen alrededor del 7.5% (Guzman, 1998; Hawksworth, 2001; Mejía *et al.*, 2008). Estas estadísticas ponen en evidencia la fuente inagotable de especies vegetales por investigar desde el punto de vista de sus endófitos.

Los hongos endófitos se aíslan regularmente a partir de la planta hospedera; crecen lentamente y tienden a estar asociados estrechamente a otros organismos endófitos. No obstante, en la actualidad se está prestando atención en ellos, ya que, por ser microorganismos tan diversos que ocupan tantos nichos diferentes, son también una fuente promisoría de metabolitos secundarios y, en específico, de compuestos con potencial herbicida (Arnold *et al.*, 2001; Posada y Vega 2005; Arnold *et al.*, 2007).

4.2 El hongo endófito *Edenia gomezpompae*

Edenia gomezpompae es un hongo endófito que 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). Las colonias sobre agar papa dextrosa (PDA) crecen rápidamente, inicialmente son blancas y posteriormente de color rosado; el reverso exhiben un color de rojizo-café (Figura 4a). La morfología del hongo se estableció mediante microscopía de luz, microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido. Este microorganismo forma hifas hialinas de pared delgada, rugosas, septadas que frecuentemente presentan ramificaciones en ángulos de 90°, las cuales se entrelazan y forman rollos como cuerdas (Figuras 4b y 4c).

Las estructuras de reproducción sexual y asexual son desconocidas; en consecuencia, como no genera estructuras reproductivas, su identificación se realizó por medios moleculares, basándose en su secuencia de DNA ribosomal. Estableciéndose que se trata de un ascomiceto de un género y especie nuevos para la ciencia dentro de la familia Pleosporaceae (González *et al.*, 2007).

Las características morfológicas de los microorganismos pueden verse afectadas durante sus 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 *Edenia gomezpompae*, se observa una alta sensibilidad en su plasticidad fenotípica, debida principalmente a ligeras variaciones en el medio de cultivo (PDA), así como en el área de la colonia de donde se toma el inóculo. Esto da como

resultado la capacidad formar diversas variantes fenotípicas, las cuales posiblemente no sólo se limitan a las características morfológicas macroscópicas, si no muy probablemente afectan también su composición química (Macías *et al.*, 2014). En la Figura 8 se presenta una imagen con algunas variantes morfológicas de *E. gomezpompae*.

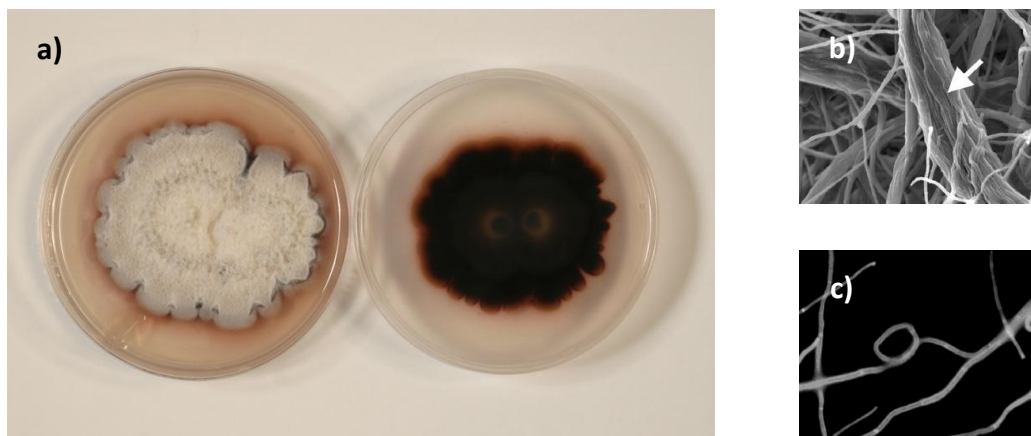


Figura 4. *Edenia gomezpompae* aislado de las hojas de *Callicarpa acuminata*; en la Figura 4a se puede observar su aspecto macroscópico en PDA, mientras que en las Figuras 4b y 4c se muestran micrografías de las hifas.

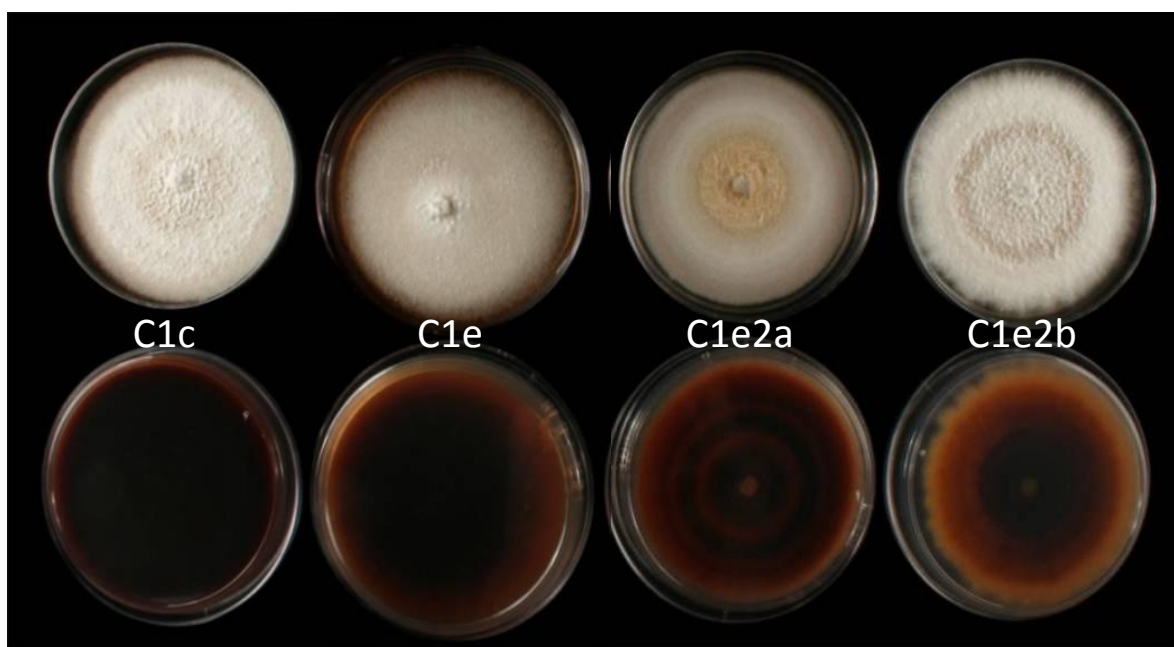
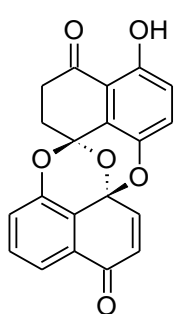


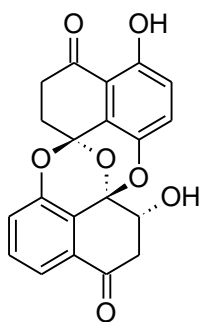
Figura 5. Variantes morfológicas de *E. gomezpompae* en cultivos en PDA: C1c, C1e, C1e2a y C1e2b. Las imágenes de arriba muestran la vista superior de los micelios en las cajas Petri, mientras que las imágenes de abajo de la fotografía muestran vista inferior de los cultivos.

4.3 Metabolitos secundarios producidos por *Edenia gomezpompae*

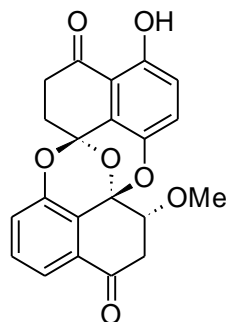
El hongo endófito *Edenia gomezpompae* es productor de cuatro preusomerinas (Pr) novedosas: EG₁, EG₂, EG₃ y EG₄, y de una palmarumicina también novedosa (Pa) EG₁, además de las palmarumicinas conocidas CP₂, CP₁₇ y CP₁₉; de manera adicional, también produce un ergostano, la ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (Erg) (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; González-Meléndez, 2009, Macías-Rubalcava *et al.*, 2014). Las preusomerinas presentan reducción del grupo cetona de los carbonos 1 y 1' a alcohol, así como grupos hidroxilo, metoxilo o epóxido sobre los carbonos 2, 3 y 2', 3'. En contraste, las palmarumicinas, en general, conservan el grupo naftalendiol intacto y presentan diversas oxidaciones y reducciones en la unidad de naftoquinona, siendo grupos funcionales principales epóxido e hidroxilo. Estos compuestos han mostrado actividad antifúngica sobre diferentes microorganismos endófitos y fitopatógenos (Murià, 2007; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Murià, 2010).



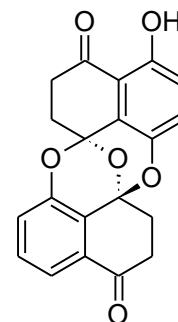
Pr EG₁



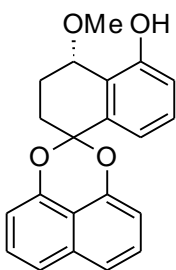
Pr EG₂



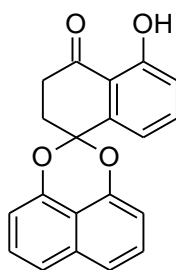
Pr EG₃



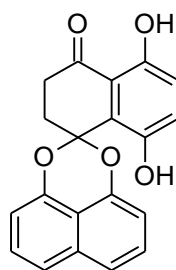
Pr EG₄



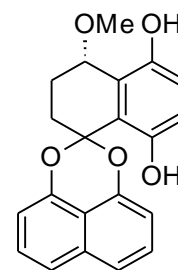
Pa CP₁₉



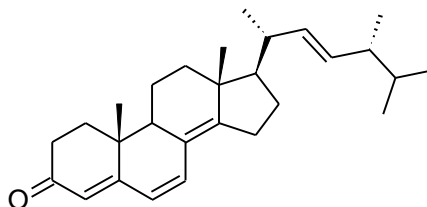
Pa CP₂



Pa CP₁₇

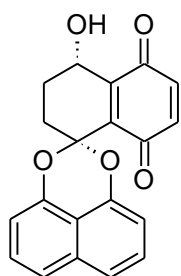


Pa EG₁

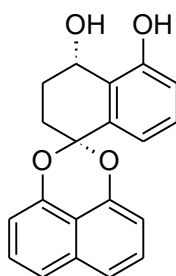


Erg

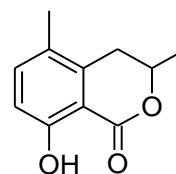
Cabe mencionar que Martínez-Luis y colaboradores (2008) aislaron de las hojas maduras de *Petrea volubilis* L. (Verbenaceae), colectadas en el Parque Nacional de Coiba en Panamá, un hongo endófito caracterizado como *Edenia* sp. El estudio químico permitió el aislamiento y caracterización de ocho metabolitos secundarios con actividad antileishmania: las preusomerinas EG₁ y EG₂, y las palmarumicinas CP₂, CP₁₇, CP₁₉, CP₁₈ y CJ-12,371 y la 5-metillicracina (Martínez-Luis *et al.*, 2008; 2009).



Pa CP₁₈



CJ-12,371



5-metillicracina

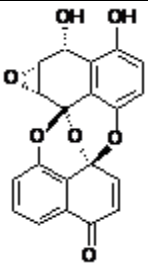
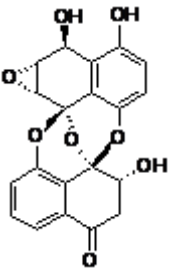
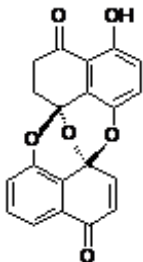
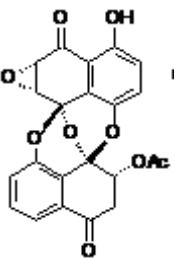
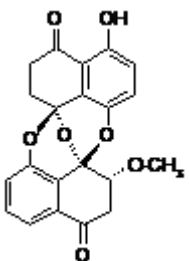
Las preusomerinas y palmarumicinas han sido aisladas de una gran variedad de hongos: coprófilos, acuáticos, saprófitos, asociados a líquenes, a corales y a plantas. Adicionalmente, existen dos reportes de aislamiento de estos compuestos en especies de vegetales, sin embargo, es discutible la posibilidad de que sean producto del metabolismo de hongos asociados a éstas (Ravindranath *et al.*, 2004; Prajoubklang *et al.*, 2005).

En la literatura, los compuestos del tipo preusomerina se encuentran citados como agentes microbicidas; fungicidas, antibacterianos (Gloer y Weber, 1991; Krohn *et al.*, 2001; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008), antileishmania (Martínez *et al.*, 2008) y nematocidas

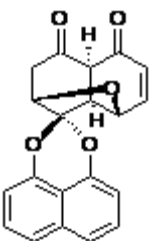
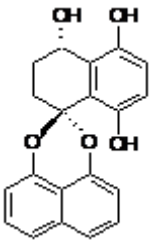
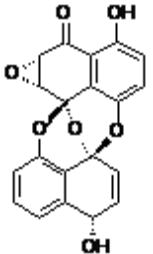
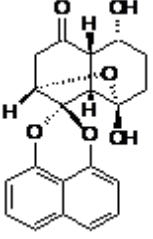
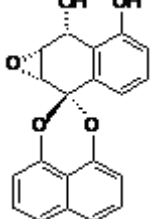
(Dong *et al.*, 2008). También es sobresaliente su posible aplicación como agentes anticancerígenos, al ser de los pocos compuestos inhibidores de la enzima farnesil fosfotransferasa de Ras (FPTasa de RAS) que se conocen; esta enzima está implicada en el proceso de desarrollo del cáncer (Singh *et al.*, 1994; Vilella *et al.*, 2000).

Por otra parte, las palmarumicinas se han reportado con actividades antibacterianas y fungicidas (Krohn, 1994; Hu *et al.*, 2006; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008), antimaláricos, alguicidas, antileishmania y citotóxicos (Bode *et al.*, 2000; Seephonkai *et al.*, 2002; Prajoubklang *et al.*, 2005). Adicionalmente, se han reportado como inhibidores del sistema tioredoxin-tioredoxin reductasa, que está implicado en procesos malignos como cáncer, VIH-SIDA y artritis reumatoide (Wipf *et al.*, 2001; Wipf *et al.*, 2005); inhibidores de la DNA girasa (Sakemi *et al.*, 1995). En el Cuadro 5 se presentan algunos compuestos de la familia de las preusomerinas, palmarumicinas y compuestos relacionados, así como su fuente de origen y la actividad biológica que ha sido evaluada.

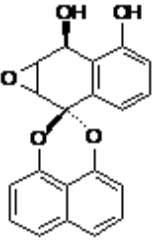
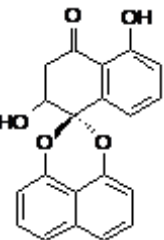
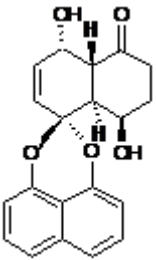
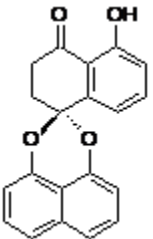
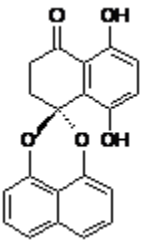
Cuadro 5. Preusomerinas, palmarumicinas y compuestos relacionados con actividad biológica.

Nombre	Estructura	Productor	Actividad biológica	Referencia
Preusomerina D		<i>Hormonema dematioides</i>	Antibacteriano, antifúngico contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Ustilago zaeae</i>	Polishook <i>et al.</i> , 1993
O-desmetil-1-epipreusomerin		<i>Sporormiella vexans</i> (Hongo coprófilo)	Antifúngico contra <i>A. furfuraceus</i>	Soman <i>et al.</i> , 1999
Preusomerina EG ₁		<i>Edenia</i> sp. (Endófito de <i>Petrea volubilis</i>)	Antileishmania <i>L. donovani</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2008
Preusomerina J		<i>Mycelia sterilia</i> (Endófito de <i>Atropa belladonna</i>)	Antibacteriano contra <i>B. megaterium</i> , <i>M. violaceum</i>	Krohn <i>et al.</i> , 2001
Preusomerina EG ₃		<i>Edenia gomezpompae</i> (Endófito de <i>C. acuminata</i>)	Antifúngico <i>A. solani</i> , <i>P. parasitica</i> , <i>P. capsici</i> , <i>F. Oxysporum</i>	Macías <i>et al.</i> , 2008

Cuadro 5. Preusomerinas, palmarumicinas y compuestos relacionados con actividad biológica (continuación).

Nombre	Estructura	Productor	Actividad biológica	Referencia
Palmarumicina CP ₃		<i>Coniothyrium palmarum.</i>	Antifúngico, antibacteriano, alguicida contra <i>E. repens</i> , <i>C. fusca</i>	Krohn <i>et al.</i> , 1994
Palmarumicina CJ 12 372		Hongo filamentoso (Cepa N983-46)	Inhibidor de DNA girasa	Sakemi <i>et al.</i> , 1995
Preusomerina E		<i>Microsphaeropsis</i> sp. (Líquén <i>Dirinaria aplanata</i>)	Antibacteriano, antimalárico contra <i>M. tuberculosis</i> , <i>P. falciparum</i>	Seephonkai <i>et al.</i> , 2002
Palmarumicina CP ₅		<i>Coniothyrium palmarum.</i> (Endófito de <i>Lamium purpureum</i>)	Antifúngico, antibiótico contra <i>U. violacea</i> , <i>B. megaterium</i>	Krohn <i>et al.</i> , 1997
Palmarumicina C ₁₁		<i>Microsphaeropsis</i> sp. (Líquén <i>Dirinaria aplanata</i>)	Antituberculoso y antimalárico moderado contra <i>M. tuberculosis</i> , <i>P. falciparum</i>	Seephonkai <i>et al.</i> , 2002

Cuadro 5. Preusomerinas, palmarumicinas y compuestos relacionados con actividad biológica (continuación).

Nombre	Estructura	Productor	Actividad biológica	Referencia
Palmarumicina JC1		<i>Jatropha curcas</i> Linn	Antibacteriano contra <i>S. aureus</i>	Ravindranath <i>et al.</i> , 2004
Palmarumicina JC2		Frutos de <i>Diospyros</i> <i>ehretioides</i>	Antimalárico, antifúngico, antimicobacteriano, citotóxico contra <i>P. falciparum</i> , <i>C. albicans</i> , <i>M. tuberculosis</i> L. Cel; Vero, KB, NCI-H187, BC	Prajoubklang <i>et al.</i> , 2005
Decaspirona G		<i>Helicoma viridis</i> (Hongo saprofito)	Antibacteriano contra <i>P. aeruginosa</i> , <i>L. lactis</i>	Hu <i>et al.</i> , 2006
Palmarumicina CP ₂		<i>Edenia</i> <i>gomezpomapae</i> (Endófito de <i>C. acuminata</i>)	Antifúngico contra <i>A. solani</i> , <i>P. parasitica</i> , <i>P. capsici</i> , <i>F. oxysporum</i>	Macías <i>et al.</i> , 2008
Palmarumicina CP ₁₇		<i>Edenia</i> sp. (Endófito de <i>Petrea volubilis</i>)	Antileishmania <i>L.</i> <i>donovani</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2008

III. Hipótesis

Se ha demostrado que los hongos endófitos son productores de compuestos bioactivos, los cuales le proporcionan a su planta hospedera diferentes beneficios, desde defensa de los depredadores hasta ventaja competitiva respecto a otras plantas. Por esta razón es posible que los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *Edenia gomezpompae* posean potencial fitotóxico.

IV. Objetivos

Objetivo general

Determinar el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de algunas variantes morfológicas del hongo endófito *Edenia gomezpompae*, mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de tres especies vegetales y sobre mitocondrias y cloroplastos, para así contribuir, al posible desarrollo de agentes herbicidas alternativos biodegradables y con menor impacto ecológico. Asimismo, conocer si los metabolitos secundarios producidos por *E. gomezpompae* están involucrados en los mecanismos de defensa química de su hospedera.

Objetivos particulares

- Realizar cultivos en pequeña escala de cuatro variantes morfológicas del hongo endófito *Edenia gomezpompae*, empleando condiciones de incubación estáticas y caldo-papa-dextrosa como medio de cultivo.
- Obtener los extractos orgánicos de los cultivos de las variantes morfológicas a partir del medio de cultivo a través de particiones sucesivas y del micelio sometiéndolo a un proceso de maceración exhaustivo.
- Determinar cuantitativamente el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos y de los metabolitos secundarios producidos por *E. gomezpompae*, evaluando su efecto sobre la germinación, el crecimiento de la raíz, y la respiración durante el proceso de germinación de la semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli*, *Solanum esculentum* y *Lactuca sativa*, mediante el método en caja Petri.
- Establecer la concentración inhibitoria media de los extractos orgánicos y compuestos puros, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las plantas blanco.

- Evaluar el efecto de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas y de los metabolitos secundarios mayoritarios producidos por *E. gomezpompae*, sobre la respiración en mitocondrias intactas aisladas de espinaca.
- Establecer el mecanismo de acción fitotóxico de los principales compuestos puros, y de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae*, estudiando su efecto sobre diferentes actividades de la fase luminosa de la fotosíntesis:
 - a) síntesis de ATP
 - b) velocidad del transporte de electrones; basal, desacoplado y fosforilado de H₂O a MV
 - c) velocidad del transporte de electrones desacoplado en el FSII de H₂O a DCPIP/ red
 - d) velocidad del transporte de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP_{red} a MV, en cloroplastos aislados de hojas de espinaca
- Establecer el perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas C1c, C1e, C1e2a y C1e2b de *E. gomezpompae*, mediante el empleo de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), y correlacionar la actividad obtenida con el tipo y cantidad de metabolitos secundarios presentes.

V. Metodología

1. Material fúngico

El hongo endófito *Edenia gomezpompae* fue aislado de hojas sanas del árbol *Callicarpa acuminata* Humb *et al.* (Verbenaceae) colectadas en la reserva ecológica "El Edén", en Quintana Roo (Anaya *et al.*, 2003). La identidad de este microorganismo fue establecida por métodos moleculares (González *et al.*, 2007).

El hongo *E. gomezpompae* 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, EU.

Se obtuvieron cuatro aislamientos de *E. gomezpompae* a partir de hojas de *C. acuminata* colectadas en diferentes áreas de estudio en la Reserva Ecológica "Eden" y corresponden a las variantes morfológicas denominadas cepa C1c, C1e, C1e2a y C1e2b (Figura 5) (Saucedo-García, 2006; Anaya *et al.*, 2003).

2. Composición de los medios de cultivo para el crecimiento de las variantes morfológicas del hongo endófito *E. gomezpompae*

Papa-Dextrosa-Agar (PDA): se utilizaron 200 g de papas frescas previamente peladas y cortadas en cubos pequeños, y se hirvieron durante 20 min. La decocción resultante se filtró a través de gasa, y se agregaron 20 g de dextrosa y 15 g de agar. Finalmente, se aforó a un volumen final de 1000 mL con agua destilada, se homogenizó y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Ulloa y Hanlin, 1978).

Caldo-Papa-Dextrosa (CPD): se preparó siguiendo la metodología indicada para el medio PDA, con la diferencia de que no se le adicionó agar.

3. Cultivo de las variantes morfológicas de *Edenia gomezpompae* y obtención de los extractos orgánicos

3.1 Cultivo en condiciones estáticas de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae*

Los cultivos de las variantes morfológicas del hongo endófito *E. gomezpompae* (cepas C1c, C1e, C1e2a y C1e2b) se realizaron en matraces Fernbach de 2,800 mL, conteniendo un litro de CPD. El inóculo consistió en cinco cortes circulares del micelio de la variante correspondiente realizados con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro, sobre el micelio de un cultivo de 15 días en PDA. Los matraces se incubaron estáticamente por un período de 30 días a 28°C, con fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h con luz fluorescente. El producto de cada fermentación se filtró a través de varias capas de gasa, para separar el micelio del medio de cultivo y se procedió a la preparación de los extractos microbianos (Macías Rubalcava *et al.*, 2008, 2010, 2014; Sánchez, 2010; Meléndez-González, 2009, Armendáriz-Guillén, 2013).

3.2 Obtención de los extractos orgánicos del medio y del micelio

El micelio húmedo de cada una de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* se sometió a un proceso de maceración con 1 L de diclorometano (CH₂Cl₂) durante tres días, repitiendo tres veces más este proceso experimental. Inmediatamente después y con el mismo procedimiento, se realizaron cuatro extracciones más con acetato de etilo (AcOEt). Los extractos resultantes se filtraron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío.

Los extractos de los medios de cultivo se obtuvieron mediante sucesivas particiones orgánicas empleando los mismos disolventes que en las maceraciones (CH₂Cl₂ y AcOEt). La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2010, 2014; Sánchez, 2010; Meléndez-González, 2012, Armendáriz-Guillén, 2013).

Cada uno de los extractos obtenidos a partir del micelio y del medio de cultivo (16 extractos en total) se analizó por cromatografía en capa fina (CCF), observándose que

cada par de extractos (CH₂Cl₂ y AcOEt) eran cromatográficamente similares, por lo que se decidió combinarlos (extracto CH₂Cl₂-AcOEt medio de cultivo y extracto CH₂Cl₂-AcOEt micelio) obteniéndose así dos extractos por variante morfológica (8 extractos totales). Cada uno de los extractos resultantes se evaluó para la determinar su potencial fitotóxico utilizando el método de la caja de Petri descrito en el inciso 3.1.

4. Obtención de los bisnaftoespirocetales producidos por *E. gomezpompae*

Las preusomerinas EG₁, EG₂, EG₃ y EG₄ y las palmarumicinas EG₁, CP₂, CP₁₇ y CP₁₈ puras empleadas para el desarrollo de la presente investigación, fueron obtenidas de trabajos previos desarrollados en nuestro grupo de trabajo (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2014; González-Meléndez, 2009).

5. Evaluación del potencial fitotóxico en plantas

La determinación cuantitativa del efecto fitotóxico de los extractos orgánicos (CH₂Cl₂-AcOEt) y de los compuestos puros de *E. gomezpompae* se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre la respiración, la germinación y el crecimiento de la raíz de tres plantas de prueba: *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) [amaranto], *Solanum esculentum* (Solanaceae) [jitomate], *Lactuca sativa* (Asteraceae) [lechuga], para los extractos orgánicos, y *Echinochloa crus-galli* (Poaceae) [zacate de agua] para los compuestos puros. Las semillas de *A. hypochondriacus* se obtuvieron en el Mercado de Tulyehualco, D.F.; las de *S. esculentum*, en “Semillas Berentsen”, Celaya, Gto.; las de *L. sativa*, en “Hidrocultivo Cosecha Natural”, Cuautitlán Izcalli, Edo. Mex.; y las de *Echinochloa crus-galli*, de plantas cultivadas en el invernadero del Instituto de Ecología (UNAM).

Con la finalidad de diseñar una curva de concentración vs respuesta del efecto fitotóxico de cada uno de los extractos y compuestos puros, sobre la respiración, la germinación y el crecimiento de la raíz de las tres semilla blanco, en primera instancia, se evaluó el efecto de los extractos a 100 µg/mL (100 ppm). Los bioensayos de fitotoxicidad se realizaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro. Para preparar las muestras se pesaron 6 mg de extracto orgánico o compuesto puro. Los extractos del medio de cultivo y los compuestos

puros se disolvieron en 200 μ L de metanol, mientras que los extractos del micelio para *A. hypochondriacus*, *S. esculentum* y *E. crus-galli* se disolvieron en 100 μ L de acetona, y en 40 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para *L. sativa*. Posteriormente, se agregaron 30 mL de agua destilada y 30 mL de agar al 2 %, para obtener una concentración final de 100 μ g/mL. A continuación, 5 mL de las disoluciones se vertieron en las cajas Petri y se dejaron solidificar por completo (aproximadamente 40°C). En seguida, se colocaron 30 semillas por caja Petri de cada una de las especies de prueba. Las cajas se incubaron en la oscuridad a 27°C, y la actividad fitotóxica se registró después de 24 h para *A. hypochondriacus*, 48 h para *L. sativa* y *E. crus-galli*, y 72 h para *L. esculentum*. Paralelamente, se evaluaron controles negativos y positivos. Como control negativo, se usó agar-agua al 1%, agar-agua 1%/metanol (200 μ L), agar-agua 1%/acetona (100 μ L), y agar-agua 1%/DMSO (40 μ L); y como control positivo se utilizó el herbicida comercial RIVAL® (Glifosato: sal monoamónica de N-(fosfonometil) glicina) a 100 y 300 μ g/mL. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado bajo un diseño al azar (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010, 2014).

Una vez transcurrido el periodo de incubación se determinó, en primer lugar, el efecto de cada uno de los tratamientos sobre la respiración, mediante el registro del consumo de oxígeno de las plántulas, utilizando un electrodo de Clark tipo O₂ conectado a un oxímetro YSI® modelo 5300 a 27°C. Las plántulas de cada una de las cajas Petri se transfirieron a una cámara de vidrio, se adicionaron 4 mL de agua desionizada y se determinó el consumo de oxígeno durante 3 minutos, registrando las lecturas cada 5 segundos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2014; King-Díaz *et al.*, 2005). Por otra parte, se registró la longitud de las radículas, y se contó el número de semillas germinadas.

Con excepción del efecto de los extractos derivados del micelio sobre las semillas de *L. sativa*, en que se emplearon concentraciones de 25, 50 y 100 μ g/mL, para establecer las concentraciones inhibitoria medias (CI₅₀) de los extractos orgánicos y de los compuestos puros se utilizaron concentraciones de 50, 100 y 200 μ g/mL para cada semilla blanco. Asimismo, se utilizó Glifosato® como control positivo, a las concentraciones de 50, 100 y 200 μ g/mL, y como control negativo, los mismos empleados para la prueba preliminar. El

análisis mediante regresión lineal de cada una de las curvas, permitió determinar cuantitativamente el oxígeno consumido por las plántulas de cada una de las semillas en presencia de los diferentes tratamientos. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha= 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2014; Sánchez, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013).

6. Evaluación de los extractos orgánicos y compuestos puros en la respiración mitocondrial

6.1 Extracción de mitocondrias

El aislamiento de las mitocondrias intactas se obtuvo a partir de una modificación del protocolo propuesto por Rödinger *et al.* (2009), descrito a continuación. Las mitocondrias se obtuvieron a partir de 120 g de hojas de espinacas (*Spinacea oleracea* L.) frescas, verdes y turgentes. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo en frío (~ 4°C). Las hojas se lavaron con agua destilada para eliminar la tierra, se les removió la nervadura central y el ápice. Posteriormente, se fragmentaron y colocaron en un vaso de licuadora previamente enfriado, conteniendo 200 mL de buffer de extracción (EB) (sucrosa 0.45 M, MOPS 15 mM, EGTA 1.5 mM, pH ajustado a 7.4 con KOH, y complementado inmediatamente antes de su uso con PVP 0.6%, BSA 0.2%, DTT 10 mM y PMSF 0.2 mM). A continuación, se homogeneizaron en una licuadora Osterizer® durante 5 segundos intermitentes a velocidad máxima. El homogeneizado se filtró a través de ocho capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 9,000 rpm durante 5 minutos a (centrífuga Beckman Modelo J2-21). El sedimento se desechó y el sobrenadante (que contenía mitocondrias) se centrifugó a 16,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se desechó, y el sedimento (con mitocondrias) se resuspendió con un pincel en 2 mL de buffer de lavado (WB) (sucrosa 0.3 M, MOPS 10 mM, EGTA 1 mM, pH ajustado a 7.2 con KOH, y complementado inmediatamente antes de su uso con PMSF 0.2 M). Posteriormente, la suspensión se colocó en tubos de gradientes de percoll (previamente preparados con 6 mL de 45%, 25% y 5% de percoll y buffer de sucrosa 0.3 M, MOPS 10 mM, pH 7.2 con KOH), se

centrifugó 45 minutos a 12,800 rpm, y se recuperaron las mitocondrias intactas, que se encontraban en la parte inferior del tubo (en la fracción de 45% de percoll). A esto se le añadieron 15 mL de buffer de resuspensión (RB) (manitol 0.3 M, MOPS 10 mM, EDTA 1 mM, pH ajustado a 7.4 con KOH, y complementado inmediatamente antes de su uso con BSA 0.1%), y se sedimentó con centrifugación de 15 minutos a 12,800 rpm; finalmente, el sedimento obtenido se resuspendió en la cantidad necesaria de RB para obtener 10 mg proteína/mL (aproximadamente 6 mL de RB). La cuantificación de proteína se realizó de acuerdo a la metodología de Bradford (1976).

6.2 Medición de la respiración mitocondrial

Una vez extraídas las mitocondrias, se transfirieron 500 μ L de suspensión a una cámara de vidrio, se adicionó el extracto o compuesto puro disuelto en DMSO, y la cantidad necesaria de RB para obtener un volumen final de 1 mL. El consumo de oxígeno se determinó durante 3 minutos cada 5 segundos, utilizando un electrodo de Clark tipo O₂ conectado a un oxímetro YSI® modelo 5300 a 27°C. Los extractos orgánicos y compuestos puros se evaluaron a concentraciones de 100 y 200 μ g/mL. Como control positivo se utilizó el 2,4-dinitrofenol, en un intervalo de concentraciones de 10 a 800 μ M; y como control negativo se empleó DMSO a la máxima concentración de prueba (5 μ L). El análisis mediante regresión lineal de cada una de las curvas, permitió cuantificar el oxígeno consumido por las mitocondrias en presencia de los tratamientos. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I (α = 0.05) y una prueba de contrastes de Tukey HSD, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2014; Sánchez, 2010; Armendáriz-Guillén, 2013).

7. Evaluación de los extractos orgánicos y compuestos puros sobre la fotosíntesis

7.1 Aislamiento de los cloroplastos

Los cloroplastos se obtuvieron a partir de 100 g de hojas de espinacas (*Spinacea oleracea*) frescas, verdes y turgentes. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo en frío (~4°C) y

en la oscuridad. Las hojas se lavaron con suficiente agua destilada para eliminar la tierra, se les removió la nervadura central y el ápice. Posteriormente, se fragmentaron y se colocaron en un vaso de licuadora previamente enfriado, conteniendo 250 mL de medio para aislar cloroplastos (sacarosa 400 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCl 20 mM y tricina 15 mM, ajustado a pH 8.0 con KOH). A continuación, se homogeneizaron en una licuadora Osterizer® durante 5 segundos intermitentes a velocidad máxima. El homogeneizado se filtró a través de ocho capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 minutos a 4°C (centrífuga Modelo Sorval Super T21, Dupont). Por último, el sobrenadante se desechó y el sedimento (cloroplastos) se resuspendió en 1 mL del medio de aislamiento y se guardó en oscuridad por una hora a 4°C (King-Díaz *et al.*, 2005; Morales-Flores *et al.*, 2007).

7.2 Cuantificación de la clorofila

La clorofila se cuantificó de acuerdo al método de Arnon y colaboradores (1994), como se describe a continuación: se transfirió una alícuota 15 μ L de la suspensión de cloroplastos a un matraz de 5 mL y luego se aforó con solución de acetona al 80%, la mezcla resultante se agitó en un vórtex. Esta suspensión se mantuvo en la oscuridad por 5 minutos para permitir la extracción y solubilización de la clorofila, así como para evitar su degradación por la luz. Posteriormente, se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 minutos, con el propósito de sedimentar las proteínas y otros residuos precipitados de los cloroplastos. A continuación, se cuantificó el contenido de clorofila mediante la determinación de la absorbancia a 663 y 645 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman® modelo DU 650 (King-Díaz *et al.*, 2005; Morales-Flores *et al.*, 2007). Por último, la concentración de clorofila se realizó por duplicado y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Chl = 8.05 (A_{663}) + 20.29 (A_{645}), \text{ en donde:}$$

$$Chl = \mu\text{g de clorofila por mL}^{-1}$$

8.05 y 20.29 = constantes establecidas experimentalmente a partir de los coeficientes de extinción para cada una de las longitudes de onda

A= absorbancia a las longitudes de onda indicadas

7.3 Medición de la Síntesis de ATP

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.00 y 8.05, para lo cual se utilizó un microelectrodo combinado Orion® modelo 8103 Ross, conectado a un potenciómetro Corning modelo 12 con escala expandida. El voltaje generado por los cambios de pH se transdujo en un registrador gráfico Gilson®.

Para llevar a cabo la determinación, se adicionaron 30 μL de ADP 1 mM, 30 μL de P_i (K_2HPO_4) 3 mM y el equivalente a 60 μg de clorofila, a 3 mL del medio de reacción para la síntesis de ATP (sacarosa 100 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, KCN 0.5 mM, MV 50 μM , y tricina 1 mM, ajustado a pH 8 con KOH). Los extractos orgánicos se evaluaron a 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y los compuestos puros a 12.5, 25, 50, 100 y 200 μM . El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un período de iluminación de un minuto. Como fuente de iluminación se empleó una lámpara de led que emitía luz azul. El gradiente de H^+ producido se cuantificó por titulación; esto se realizó mediante la adición de 10 μL de una solución estándar de KOH 0.01 N al medio de reacción, en presencia de cloroplastos sin iluminar (Dilley, 1972; King-Díaz *et al.*, 2005; Morales-Flores *et al.*, 2007).

La velocidad de síntesis de ATP se calculó de la siguiente manera:

$$V = AH / C, \text{ en donde:}$$

V = velocidad de la síntesis de ATP (mMoles de ATP mg^{-1} Clorofila hr^{-1}).

A = μmoles de H^+ usados en la titulación con KOH / altura de la curva en cm.

H = altura de la curva obtenida en cm en un minuto de iluminación.

C = concentración de la clorofila empleada.

7.4 Medición de la velocidad de transporte de electrones

La determinación de la velocidad del transporte de electrones (Te^-) se midió bajo tres condiciones experimentales: basal, fosforilante y desacoplado, empleando metil viológeno (MV) como aceptor final de electrones; y se evaluó indirectamente al monitorear la producción de oxígeno que se libera durante la fotólisis del agua con un oxímetro YSI® modelo 5300 y un electrodo tipo Clark.

Para llevar a cabo la determinación del Te^- basal, se adicionó el extracto o compuesto puro a evaluar, y el equivalente de cloroplastos a 60 μg de clorofila, a 3 mL de medio de transporte de electrones con MV (sacarosa 100 mM, KCl 10 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 5 mM, tricina 1 mM, KCN 0.5 mM y MV 50 μM , ajustado a pH 8 con KOH). Los extractos orgánicos se ensayaron a concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y los compuestos puros a 12.5, 25, 50, 100 y 200 μM . La mezcla resultante se agitó y se iluminó empleando una lámpara de led que emitía una luz azul, como se indicó previamente (Morales-Flores *et al.*, 2007).

La determinación del Te^- fosforilante y desacoplado se llevó a cabo de manera similar al basal, con la diferencia de que para el Te^- fosforilante se adicionó ADP 3 mM y Pi 3 mM, y para el Te^- desacoplado se agregó el agente desacoplante NH_4Cl 6 mM (Saha *et al.*, 1971; Morales-Flores *et al.*, 2007; Meixuiero, 2008).

En todos los casos, se realizaron controles al inicio y al final de cada experimento; éstos consistieron en la mezcla de reacción mencionada para cada experimento, sin la adición del extracto o compuesto a ensayar. La velocidad obtenida con la adición de los extractos orgánicos y los compuestos puros se comparó con la velocidad del control de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$V = (0.4 \mu\text{eq de } \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{Xt} \cdot \text{Xp} \cdot 60 \text{ min/hr} \cdot 1 / 0.060 \text{ mg de clorofila}), \text{ en donde:}$$

V= velocidad del flujo de electrones en $\mu\text{eq e}^- \text{h}^{-1} \text{mg de clorofila}^{-1}$

Xp= pendiente obtenida de los trazos problemas

Xt= altura de la curva obtenida en cm al consumirse 0.4 μeq de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ al minuto de iluminación.

7.5 Medición del flujo de electrones de los PS II y PS I

La determinación del flujo de electrones en los PS II y I se efectuó utilizando el procedimiento experimental descrito para medir la velocidad del flujo de electrones en el Te^- basal, fosforilante y desacoplado, con la diferencia de que el medio de Te^- fue suplementado el con agentes desacoplantes, donadores y aceptores artificiales e

inhibidores de la cadena redox, como se describe a continuación (King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007).

Para cuantificar el flujo de electrones en el PS I, se adicionaron DCMU 10 μM , DCPIP 100 μM reducido con ascorbato de sodio 300 μM , el equivalente a 60 μg de clorofila, el extracto o compuesto puro, a 3 mL del medio de Te^- con MV + NH_4Cl . El DCMU se empleó como inhibidor de la enzima Q_B , impidiendo así el paso de electrones del PS II al PS I; el DCPIP reducido se utilizó como donador de electrones a nivel del complejo $\text{Cit}_{\text{b6/f}}$, ya que compite con la plastoquinona (PQ), y el MV se empleó como aceptor final de electrones. Para la determinación del Te^- dentro del PS II, se adicionaron DBMIB 0.6 mM, DCBQ 20 μM , el equivalente a 60 μg de clorofila, y el extracto o compuesto puro, a 3 mL del medio de Te^- sin MV + NH_4Cl . El DBMIB se utilizó como inhibidor del flujo de electrones al PS I y el DCQB fungió como aceptor artificial de electrones (King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007). Las concentraciones de prueba para los extractos orgánicos fueron de 25, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y para los compuestos puros de 12.5, 50 y 200 μM .

7.6 Determinación del Te^- desacoplado en las reacciones parciales del PS II

Para la evaluación del Te^- dentro del PS II, se utilizaron dos esquemas de reacción: uno que comprende de H_2O a SiMo, y el segundo de DPC a DCPIP. Para cuantificar la reacción parcial de H_2O a SiMo, se adicionaron SiMo 200 μM , DCMU 10 μM , el equivalente a 60 μg de clorofila, y el extracto orgánico o compuesto puro, a 3 mL del medio de Te^- sin MV + NH_4Cl . El SiMo se utilizó como aceptor final de electrones, y el DCMU impidió el paso de electrones hacia el PS I. Las concentraciones de prueba para los extractos orgánicos fueron de 25, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y para los compuestos puros de 12.5, 50 y 200 μM . La velocidad del Te^- de los extractos orgánicos y compuestos puros se comparó con la obtenida por el control (Hauska *et al.*, 1977; King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007).

Para la determinación del Te^- en la reacción parcial de DPC a DCPIP, en primer lugar, se tomó el equivalente a 3,000 μg de clorofila, se les añadieron 10 mL de Tris 0.8 M pH=8.0, y se dejaron en agitación en frío y oscuridad por 30 min. Después de este tiempo, se

centrifugaron 1 min a 10,000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 0.5 mL de medio de aislamiento, y se volvió a cuantificar clorofila. Posteriormente, se adicionaron 10 μ L de DPC 20 mM, 1.6 μ L de DBMIB 0.6 mM, 5 μ L de DCPIP 20 mM, el equivalente a 60 μ g de clorofila, y el extracto orgánico o compuesto puro, a 3 mL de medio de Te⁻ sin MV + NH₄Cl. El DCPIP oxidado actuó como aceptor final de electrones, cambiando su color de azul a transparente. La cuantificación del flujo de electrones se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco la mezcla de reacción sin DCPIP. Las concentraciones empleadas para los extractos orgánicos fueron de 50, 100 y 200 μ g/mL, y para los compuestos puros de 50, 100 y 200 μ M.

8. Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* empleando CLAR

El análisis de la composición metabólica de los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas C1c, C1e, C1e2a y C1e2b del hongo endófito *E. gomezpompae*, se realizó utilizando un sistema de HPLC Watters® (Alliance2695) equipado con un detector de fotodiodo (modelo 2996). Para el análisis, se tomaron 5 mg del extracto orgánico y se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo. Se filtraron en una malla de nylon de 0.4 μ m, y se introdujeron para su análisis en el equipo HPLC Watters (CLAR), empleando una columna de fase reversa (Atlantis C₁₈, 5 μ m x 150 mm x i.d. 4.6 mm) a temperatura ambiente con un flujo de 0.6-1 mL/min. Se empleó un gradiente de polaridad, empezando con MeCN:H₂O 80:20 a 100% MeCN por 0-30 min con un flujo de 0.6 mL/min, y manteniéndolo hasta por 40 min, con un flujo de 1 mL/min. Paralelamente, se analizó una cantidad conocida de cada uno de los compuestos puros, y se determinó el tiempo de retención y el área del pico. El control del equipo, la adquisición de los datos, y el procesamiento y manejo de la información obtenida, se llevó a cabo con el software Empower 2.0. Los tiempos de retención (R_T) de los picos obtenidos por las preusomerinas y palmarumicinas a 225 nm fueron de: Pa CP₁₇ (R_T= 13.9 min), Erg (R_T= 17.4 min), Pr EG₄ (R_T= 18.0 min), Pa CP₁₉ (R_T= 18.6 min), Pa EG₁ (R_T= 19.5 min), Pa CP₂, Pr EG₂ (R_T= 20.1 min), y Pr EG₃ (R_T= 23.3 min).

VI. Resultados y discusión

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de estudiar el potencial herbicida de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de las variantes morfológicas C1c, C1e, C1e2a y C1e2b del hongo endófito *Edenia gomezpompae*, y de los metabolitos secundarios biosintetizados, mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de plantas modelo, así como sobre la respiración mitocondrial y las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis. Los resultados obtenidos se dividen en cinco partes. La primera corresponde a la obtención de los cultivos en pequeña escala de las cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y a la obtención de los extractos orgánicos. La segunda incluye la evaluación biológica de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio y de los metabolitos secundarios mayoritarios sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de tres plantas modelo. La tercera se enfoca a la investigación del posible mecanismo de acción de los extractos fitotóxicos y compuestos puros sobre la respiración en mitocondria intacta aislada de *S. oleracea*. La cuarta parte se refiere a la evaluación de los extractos orgánicos y de los metabolitos secundarios con mayor fitotóxico sobre la respiración mitocondrial sobre la síntesis de ATP, el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado, y sobre las reacciones parciales de los fotosistemas II y I (PS II y PS I). Por último, la quinta parte corresponde al análisis comparativo de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de las cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae*, utilizando HPLC. En la Figura 6 se muestra la secuencia metodológica llevada a cabo para el desarrollo de la presente investigación.

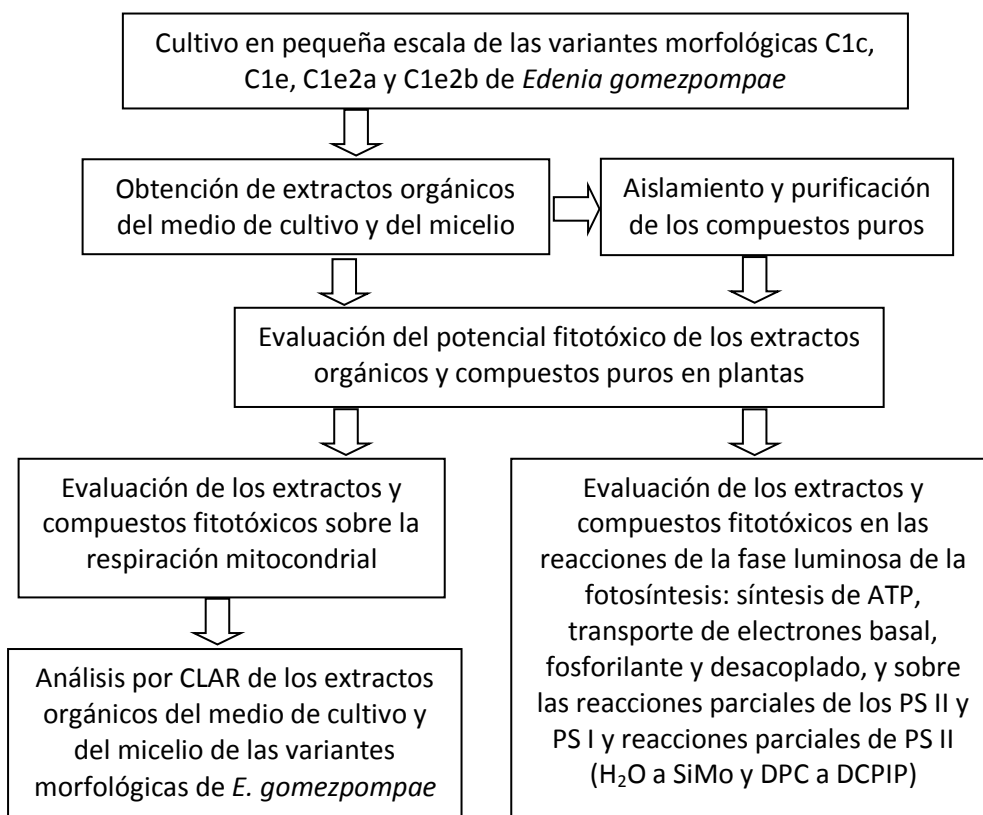


Figura 6. Secuencia metodológica empleada para el desarrollo de la presente investigación.

1. Cultivo en pequeña escala de las variantes morfológicas de *Edenia gomezpompae*

Las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* se cultivaron en caldo papa dextrosa por un período de 30 días a 28°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se obtuvieron los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio. En el Cuadro 6 se muestran los rendimientos obtenidos para los extractos de las cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae*. Como se puede apreciar en todos los casos, se obtuvo un rendimiento mucho mayor para el extracto del micelio que para el de medio de cultivo.

Cuadro 6. Rendimientos de los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo y de las cuatro variantes de *E. gomezpompae* cultivados en pequeña escala.

Variante morfológica	Extracto (mg/L)	
	Micelio (mic)	Medio (med)
C1c	821	169
C1e	979	242
C1e2a	2086	342
C1e2b	1901	149

A continuación, se procedió a establecer el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos, evaluando el efecto de los mismos sobre tres plantas de prueba.

2. Evaluación del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos sobre tres plantas de prueba

Inicialmente, se evaluó el efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* a 100 µg/mL sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum* y *Lactuca sativa*.

En la Figura 7 se muestra el efecto inhibitorio de los extractos a 100 µg/mL sobre la germinación de las plantas evaluadas. La especie más afectada por los extractos fúngicos fue *L. sativa*. Todos los porcentajes de inhibición fueron estadísticamente significativos γ , en general, los extractos del medio de cultivo mostraron mayor inhibición sobre la germinación de *L. sativa* con respecto a los extractos de micelio. El extracto de la variante morfológica C1e med fue el que afectó con mayor potencia la germinación, provocando un efecto inhibitorio del 80%. Con respecto a las semillas de *S. lycopersicum*, solamente los extractos de las variantes C1c mic y C1e2b med inhibieron significativamente su germinación, en un 50% y 27.5%, respectivamente. En contraste, ningún extracto provocó inhibición de la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus*. Cabe destacar que el control positivo, el herbicida comercial Glifosato®, no inhibió significativamente la germinación de ninguna semilla de prueba.

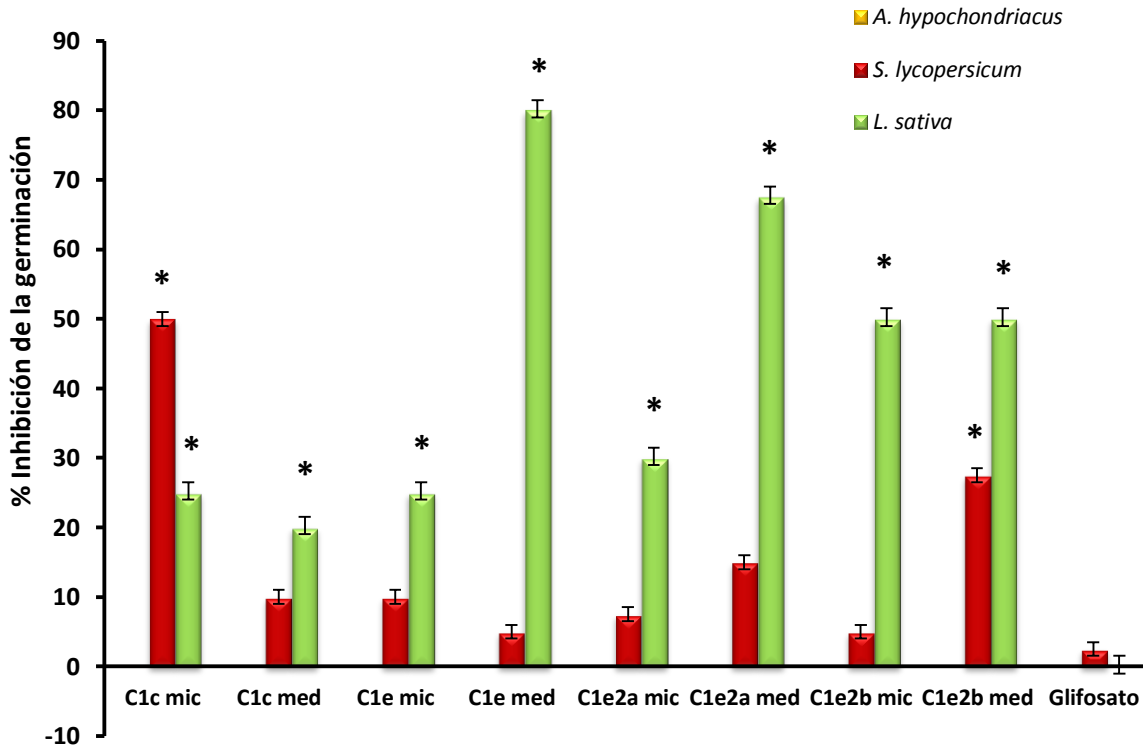


Figura 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y del medio de cultivo de las variantes morfológicas de *E. goezpompae* a 100 µg/mL sobre la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *L. sativa*. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

En la Figura 8 se muestran los porcentajes de inhibición de los extractos a de las variantes morfológicas de *E. goezpompae* evaluadas a 100 µg/mL sobre el crecimiento de la raíz de las plantas prueba. Todas las especies fueron inhibidas significativamente por al menos uno de los extractos evaluados. En general, los extractos de medio de cultivo fueron los que generaron mayor inhibición sobre el crecimiento de la raíz de las tres semillas, siendo los extractos de las variantes C1c med y C1e med los mayores inhibidores de las plantas prueba. Las semillas más afectadas fueron las de *L. sativa*, en donde, en general, los medios de cultivo mostraron porcentajes de inhibición de la raíz, mayores respecto a los extractos del micelio correspondiente. El extracto de la variante C1e med fue el que generó la mayor inhibición, alcanzando un 44.4%, seguido por el extracto de las variantes C1e2a med y C1c med, con inhibiciones de 44.0% y 42.8%, respectivamente. Con respecto a las semillas de *S. lycopersicum*, los extractos de micelio provocaron inhibiciones mayores a los efectos demostrados por los extractos del medio de cultivo, y en todos los casos

mayores al 20%. C1c mic fue el extracto que logró la mayor inhibición sobre el crecimiento de la raíz, con un 51.5%, seguido del extracto de su medio de cultivo, con 36.6% de inhibición. Las semillas de *A. hypochondriacus*, sólo fueron afectadas significativamente por los extractos de medio de cultivo, siendo el extracto C1c med el que demostró el mayor efecto inhibitorio, con un 51.2%, seguido del extracto de las variante C1e med, con un 34.5%. El Glifosato® inhibió en menor grado el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* respecto a los extractos fúngicos. Con respecto a las semillas de *L. sativa*, en general, fueron inhibidas de manera similar al efecto mostrado por los extractos fúngicos. En el caso de *S. lycopersicum*, el control positivo generó una inhibición de 69.6%, mayor que la provocada por e los extractos de las variantes de *E. gomezpompae*.

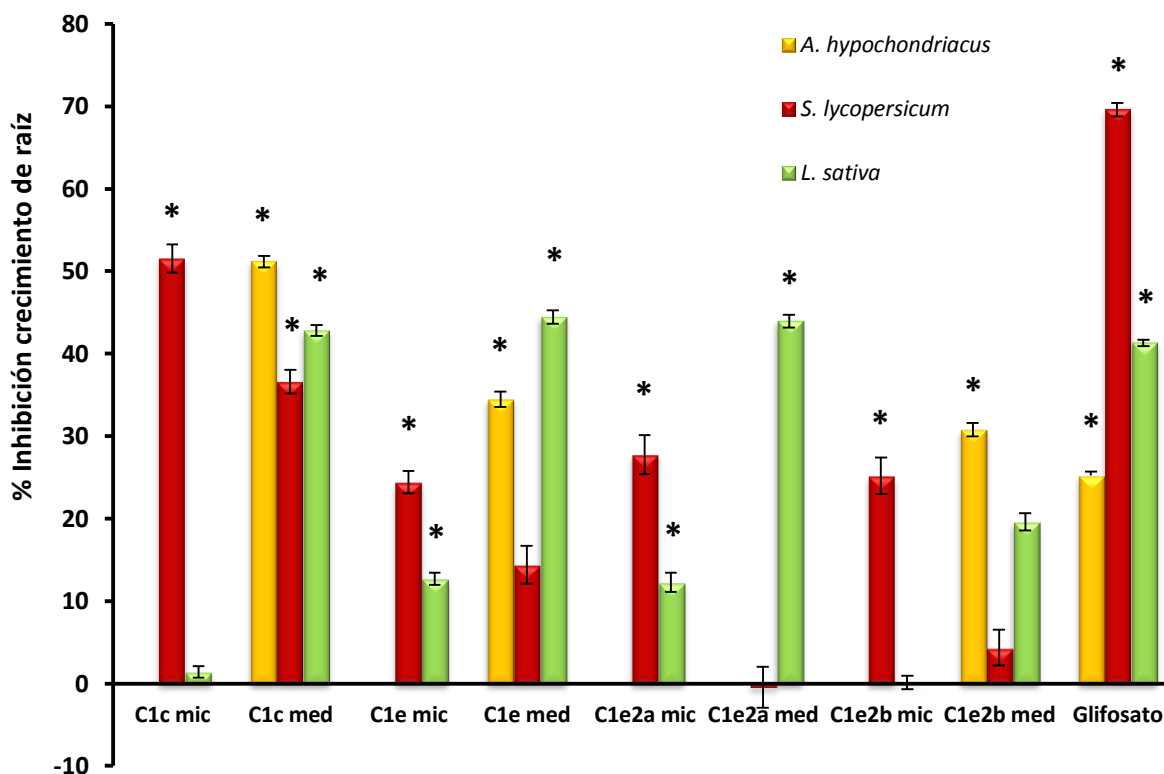


Figura 8. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* a 100 µg/mL sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *L. sativa*. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

Por último, en la Figura 9 se muestran los porcentajes de inhibición de los extractos fúngicos a 100 µg/mL sobre la respiración durante el proceso de germinación de las tres plantas de prueba. El consumo de O₂ de las plántulas de *L. sativa* fue el más afectado, en donde, al igual que en el crecimiento de la raíz, los extractos de medio de cultivo inhibieron más respecto a su extracto de micelio. El extracto C1e med fue el que generó mayor inhibición, con un 71.5%, seguido del extracto de la variante C1e2a med, con un 54%. Las semillas de *S. lycopersicum* son inhibidas en mayor grado por los extractos de los micelios que por los de medio de cultivo. El extracto C1c mic provocó un 52.2% de inhibición, seguido por el extracto C1e2b mic, con un 30.7%. Por el contrario, las plántulas de *A. hypochondriacus* presentan la menor inhibición del consumo de O₂, únicamente es inhibida significativamente por el extracto C1c med. El control de Glifosato® provocó inhibición significativa sobre la respiración de las tres semillas, sin embargo, en ningún caso llegó al 50%.

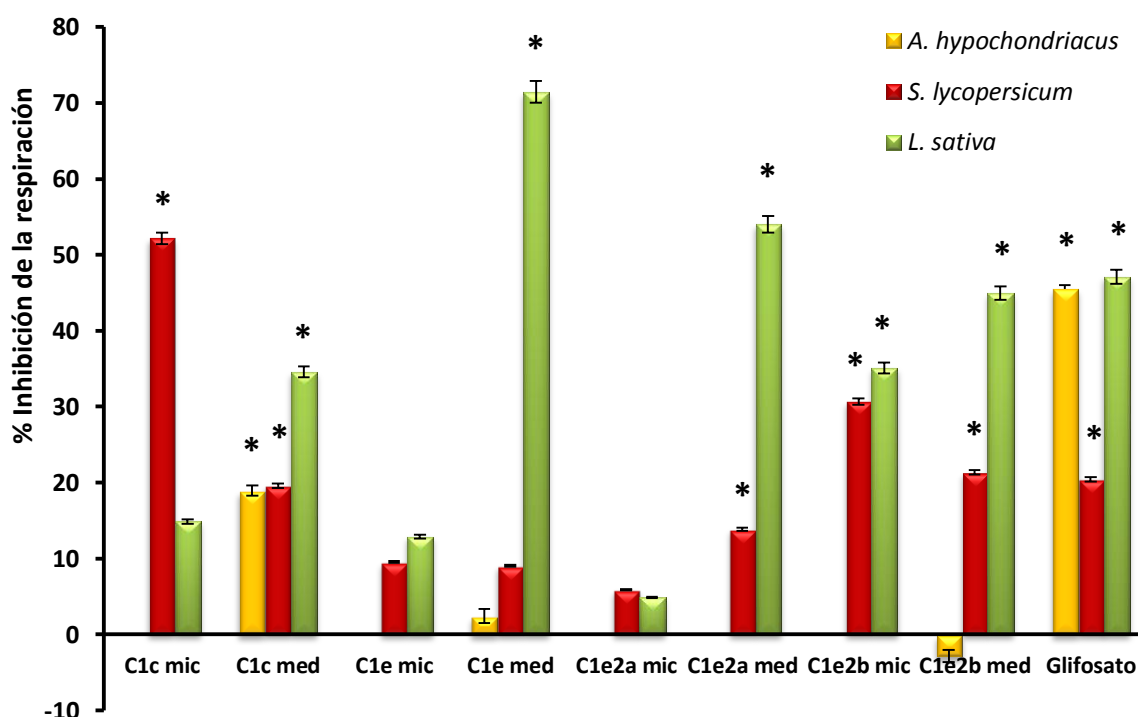


Figura 9. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y del medio de cultivo de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* a 100 µg/mL sobre la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *L. sativa*. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

Considerando el potencial fitotóxico observado a 100 µg/mL, y con el fin de calcular las CI_{50} de cada uno de los extractos orgánicos derivados de las cuatro variantes de *E. gomezpompae*, se evaluó el efecto de los extractos fúngicos utilizando tres concentraciones de prueba. En todos los casos, las concentraciones fueron de 50, 100 y 200 µg/mL, excepto para los extractos de medio de cultivo sobre la semillas de *L. sativa*, en donde las concentraciones fueron de 25, 50 y 100 µg/mL. En el Cuadro 7 se muestran las CI_{50} calculadas sobre germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las plantas modelo.

Con respecto a la germinación, las semillas de *L. sativa* fueron las más afectada por los extractos de medio de cultivo, siendo los siguientes sus mayores inhibidores: C1e med, $CI_{50}= 96.2 \mu\text{g/mL} > \text{C1e2a med}, CI_{50}= 97.9 \mu\text{g/mL} > \text{C1e2b med}, CI_{50}= 100.0 \mu\text{g/mL}$. Las semillas de *S. lycopersicum* únicamente fueron inhibidas con valores de $CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ por los extractos C1c mic, $CI_{50}= 128.7 \mu\text{g/mL}$ y C1e2b med, $CI_{50}= 144.1 \mu\text{g/mL}$. Por último, *A. hypochondriacus* fue la especie menos afectada, en todos los casos, con valores de CI_{50} mayores a 200 µg/mL. El Glifosato® mostró valores de $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ sobre la germinación de las tres semillas de prueba (Cuadro 7).

El efecto fitotóxico sobre el crecimiento de la raíz provocado por la mayoría de los extractos de medio de cultivo, muestra valores de $CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ en las tres plantas de prueba. En contraste, la mayoría de los extractos de micelio muestran valores de $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$. Las semillas de *L. sativa*, fueron más afectadas por los extractos C1e med, $CI_{50}= 106.9 \mu\text{g/mL} > \text{C1e2a med}, CI_{50}= 107.2 \mu\text{g/mL} > \text{C1c med}, CI_{50}= 122.6 \mu\text{g/mL}$. Las semillas de *S. lycopersicum* fueron más afectadas por los extractos C1c mic, $CI_{50}= 53.0 \mu\text{g/mL} > \text{C1c med}, CI_{50}= 109.9 \mu\text{g/mL} > \text{C1e2b med}, CI_{50}= 131.8 \mu\text{g/mL}$. Por último, los extractos de medio de cultivo C1c med, $CI_{50}= 82.5 \mu\text{g/mL} > \text{C1e med}, CI_{50}= 112.2 \mu\text{g/mL} > \text{C1e2b med}, CI_{50}= 127.7 \mu\text{g/mL}$, muestran el mayor potencial fitotóxico sobre *A. hypochondriacus*. Cabe destacar que los extractos del medio de cultivo de las variantes C1c y C1e fueron los únicos que provocaron inhibición sobre el crecimiento de la raíz con valores de $CI_{50} < 200$

$\mu\text{g}/\text{mL}$ en las tres semillas de prueba, y el extracto C1e2b med sobre dos de ellas. La Cl_{50} provocada por el Glifosato® fue $< 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ sobre las tres semillas (Cuadro 7).

Por otra parte, con excepción del extracto C1c med, sólo los extractos de medio de cultivo presentaron valores de $\text{Cl}_{50} < 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ sobre el consumo de oxígeno de las plántula de *L. sativa*, siendo los extractos C1e med, $\text{Cl}_{50} = 81.7 \mu\text{g}/\text{mL} > \text{C1e2a med}, \text{Cl}_{50} = 98.6 \mu\text{g}/\text{mL} > \text{C1e2b med}, \text{Cl}_{50} = 100.8 \mu\text{g}/\text{mL}$, los que provocaron la mayor inhibición. Para las semillas de *S. lycopersicum*, los extractos que mostraron valores de $\text{Cl}_{50} < 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ fueron C1c mic, $\text{Cl}_{50} = 96.8 \mu\text{g}/\text{mL} > \text{C1c2b mic}, \text{Cl}_{50} = 139.1 \mu\text{g}/\text{mL} > \text{C1c med}, \text{Cl}_{50} = 147.3 \mu\text{g}/\text{mL} > \text{C1e med}, \text{Cl}_{50} = 152.3 \mu\text{g}/\text{mL}$. Los extractos que generaron $\text{Cl}_{50} < 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ sobre el consumo de O_2 de las plántulas de *A. hypochondriacus* fueron C1e2b med, $\text{Cl}_{50} = 132.5 \mu\text{g}/\text{mL} > \text{C1e med}, \text{Cl}_{50} = 147.9 \mu\text{g}/\text{mL} > \text{C1c med}, \text{Cl}_{50} = 161.5 \mu\text{g}/\text{mL}$. El Glifosato® tuvo valores de $\text{Cl}_{50} < 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ sobre las tres semillas evaluadas. En resumen, los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* afectaron en mayor agrado crecimiento de la raíz, en segundo lugar la respiración de las plántulas, y por último, la germinación fue el proceso menos afectado. El extracto derivado del medio de cultivo de la variante C1c es el que muestra el mayor potencial fitotóxico (Cuadro 7).

Finalmente, a manera de ejemplo en la Figura 10 A y B, se muestra el efecto del extracto orgánico del medio de cultivo y micelio de la variante morfológica C1c a 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sobre el consumo de O_2 de las plántulas de *S. lycopersicum*. Como se observa, en todos los casos el efecto es dependiente de la concentración, es decir, el consumo de oxígeno disminuye conforme aumenta la concentración del tratamiento.

Cuadro 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *L. sativa*, expresado en valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

Extracto orgánico	Semilla	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
		Germinación	Crecimiento de la raíz	Respiración
C1c mic	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	128.7	53.0	96.8
	<i>L. sativa</i>	>200	>200	>200
C1c med	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	82.5	161.5
	<i>S. lycopersicum</i>	194.5	109.9	147.3
	<i>L. sativa</i>	110.2	122.6	>200
C1e mic	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	>200	>200
	<i>L. sativa</i>	>200	>200	>200
C1e med	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	112.2	147.9
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	173.5	152.3
	<i>L. sativa</i>	96.2	106.9	81.7
C1e2a mic	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	>200	>200
	<i>L. sativa</i>	>200	>200	>200
C1e2a med	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	>200	>200
	<i>L. sativa</i>	97.9	107.2	98.6
C1e2b mic	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	>200	139.1
	<i>L. sativa</i>	>200	>200	>200
C1e2b med	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	127.7	132.5
	<i>S. lycopersicum</i>	144.1	131.8	>200
	<i>L. sativa</i>	100.0	>200	100.8
Glifosato®	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	115.5	114.1
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	105.7	83.5
	<i>L. sativa</i>	>200	132.2	126.5

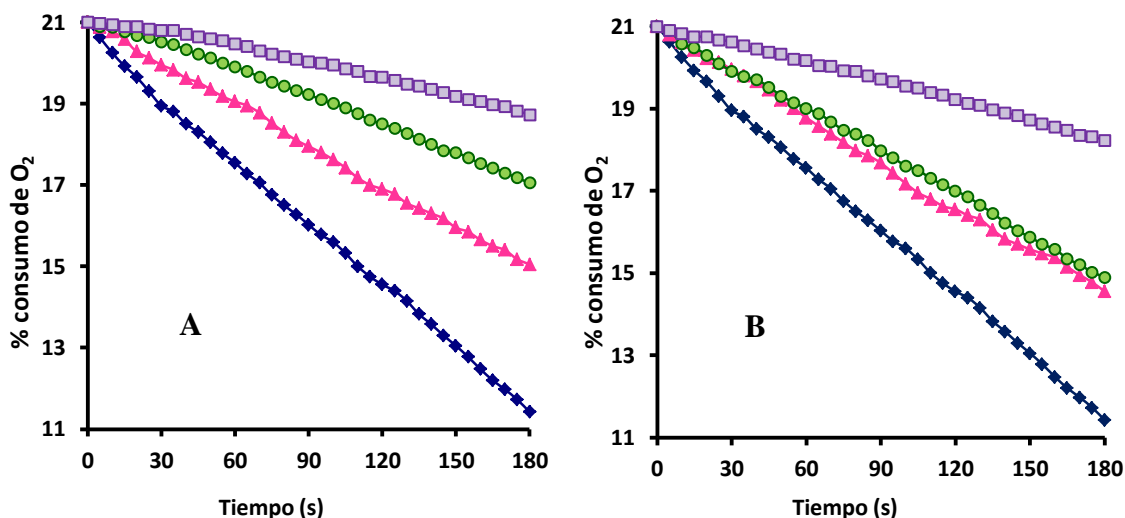


Figura 10. Efecto del extracto orgánico del medio de cultivo (A) y micelio (B) de la variante C1c, sobre el consumo de O₂ de las plántulas de *S. lycopersicum*. Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones (◆) control negativo, (▲) 50 µg/mL, (●) 100 µg/mL y (■) 200 µg/mL.

A continuación, se procedió a evaluar el efecto fitotóxico de los metabolitos secundarios mayoritarios producidos por las variantes morfológicas del hongo endófito *E. gomezpompae*.

3. Evaluación del potencial fitotóxico de las preusomerinas y palmarumicinas producidas por *E. gomezpompae* sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de tres plantas de prueba

Las cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae* producen preusomerinas (Pr) y palmarumicinas (Pa) bioactivas en diferentes proporciones (Sección 4 de Resultados y Discusión). Cabe mencionar que los compuestos utilizados en el presente trabajo fueron aislados, purificados y caracterizados previamente en nuestro grupo de trabajo (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008, 2014; González-Meléndez, 2009).

En primera instancia se evaluó el efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *Echinochloa crus-galli* a 100 µg/mL. En esta ocasión se utilizaron semillas de *E. crus-galli* en lugar de las de *L. sativa*, debido a que es un pasto muy resistente.

En la Figura 11 se muestra el efecto inhibitorio de los compuestos puros sobre la germinación de las plantas evaluadas a 100 µg/mL. Las tres plantas de prueba fueron inhibidas significativamente en presencia de todos los compuestos evaluados. En general, las preusomerinas presentaron mayor inhibición que las palmarumicinas. Las semillas de *A. hypochondriacus* fueron inhibidas principalmente por las Pr EG₄ y Pr EG₃, en un 78.4% y 74.9% respectivamente, y por la Pa EG₁, en un 74.8%. Las Pr EG₂, Pr EG₁ y Pr EG₄ fueron las que causaron la mayor inhibición sobre la germinación de *S. lycopersicum*, con un 82.5%, 65% y 65% de inhibición respectivamente.

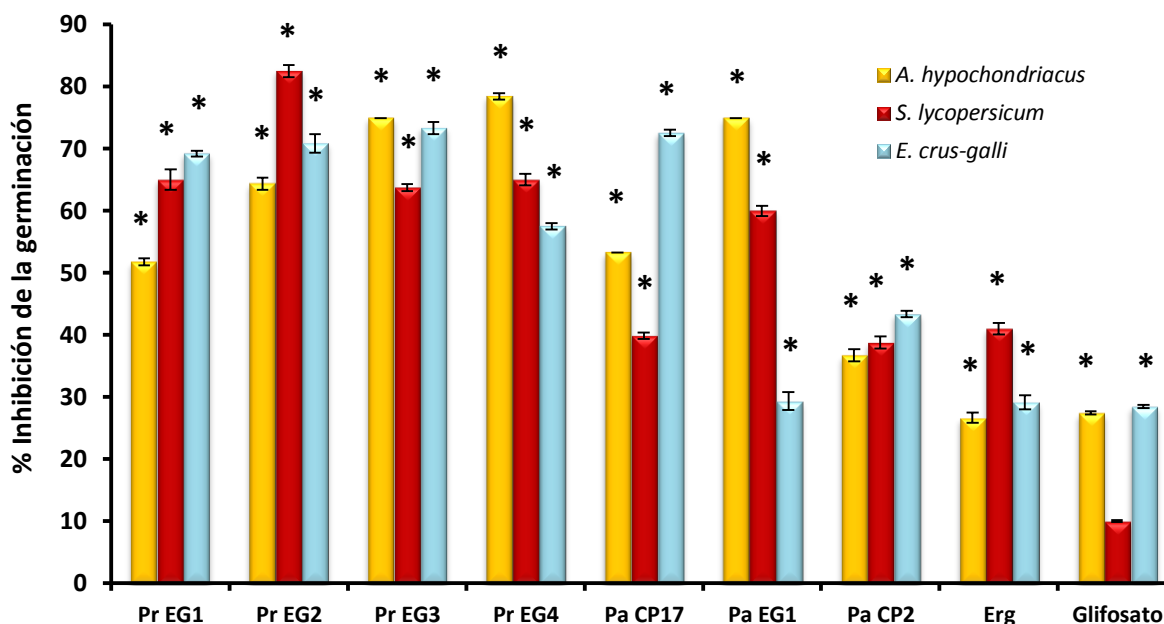


Figura 11. Efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *L. sativa* a 100 µg/mL. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

Las semillas de *E. crus-galli* fueron mayormente afectadas por las Pr EG₄ y Pr EG₃, en un 73.3% y 70.8%, respectivamente, y por la Pa CP₁₇ en un 72.5%. De manera adicional, se evaluó el efecto fitotóxico del ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (Erg), un esteroide biosintetizado por *E. gomezpompae*, observando que fue metabolito secundario que menor inhibición provocó sobre la germinación de las semillas de prueba. El Glifosato® generó los menores porcentajes de inhibición en cada una de las semillas.

En la Figura 12 se muestran los porcentajes de inhibición de los compuestos puros sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En general, las semillas más inhibidas fueron las de *A. hypochondriacus* y las de *E. crus-galli*. La Pa EG₁ y las Pr EG₃, y Pr EG₂ presentaron la mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus*, inhibiendo en un 78.4%, 74.3% y 59.0%, respectivamente. La Pr EG₃, la Pa EG₁ y la Pr EG₂ fueron los compuestos puros que provocaron más inhibición sobre la raíz de *E. crus-galli*, inhibiendo su crecimiento en un 68.2%, 66.4% y 63.8%, respectivamente. Las Pr EG₂, Pr EG₃ y Pr EG₄, fueron las que mayor inhibición mostraron sobre *S. lycopersicum*, inhibiendo su raíz en un 68.6%, 33.5% y 28.7%, respectivamente.

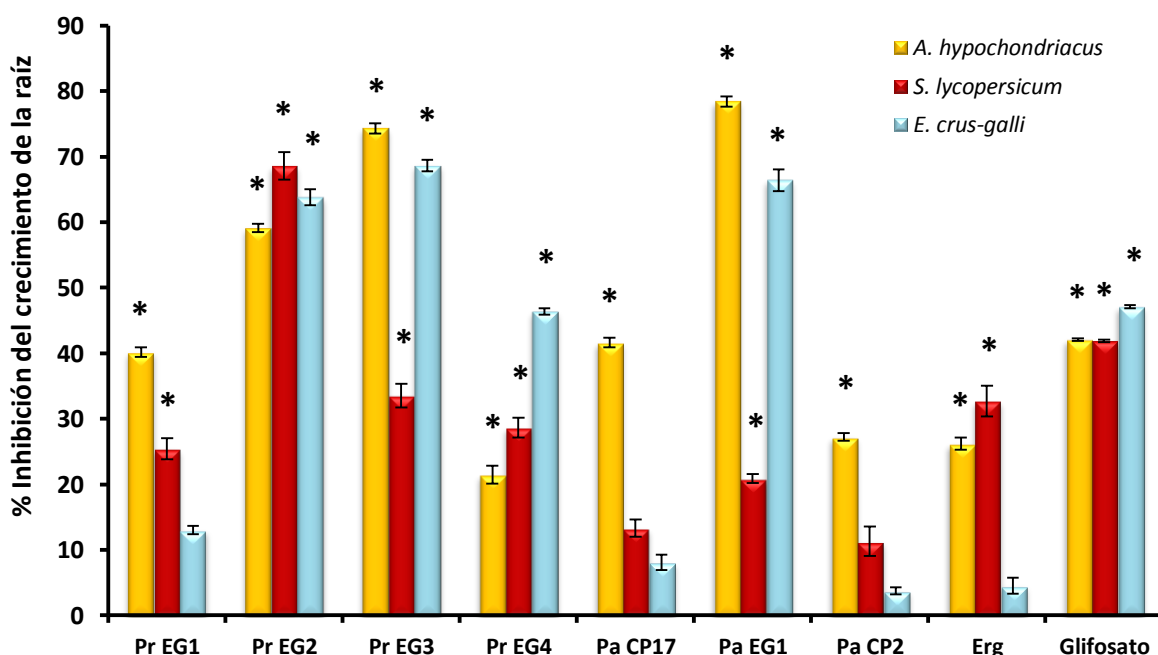


Figura 12. Efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *L. sativa* a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

Las Pr EG₂, Pr EG₃ y la Pa EG₁ inhibieron el crecimiento de la raíz en un 60% o más de al menos dos de las plantas prueba, siendo mayor su efecto inhibitorio, al demostrado por el control positivo el Glifosato®, a la misma concentración de prueba. Las Pa CP₁₇ y Pa CP₂ inhibieron significativa y selectivamente el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus*. El Erg fue uno de los metabolitos secundarios que demostró menor efecto inhibitorio sobre las plantas de prueba, excepto sobre *S. lycopersicum*.

En la Figura 13 se muestran los porcentajes de inhibición de los compuestos puros sobre la respiración durante el proceso de germinación de las plantas modelo a 100 µg/mL. Las semillas de *S. lycopersicum* fueron las más afectadas. En general, los compuestos puros inhibieron más del 50% el consumo de O₂ de las plántulas, con porcentajes de inhibición comparables al Glifosato®. La Pa CP₂, la Pr EG₃ y la Pa CP₁₇ fueron los compuestos más fitotóxicos inhibiendo la respiración en un 59.1%, 55.4% y 54.9%, respectivamente. Por otra parte, las Pr EG₁, Pr EG₄ y la Pa EG₁ fueron los bisnaftoespirocetales que mostraron mayor efecto sobre las semillas de *E. crus-galli*, inhibiendo consumo de O₂ en un 62.9%, 50.6% y 26.7%, respectivamente. Por el contrario, el proceso de respiración de las semillas de *A. hypochondriacus* fue el menos afectado, siendo la Pa EG₁ la única que inhibió significativamente, en un 34.9%. El Glifosato® fue el compuesto que inhibió significativamente las tres semillas prueba.

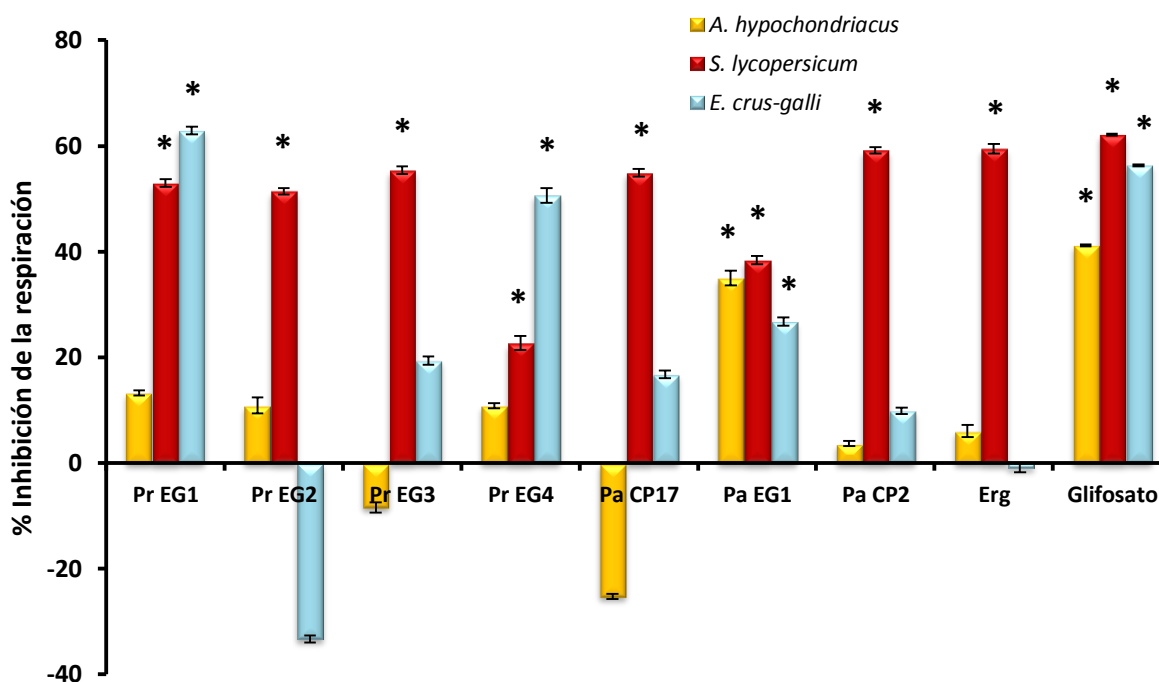


Figura 13. Efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *L. sativa* a 100 µg/mL. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P<0.05). Las barras representan la desviación estándar del promedio de cuatro repeticiones.

A continuación se estableció el efecto fitotóxico de los metabolitos secundarios producidos por las cuatro variantes de *E. gomezpompae*, con el fin de calcular las CI₅₀.

Cuadro 8. Efecto fitotóxico de los compuestos puros aislados de *E. gomezpompae* sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus* a 50, 100 y 200 µg/mL.

Compuesto	Concentración µg/mL	% de inhibición		
		Germinación	Crecimiento de la Raíz	Respiración
Pr EG ₁	50	19.1±1.6*	20.1±1.8*	5.3±1.8
	100	51.8±1.1*	40.2±1.2*	13.3±1.1
	200	87.4±1.2*	92.4±1.5*	30.5±1.7*
Pr EG ₂	50	29.7±1.2*	23.0±1.1*	3.6±1.3
	100	64.3±1.0*	59.1±1.1*	10.8±1.5
	200	85.8±1.4*	97.2±2.3*	30.4±1.6*
Pr EG ₃	50	33.6±1.3*	36.0±1.4*	-15.4±1.7*
	100	74.9±2.0*	74.3±1.6*	-8.4±1.3
	200	100±0.0*	100±0.0*	24.3±1.0*
Pr EG ₄	50	34.3±1.9*	10.3±1.2	3.4±1.0
	100	78.4±1.1*	21.5±1.7*	10.8±1.0
	200	100±0.0*	100±0.0*	48.6±1.8*
Pa CP ₁₇	50	29.0±1.5*	19.3±1.5*	-34.2±1.4*
	100	53.3±1.5*	41.6±1.2*	-25.3±1.7*
	200	76.9±1.6*	75.4±1.6*	14.8±1.2*
Pa EG ₁	50	33.7±1.1*	37.9±1.3*	12.7±1.5
	100	74.8±2.1*	78.4±1.1*	34.9±1.4*
	200	100±0.0*	100±0.0*	66.5±1.4*
Pa CP ₂	50	24.0±1.8*	13.2±1.8	0.0±1.1
	100	36.7±1.2*	27.2±1.9*	3.6±1.1
	200	68.9±1.3*	55.0±1.7*	12.9±1.2
Erg	50	10.1±1.3	11.9±1.9	0.0±1.4
	100	26.6±1.5*	26.2±1.4*	6.0±1.8
	200	53.8±1.5*	54.2±1.5*	21.3±1.6*
Glifosato®	50	12.3±1.0	15.6±1.3*	22.1±1.5*
	100	27.4±1.5*	42.1±1.5*	41.3±1.1*
	200	39.0±1.0*	76.0±1.7*	74.2±2.0*

Cuadro 9. Efecto fitotóxico de los compuestos puros aislados de *E. gomezpompae* sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *S. lycopersicum* a 50, 100 y 200 µg/mL.

Compuesto	Concentración	% de inhibición		
	µg/mL	Germinación	Crecimiento de la Raíz	Respiración
Pr EG ₁	50	33.1±1.5*	9.1±1.1	22.0±1.7*
	100	65.0±1.5*	25.4±1.1*	52.9±1.7*
	200	76.8±1.1*	53.1±1.2*	78.4±2.1*
Pr EG ₂	50	33.5±1.2*	26.5±1.2*	20.1±1.8*
	100	82.5±1.5*	68.6±1.0*	51.4±1.9*
	200	100±0.0*	100±0.0*	86.2±1.2*
Pr EG ₃	50	29.9±1.5*	19.5±1.8*	20.3±1.9*
	100	63.8±1.1*	33.5±1.4*	55.4±1.5*
	200	89.6±2.5*	68.0±1.6*	87.2±1.4*
Pr EG ₄	50	32.2±1.4*	16.0±1.6*	9.7±1.8
	100	65.0±1.9*	28.7±1.5*	22.7±1.6*
	200	79.9±1.4*	57.9±1.4*	35.8±1.7*
Pa CP ₁₇	50	8.9±1.1	0.0±2.3	32.9±1.6*
	100	39.8±1.2*	13.3±1.8	54.9±1.8*
	200	71.8±1.4*	47.6±1.8*	90.0±2.3*
Pa EG ₁	50	32.0±1.3*	7.3±1.1	19.1±1.2*
	100	60.0±1.6*	20.9±1.5*	38.4±1.6*
	200	78.2±2.0*	45.6±1.5*	69.3±1.5*
Pa CP ₂	50	12.7±1.3	0.0±1.7	32.6±1.5*
	100	38.8±1.3*	11.3±1.5	59.2±1.3*
	200	91.2±1.5*	46.4±1.8*	78.8±2.0*
Erg	50	19.6±1.6*	21.4±1.5*	29.6±1.7*
	100	41.0±1.3*	32.7±1.6*	59.5±1.7*
	200	52.5±2.2*	69.8±1.9*	85.8±2.5*
Glifosato®	50	0.0±1.5	19.3±1.6*	18.9±1.9*
	100	10.0±1.6	41.9±1.4*	62.1±1.2*
	200	28.8±1.4*	86.0±2.1*	94.1±1.9*

Cuadro 10. Efecto fitotóxico de los compuestos puros aislados de *E. gomezpompae* sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *E. crus-galli* a 50, 100 y 200 µg/mL.

Compuesto	Concentración	% de inhibición		
	µg/mL	Germinación	Crecimiento de la Raíz	Respiración
Pr EG ₁	50	27.9±1.9*	3.4±1.2	29.6±1.2*
	100	69.1±1.4*	13.1±1.6	62.9±1.9*
	200	96.0±1.4*	39.3±1.1*	93.5±1.4*
Pr EG ₂	50	33.1±1.8*	23.4±1.1*	-45.6±1.4*
	100	70.8±1.6*	63.8±1.5*	-33.6±1.2*
	200	100±0.0*	100±0.0*	8.7±1.1
Pr EG ₃	50	28.3±1.9*	24.9±1.9*	12.1±1.1*
	100	73.3±1.3*	68.2±1.8*	19.4±1.8*
	200	100±0.0*	100±0.0*	43.3±1.8*
Pr EG ₄	50	30.1±1.1*	22.6±1.1*	24.3±1.6*
	100	57.5±1.7*	46.4±1.3*	50.6±1.9*
	200	81.5±1.9*	87.2±1.3*	85.8±1.5*
Pa CP ₁₇	50	30.0±1.6*	0.0±1.8	6.8±1.8
	100	72.5±2.4*	8.1±1.8	16.7±1.1*
	200	95.1±1.7*	78.3±1.1*	39.7±1.7*
Pa EG ₁	50	15.7±1.8*	33.9±1.9*	14.7±1.1*
	100	29.3±1.3*	66.4±1.4*	26.7±1.2*
	200	56.2±1.2*	84.3±1.2*	55.6±1.4*
Pa CP ₂	50	19.5±1.5*	0.0±1.2	4.3±1.4
	100	43.3±1.9*	3.8±1.5	9.8±1.2
	200	68.3±1.9*	44.3±1.0*	27.3±1.8*
Erg	50	6.4±1.7	0.0±2.4	0.0±1.6
	100	29.2±1.8*	4.6±1.0	0.0±1.8
	200	100±0.0*	100±0.0*	16.7±1.1*
Glifosato®	50	9.6±1.9	24.5±1.2*	26.4±1.3*
	100	28.5±1.4*	47.2±1.8*	56.3±1.8*
	200	45.2±2.1*	88.2±1.8*	87.6±1.4*

Cuadro 11. Efecto fitotóxico de las preusomerinas y las palmarumicinas producidas por *E. gomezpompae* sobre la germinación, crecimiento de la raíz y la respiración de las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum* y *E. crus-galli*, expresado en valores de CI_{50} (μM).

Compuesto	Semilla	CI_{50} (μM)		
		Germinación	Crecimiento de la Raíz	Respiración
Pr EG ₁	<i>A. hypochondriacus</i>	271.8	300.0	>574.7
	<i>S. lycopersicum</i>	216.1	534.8	277.3
	<i>E. crus-galli</i>	207.8	>574.7	216.9
Pr EG ₂	<i>A. hypochondriacus</i>	208.2	225.7	>546.5
	<i>S. lycopersicum</i>	168.6	199.7	259.0
	<i>E. crus-galli</i>	183.3	214.2	>546.5
Pr EG ₃	<i>A. hypochondriacus</i>	170.5	166.6	>526.3
	<i>S. lycopersicum</i>	198.4	355.8	240.5
	<i>E. crus-galli</i>	182.1	195.8	>526.3
Pr EG ₄	<i>A. hypochondriacus</i>	179.4	330.6	>571.4
	<i>S. lycopersicum</i>	214.6	478.0	>571.4
	<i>E. crus-galli</i>	237.1	279.1	264.9
Pa CP ₁₇	<i>A. hypochondriacus</i>	272.1	342.5	594.6
	<i>S. lycopersicum</i>	378.4	>598.8	238.0
	<i>E. crus-galli</i>	206.6	471.3	>598.8
Pa EG ₁	<i>A. hypochondriacus</i>	194.0	180.8	416.5
	<i>S. lycopersicum</i>	240.4	>598.8	378.7
	<i>E. crus-galli</i>	516.2	213.5	531.7
Pa CP ₂	<i>A. hypochondriacus</i>	397.2	562.0	>628.9
	<i>S. lycopersicum</i>	347.2	>628.9	272.0
	<i>E. crus-galli</i>	380.5	>628.9	>628.9
Erg	<i>A. hypochondriacus</i>	466	465.1	>510.2
	<i>S. lycopersicum</i>	429.6	337.2	204.3
	<i>E. crus-galli</i>	285.7	276.0	>510.2
Glifosato®	<i>A. hypochondriacus</i>	>1183.4	683.4	675.1
	<i>S. lycopersicum</i>	>1183.4	625.4	494.1
	<i>E. crus-galli</i>	>1183.4	561.5	502.4

Con respecto a la germinación, la Pr EG₃ fue el único compuesto puro que mostró un valor de CI₅₀ < 200 µM sobre las tres plantas de prueba, con una CI₅₀ de 170.5 µM sobre la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus*, de 198.4 µM sobre *S. lycopersicum* y de 182.1 µM sobre las semillas de *E. crus-galli*. La Pr EG₂, con excepción del efecto sobre las semillas de *A. hypochondriacus* (208.2 µM), también mostró valores de CI₅₀ < 200 µM con un valor de CI₅₀ de 168.6 µM sobre las semillas de *S. lycopersicum* y de 183.3 µM para las de *E. crus-galli*. La Pr EG₄ muestra una CI₅₀ de 179.4 µM sobre la germinación de *A. hypochondriacus*.

Por otra parte, la Pr EG₃ también fue el compuesto que presentó los menores valores de CI₅₀ sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* con valores de CI₅₀ de 166.6 y 195.8 µM, respectivamente. La Pr EG₂ mostró valores de CI₅₀ de 199.7 µM sobre *S. lycopersicum*. Por último, todos los valores de CI₅₀ obtenidos sobre la respiración durante el proceso de germinación de las tres semillas, fueron mayores a 200 µM (Cuadros 9, 10 y 11).

En general, las preusomerinas evaluadas fueron los compuestos que demostraron mayor potencial fitotóxico sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración, de las tres plantas prueba, con valores de CI₅₀ menores a la máxima concentración de prueba que fue de 200 µg/mL (aproximadamente 550 µM). Cabe destacar que el control positivo (Glifosato) en ningún caso provocó inhibiciones menores a 200 µM (Cuadros 9, 10 y 11).

Con base en el efecto inhibitorio de los extractos orgánicos y los compuestos puros de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las plantas modelo, se procedió a elucidar el mecanismo de acción, evaluando su efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial y la fotosíntesis.

4. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos y compuestos puros de *E. gomezpompae* sobre respiración mitocondrial

Con el objetivo de evaluar el efecto de los extractos orgánicos y compuestos puros sobre la respiración mitocondrial, se emplearon mitocondrias aisladas de hojas de *Spinacea oleracea*. Todos los tratamientos se evaluaron a 100 y 200 µg/mL, cuantificando el decremento en el consumo de O₂. En todos los casos se obtuvieron efectos inhibitorios dependientes de la concentración sobre el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial. No obstante, únicamente a la máxima concentración de prueba (200 µg/mL) los efectos inhibitorios fueron significativos. Sin embargo, los porcentajes de inhibición fueron menores al 50%, no permitiendo establecer el valor de CI₅₀.

En las Figuras 14 y 15 se muestran los % de inhibición provocados por los extractos orgánicos y compuestos puros de *E. gomezpompae*. Todos los extractos derivados del micelio mostraron mayor inhibición sobre la respiración mitocondrial que los de medio de cultivo. Los extractos de medio de cultivo y micelio de la variante morfológica C1e2a mostraron la mayor actividad biológica, inhibiendo significativamente en un 37.9% y 39.2%, respectivamente (Figura 14). En general, las preusomerinas mostraron los mayores porcentajes de inhibición sobre la respiración mitocondrial, con porcentajes de inhibición de 37.2 (Pr EG₄) > 25.6 (Pr EG₁) > 24.3 (Pr EG₃) y > 20.1 (Pr EG₂). La Pa CP₂ fue la que mostró la mayor actividad inhibiendo la respiración en un 26.2 % (Figura 15).

Con la finalidad de asegurarse que efectivamente se hubieran extraído mitocondrias y que éstas estuvieran viables en el bioensayo, se utilizó el 2,4-dinitrofenol, un inhibidor de la cadena transportadora de electrones, como control positivo. En la Figura 16 se muestra la curva de concentración vs respuesta del 2,4-dinitrofenol, obteniéndose un valor de CI₅₀ de 188.6 µM.

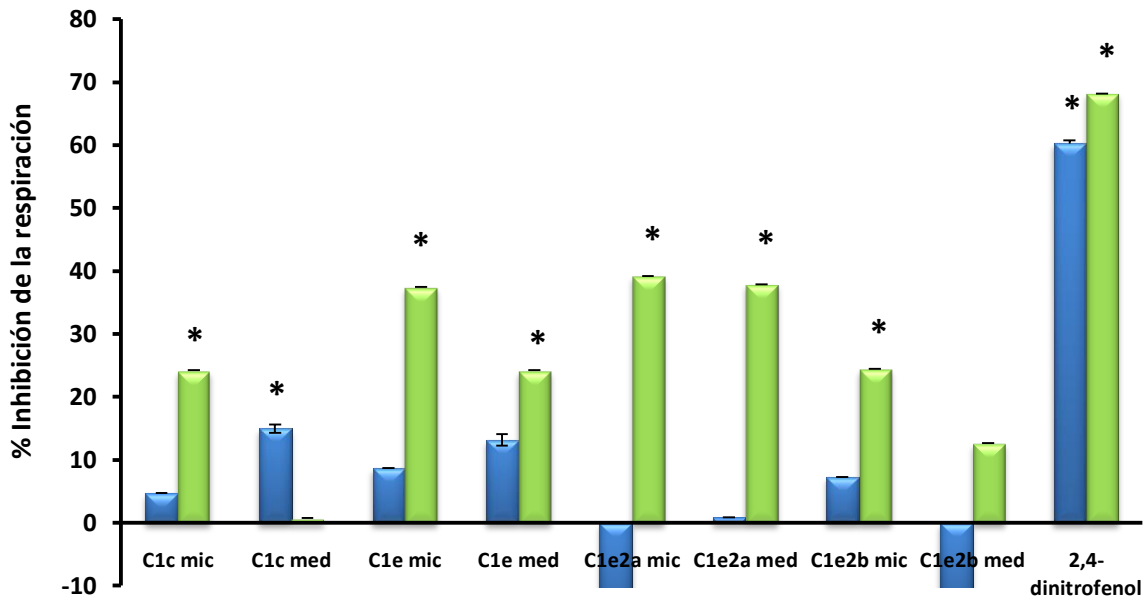


Figura 14. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de micelio y medio de cultivo de las variantes morfológicas de *E. goezepompaе* a 100 (azul) y 200 µg/mL (verde) sobre la respiración en mitocondrias aisladas de *S. oleracea*. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres repeticiones.

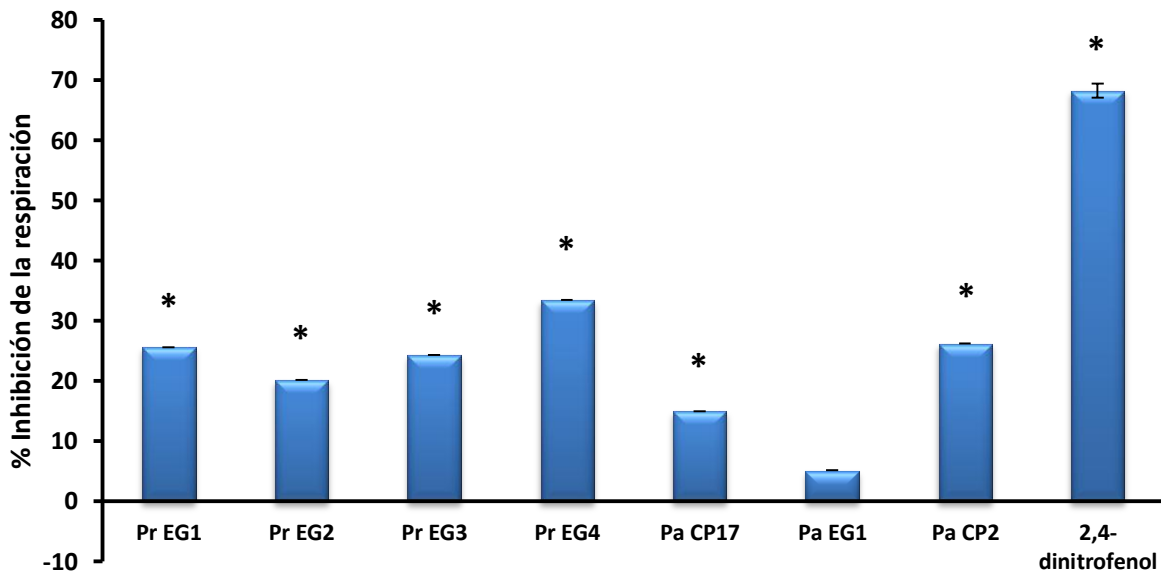


Figura 15. Efecto fitotóxico de los compuestos puros sobre la respiración en mitocondrias aisladas de *S. oleracea* a 200 µg/mL. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$).

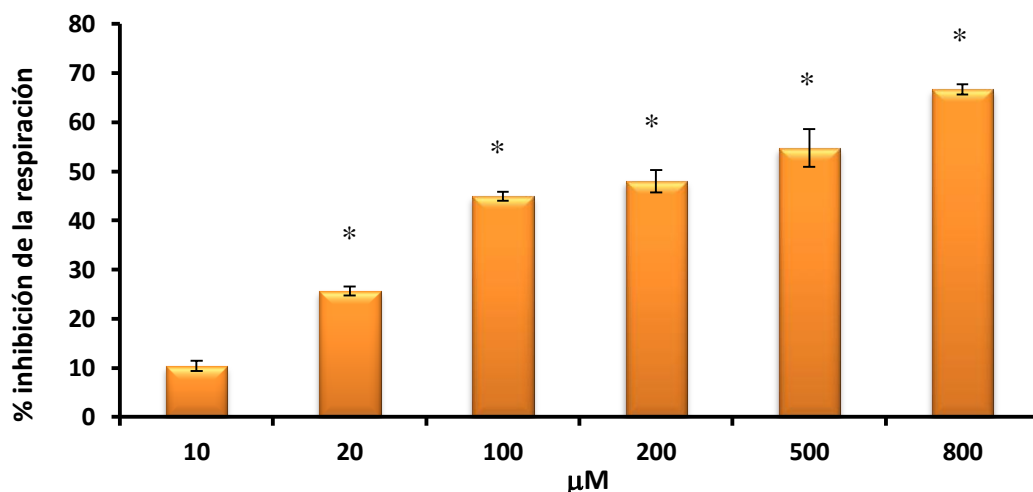


Figura 16. Efecto fitotóxico del 2,4-dinitrofenol (control positivo) sobre la respiración en mitocondrias aisladas de *S. oleracea*. * Valores estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$). Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres repeticiones.

De acuerdo con los resultados obtenidos del efecto de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas y de los compuestos puros producidos por *E. gomezpompae*, sobre la respiración mitocondrial empleando mitocondrias aisladas de *S. oleracea*, podemos inferir que no es su principal mecanismo de acción fitotóxico. En consecuencia, a continuación se procedió a explorar otro mecanismo de acción evaluando su efecto en la fotosíntesis.

5. Efecto de los extractos orgánicos y de los compuestos puros de *E. gomezpompae* sobre fotosíntesis

Con la finalidad de explorar de forma más detallada el potencial herbicida de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y los principales metabolitos secundarios, se evaluó su efecto sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de *S. oleracea*. Las actividades fotosintéticas estudiadas se seleccionaron tomando como referencia el blanco de acción de los herbicidas comerciales; como se mencionó anteriormente, el 50% de éstos son inhibidores de la fotosíntesis, y pueden actuar en varios niveles o con diferentes mecanismos de acción.

En primer lugar, se probó su efecto en la síntesis de ATP, lo que indicaría si influyen en la fotosíntesis; en segundo lugar, se evaluó su efecto en el transporte de electrones en los fotosistemas II y I (PS II y I), y finalmente, se estudió su efecto en las reacciones parciales de los PS.

5.1 Síntesis de ATP

El efecto de los extractos orgánicos y compuestos puros sobre la fotofosforilación o síntesis de ATP se determinó en cloroplastos aislados de hojas de *S. oleracea*. La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.00 y 8.05. Este procedimiento se fundamenta en los cambios de pH generados durante la regeneración de ATP, en donde se consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada a partir de ADP y P_i . Es importante mencionar que los compuestos que inhiben la síntesis de ATP pueden hacerlo por los siguientes mecanismos: desacoplamiento, inhibiendo la trasducción de energía, o inhibiendo la reacción de Hill.

Los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* (C1c, C1e, C1e2a y C1e2b) se evaluaron utilizando cinco concentraciones de prueba, en un intervalo de 6.25 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De acuerdo con los resultados expuestos en la Figura 17, todos los extractos orgánicos inhiben la fotofosforilación o síntesis de ATP de H_2O a metilviológeno (MV) de manera dependiente de la concentración. En general, los extractos de medio de cultivo inhibieron en mayor grado la síntesis de ATP que los extractos de micelio. Las CI_{50} en todos los casos oscilaron entre 15.9 y 106.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los extractos de medio de cultivo de las variantes morfológicas C1e ($CI_{50}= 55.7 \mu\text{g}/\text{mL}$), C1e2a ($CI_{50}= 15.9 \mu\text{g}/\text{mL}$) y C1e2b ($CI_{50}= 42.7 \mu\text{g}/\text{mL}$), inhibieron en un 100% la síntesis de ATP a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El extracto C1e2a med fue el que presentó la mayor actividad inhibitoria, con una CI_{50} de 15.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el Cuadro 12 se resumen las CI_{50} sobre la síntesis de ATP.

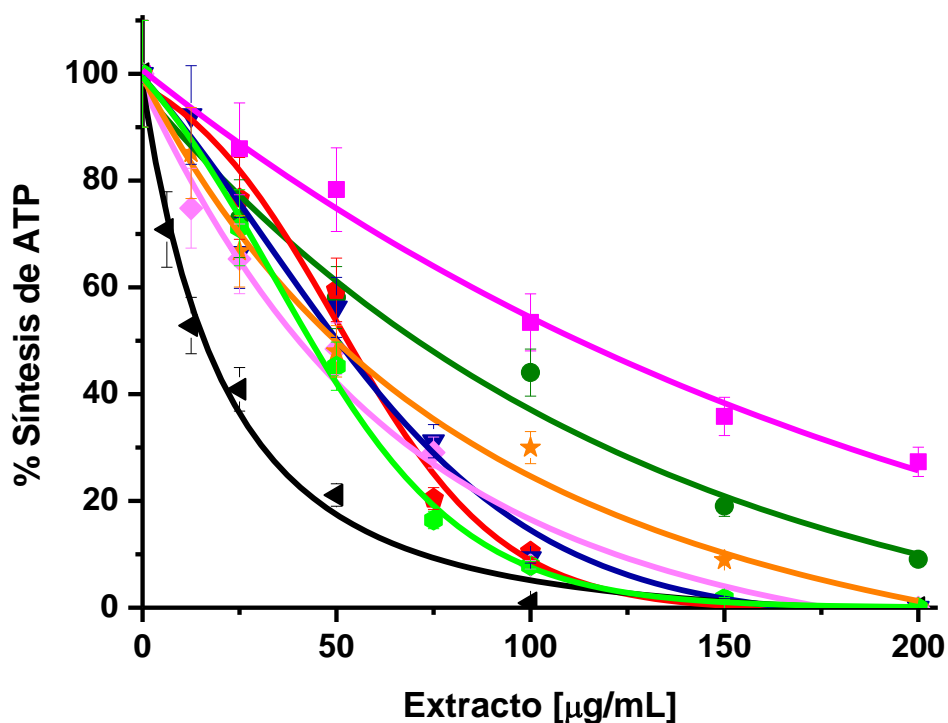


Figura 17. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae*: (■) C1c mic, (●) C1c med, (●) C1e mic, (▼) C1e med, (◆) C1e2a mic, (◄) C1e2a med, (★) C1e2b mic y (●) C1e2b med sobre la síntesis de ATP. El valor del control que representa el 100% de actividad fue de 1284.1 $\mu\text{M ATP/ mg Chl} \times \text{h}$. Cada punto representa la media de tres determinaciones, realizadas con diferentes aislamientos de cloroplastos. Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres repeticiones.

Con la finalidad de establecer cuáles de los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *E. gomezpompae* son los principales responsables del efecto sobre la síntesis de ATP, se seleccionaron a las Pr EG₁ y Pr EG₄, y a las Pa CP₂ y Pa CP₁₇, que demostraron los mayores porcentajes de inhibición en el consumo de O₂ mitocondrial, además de ser con los bisnaftoespirocetales puros que se contaba con la cantidad suficiente para realizar la determinación. Los compuestos puros se evaluaron empleando cinco concentraciones diferentes, en un intervalo de 12.5 a 200 μM . Los cuatro metabolitos secundarios evaluados presentaron una actividad inhibitoria dependiente de la concentración en la síntesis de ATP (Figura 18). Las Pa CP₁₇ (CI₅₀= 24.3 μM) y Pa CP₂

(Cl_{50} = 25.1 μ M) presentaron mayor actividad inhibitoria que las Pr EG₁ (Cl_{50} = 178.1 μ M) y Pr EG₄ (Cl_{50} > 200 μ M) (Cuadro 12).

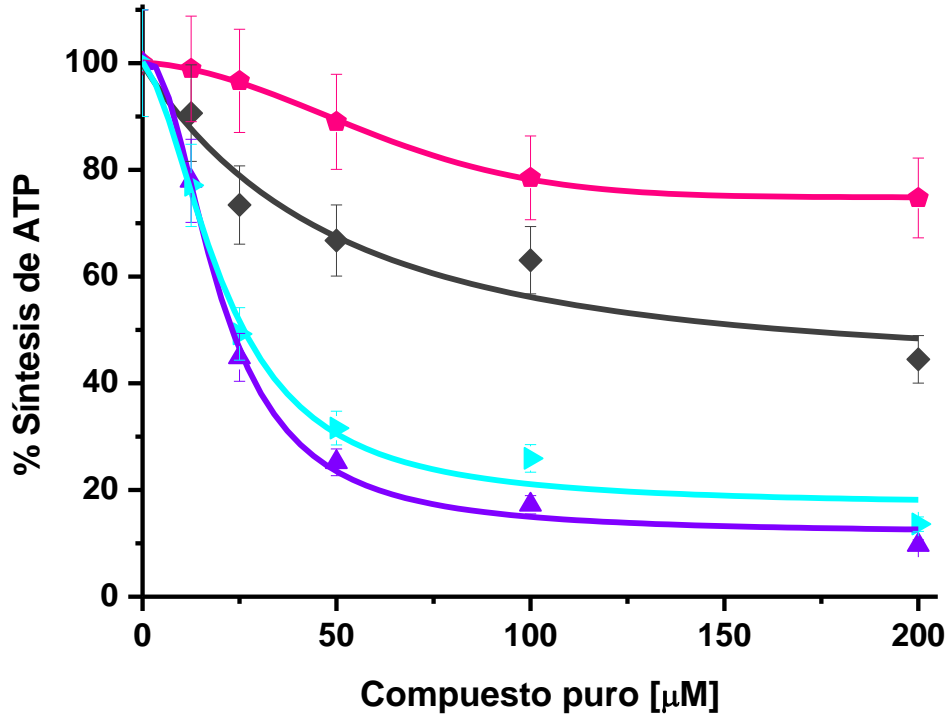


Figura 18. Efecto inhibitorio de los compuestos puros evaluados, la (◆) Pr EG₁, (●) Pr EG₄, (▲) Pa CP₂, (▶) Pa CP₁₇, sobre la síntesis de ATP. El valor del control que representa el 100% de actividad fue de 1188.6 μ M ATP/ mg Chl \times h. Cada punto representa la media de tres determinaciones, realizadas con diferentes aislamientos de cloroplastos. Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres repeticiones.

Una vez que se estableció que los extractos orgánicos y los compuestos puros inhiben la síntesis de ATP, se procedió a determinar el sitio de acción de los mismos, evaluando su efecto en las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis.

5.2 Transporte de electrones

El efecto de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y de sus principales preusomerinas y palmarumicinas se determinó sobre el transporte de electrones (Te^-) en la fase luminosa de la fotosíntesis, para lo cual se cuantificó el flujo de

electrones dependiente de la luz bajo en tres condiciones experimentales: basal, fosforilante y desacoplado. En el caso del Te^- en medio basal, la velocidad de transporte de electrones fue baja debido a la ausencia de ADP, P_i y un agente desacoplante. En el Te^- en medio fosforilante, se adicionaron ADP y P_i al medio basal, los cuales permitieron la actividad de la enzima H^+ -ATP sintasa; en este caso, la velocidad de transporte de electrones es de una a tres veces mayor respecto al transporte Te^- basal, ya que el gradiente de H^+ es utilizado para la fotofosforilación. El último Te^- evaluado fue el desacoplado, para lo cual se adicionó al medio basal NH_4Cl como agente desacoplante; este compuesto disipa el gradiente de H^+ , generando una velocidad máxima de flujo de electrones, por lo tanto, se espera que los compuesto que inhibe esta actividad actúen como inhibidores de la reacción de Hill (King-Díaz, B. *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007).

En la Figura 19 se muestra el efecto de los extractos orgánicos sobre el Te^- basal. Con excepción del extracto C1e2b med, que estimuló el Te^- , todos los extractos evaluados mostraron una inhibición dependiente de la concentración, y en general, presentan valores de CI_{50} menores a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los extractos derivados del micelio provocan una inhibición mayor respecto a su extracto de medio de cultivo. Los extractos de las variantes C1e2a mic y C1e2b mic fueron los más activos, con valores de CI_{50} de 46.1 y 52.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Cuadro 12).

Con respecto al Te^- fosforilante, todos los extractos presentaron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración (Figura 19). Sin embargo, sólo los extractos de micelio muestran valores de CI_{50} inferiores a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (excepto C1c med; $\text{CI}_{50} = 152.6 \mu\text{g}/\text{mL}$). De nueva cuenta, los extractos de las variantes C1e2a mic y C1e2b mic fueron los más activos, con una CI_{50} de 22.0 y 26.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Cuadro 12).

En el Te^- desacoplado, todos los extractos evaluados presentaron % de inhibición significativos y dependiente de la concentración (Figura 19). También se observó que, como en los demás Te^- , los extractos de micelio de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* fueron más activos respecto a los de medio de cultivo. Los extractos más

activos fueron las variantes C1e mic, C1e2a mic y C1c mic, con valores de CI_{50} de 14.4, 16.8 y 17.9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Cuadro 12).

En general, todos los extractos presentaron actividad inhibitoria dependiente de la concentración en los tres Te^- (basal, fosforilante y desacoplado), indicando que se comportaron como inhibidores potentes de la reacción de Hill (King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007). El Te^- desacoplado fue el más afectado por todos los extractos, con valores de CI_{50} que oscilaron entre 14.4 y 104.5 $\mu\text{g/mL}$. Cabe mencionar que el extracto del medio de cultivo de la variante C1e2b fue el único que presentó activación del Te^- basal, por lo que se podría considerar como un agente desacoplante débil e inhibidor de la reacción de Hill (King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007) (Figura 19).

Por otro lado, las preusomerinas y palmarumicinas seleccionadas también inhibieron el Te^- bajo las tres condiciones experimentales de manera dependiente de la concentración (Figura 20), con valores de $CI_{50} < 200 \mu\text{M}$, en todos los casos (Cuadro 12). Las Pa CP₁₇ y Pa CP₂ mostraron mayor inhibición sobre el Te^- basal que las Pr EG₁ y Pr EG₄, con valores de CI_{50} de 46.6 y 74.8 μM , respectivamente. Las Pr EG₁ y la Pa CP₂ provocaron los mayores porcentajes inhibición sobre el Te^- fosforilante, con valores de CI_{50} de 23.7 y 30.8 μM , respectivamente. Por último, el Te^- desacoplado fue más afectado por la presencia de las Pr EG₁ y Pr EG₄, con CI_{50} de 46.1 y 50.0 μM , respectivamente.

Los resultados obtenidos hasta este punto sugieren que los metabolitos secundarios analizados pueden tener más de un mecanismo de acción. Los compuestos que inhiben la síntesis de ATP y el Te^- desacoplado, se comportan como inhibidores de la reacción de Hill, debido a que bloquean la reducción del aceptor final de electrones (MV en este caso). Además, ambas preusomerinas presentaron la misma potencia como inhibidores de la reacción de Hill, demostrado en la inhibición del Te^- desacoplado (King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007).

Con la finalidad de localizar el sitio de inhibición de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y de los compuestos puros sobre la cadena transportadora de electrones, se determinó su efecto en diversas reacciones parciales de los PS II y I.

5.3 Reacciones parciales del Fotosistema I (PS I) y Fotosistema II (PS II)

El efecto de los extractos orgánicos y de los compuesto puros en el Te^- en los PS II y I, se evaluó empleando diferentes combinaciones de donadores y aceptores artificiales de electrones, así como inhibidores de la cadena transportadora (King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007). En primer lugar, se determinó la actividad en el PS I, empleando el sistema DCPIP/ascorbato, el cual actúa como donador artificial de electrones a nivel del complejo $\text{Cit}_{b6/f}$. En este caso se empleó MV como aceptor artificial de electrones, DCMU como inhibidor de la enzima Q_B para impedir el flujo de electrones del PS II, y NH_4Cl como agente desacoplante, para estudiar su efecto (Macías-Rubalcava *et al.*, 1999; King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007) (Figura 20). La actividad en el PS I no fue afectada por la presencia de ninguno de los tratamientos a la máxima concentración de prueba, que fue de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los extractos orgánicos y de 200 μM para los compuestos puros (Cuadro 12). A continuación, se prosiguió a evaluar el efecto de los extractos y compuesto puros sobre el PS II.

El Te^- en el PS II se determinó adicionando al medio de reacción DCPIP/ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ como aceptor artificial de electrones; en este caso el H_2O actuó como donador natural de electrones. Con el objeto de inhibir el flujo de electrones hacia el PS I, se adicionó DBMIB a la mezcla de reacción, y NH_4Cl como agente desacoplante (Macías-Rubalcava *et al.*, 1999; King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007) (Figura 20).

En contraste con el Te^- en el PS I, el Te^- en el PS II fue inhibido de manera dependiente de la concentración por los extractos orgánicos y los compuestos selectos (Figura 20), con valores de $\text{Cl}_{50} < 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $< 200 \mu\text{M}$, respectivamente (Cuadro 12). En general, los extractos de micelio provocaron mayor inhibición que los extractos de medio de cultivo; este mismo fenómeno se observó también en el Te^- basal, fosforilante y desacoplado. Los

extractos de micelio de las variantes morfológicas C1e2b, C1e y C1c mostraron la mayor actividad biológica con valores de CI_{50} de 24.0, 41.6 y 57.4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Cabe destacar que el PS II fue inhibido en un 100% por los extractos C1e mic y C1e med a 200 $\mu\text{g/mL}$, y por el extracto de la variante C1e2b mic a 150 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto a los compuestos puros evaluados, las Pr EG₄ y EG₁ presentaron la mayor inhibición sobre el Te^- de H_2O a DCPIP/ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, con valores de CI_{50} de 114.5 y 128.9 μM , respectivamente (Cuadro 12). Con el objeto de conocer el sitio de inhibición en del PS II, se determinó el efecto de los extractos orgánicos y compuestos puros en las reacciones parciales del flujo de electrones de H_2O a SiMo, y de DPC a DCPIP.

El efecto inhibitorio observado por todos los tratamientos en las reacciones parciales del PS II fue dependiente de la concentración (Figuras 20). En general, los extractos de medio de cultivo inhibieron en mayor grado que los extractos de micelio. Cabe señalar que todos los tratamientos mostraron mayor inhibición en la reacción parcial de H_2O a SiMo (con $CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$) que en la de DPC a DCPIP. El extracto C1e2a med mostró la mayor actividad biológica, con un valor de CI_{50} de 26.3 $\mu\text{g/mL}$ en el Te^- de H_2O a SiMo, y de 81.0 $\mu\text{g/mL}$ en el Te^- de DPC a DCPIP (Cuadro 12). Por otra parte, la Pr EG₄ y la Pa CP₂ fueron los compuestos más activos, con valores de CI_{50} de 11.2 y 14.6 μM , respectivamente, en el Te^- de H_2O a SiMo.

En resumen, los extractos del medio de cultivo fueron los más activos en la síntesis de ATP y en las reacciones parciales del PS II de H_2O a DCPIP/ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y de H_2O a SiMo; mientras que los extractos de micelio fueron más activos al inhibir el Te^- desacoplado, además de inhibir las reacciones del PS II. En conjunto, estos resultados indican que el sitio de inhibición de los extractos orgánicos y de las preusomerinas y palmarumicinas evaluadas está en el Te^- en el PS II, entre P₆₈₀ y Q_A (Macías-Rubalcava *et al.*, 1999; King-Díaz *et al.*, 2006; Morales-Flores *et al.*, 2007). En el Cuadro 12 se muestra el efecto de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas del hongo endófito *E. gomezpompae* y los metabolitos secundarios seleccionados sobre las diferentes actividades fotosintéticas evaluadas, expresados en valores de CI_{50} .

Una vez analizados los resultados anteriores, se puede observar que los extractos y compuestos puros evaluados constituyen candidatos para el desarrollo de agentes herbicidas, con un efecto en la cadena T_e^- en el PS II. Sin embargo, se tendría que continuar con la experimentación de éstos para poder determinar diferentes interacciones con el medio ambiente y el ser humano.

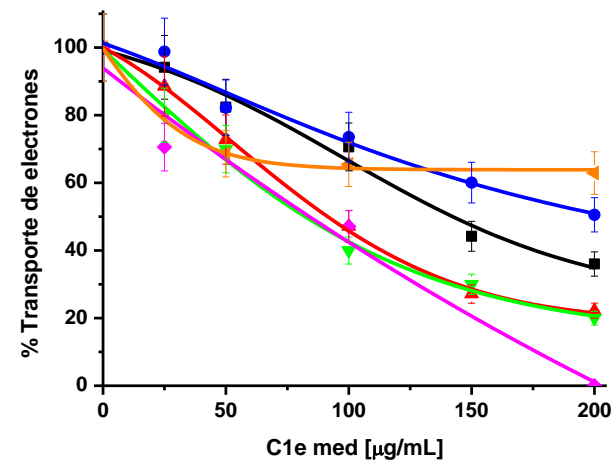
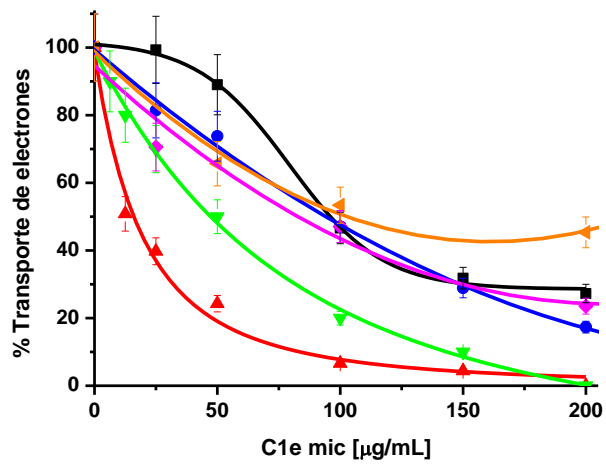
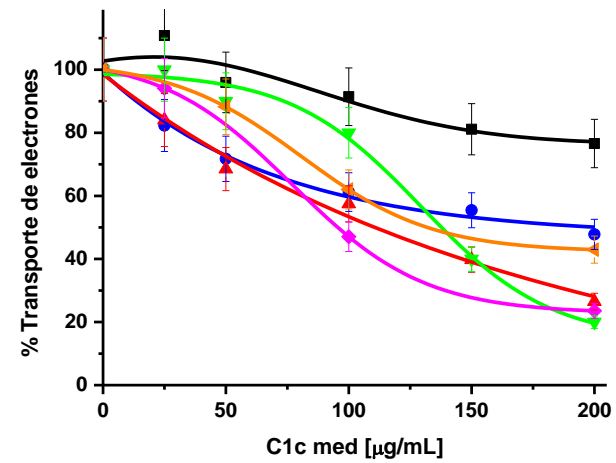
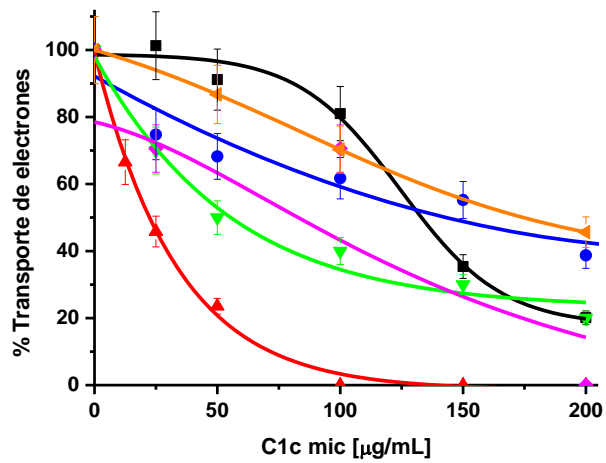


Figura 19. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae*, sobre el transporte de electrones (■) basal, (●) fosforilante, (▲) desacoplado, y sobre las reacciones parciales en el (▼) PS II, (◆) H₂O a SiMo y (◄) DPC a DCPIP. El valor del control que representa el 100% de actividad fue de 412 µeq e⁻/ mg Chl × h. Cada punto representa la media de tres determinaciones, realizadas con diferentes aislamientos de cloroplastos. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

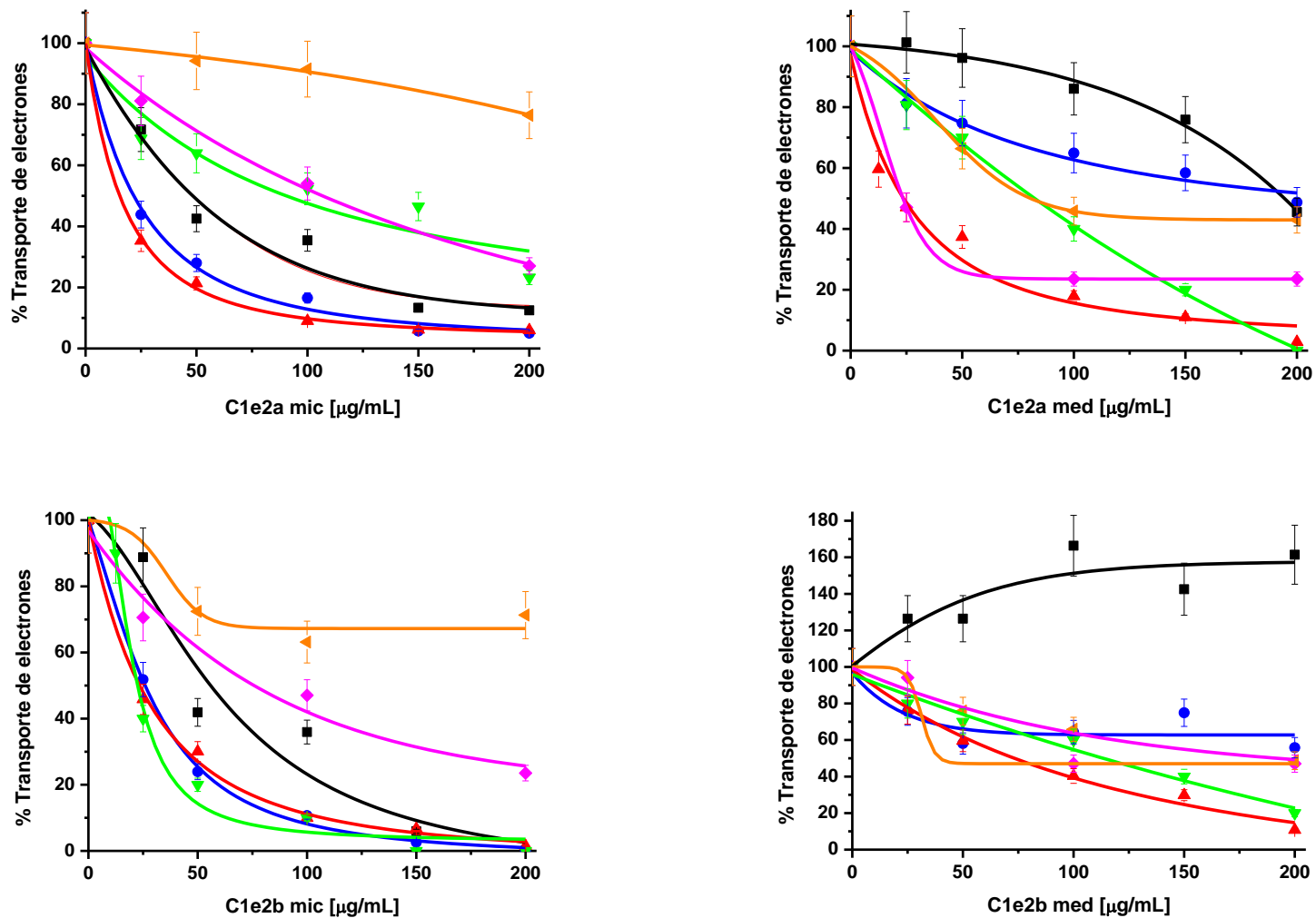


Figura 19. Efecto inhibitorio de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae*, sobre el transporte de electrones (■ basal, ● fosforilante, ▲ desacoplado, y sobre las reacciones parciales en el (▼) PS II, (◆) H₂O a SiMo y (◄) DPC a DCPIP. El valor del control que representa el 100% de actividad fue de 412.0 µeq e⁻/ mg Chl × h. Cada punto representa la media de tres determinaciones, realizadas con diferentes aislamientos de cloroplastos. Las barras verticales representan las desviaciones estándar (continuación).

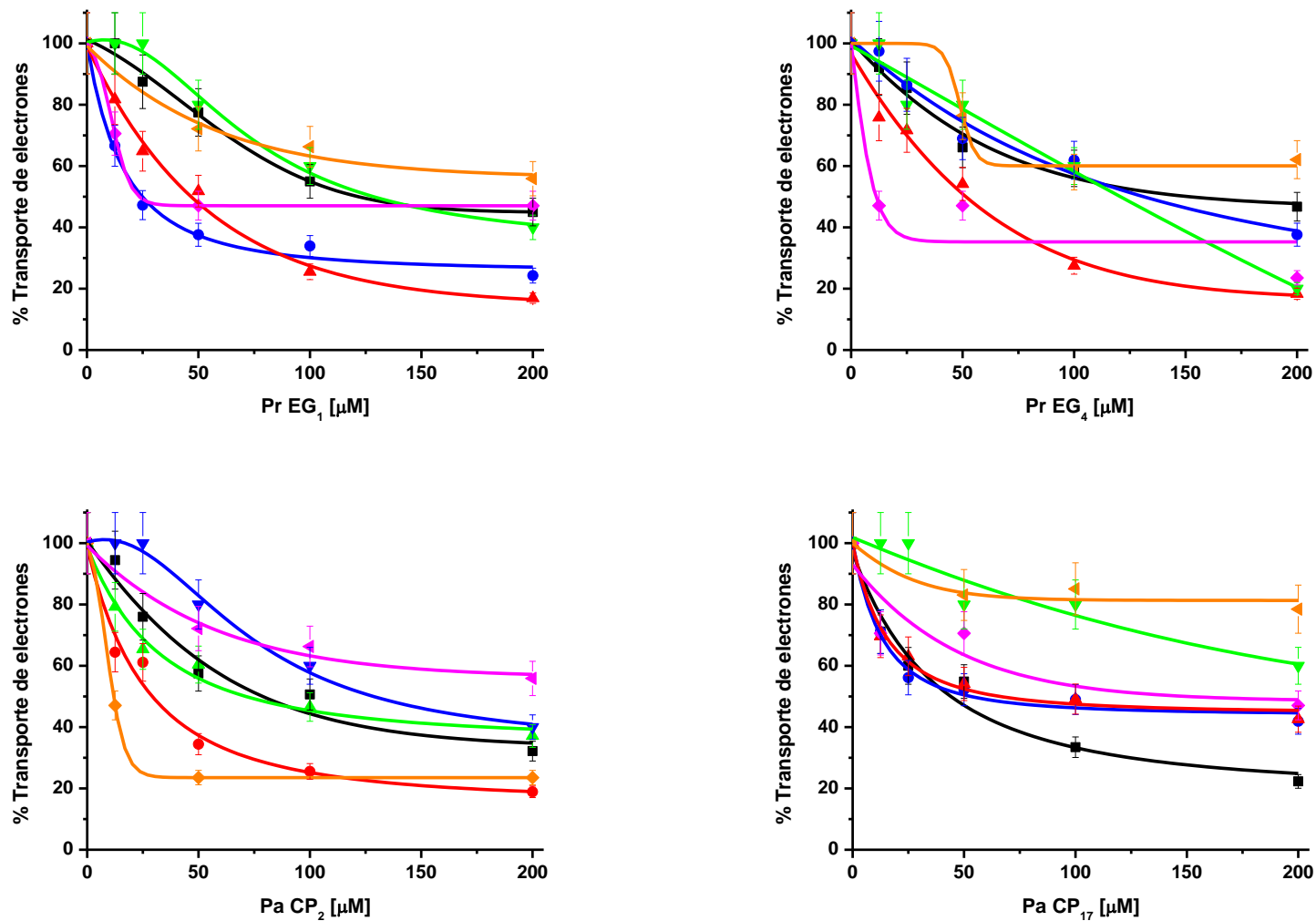


Figura 20. Efecto inhibitorio de los compuestos puros de las variantes morfológicas de *E. goezympae*, sobre el transporte de electrones (■) basal, (●) fosforilante, (▲) desacoplado, y sobre las reacciones parciales en el (▼) PS II, (◆) H₂O a SiMo y (◄) DPC a DCPIP. El valor del control que representa el 100% de actividad fue de 239.9 $\mu\text{eq e}^- / \text{mg Chl} \times \text{h}$. Cada punto representa la media de tres determinaciones, realizadas con diferentes aislamientos de cloroplastos. Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

Cuadro 12. Valores de CI_{50} para la síntesis de ATP, Te^- basal, fosforilante y desacoplado, y las reacciones parciales del PS II, PS I, H_2O a SiMo y DPC a DCPIP de los extractos orgánicos de las cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y las Pr EG₁, Pr EG₄, Pa CP₂ y Pa CP₁₇.

Actividad Fotosintética	CI_{50} Extractos Orgánicos de las Variantes Morfológicas de <i>E. gomezpompae</i> ($\mu g/mL$)								CI_{50} Compuestos (μM)			
	C1c	C1c	C1e	C1e	C1e2a	C1e2a	C1e2b	C1e2b	Pr EG ₁	Pr EG ₄	Pa CP ₁₇	Pa CP ₂
	mic	med	mic	med	mic	med	mic	med				
Síntesis de ATP	106.2	70.4	53.7	55.7	42.0	15.9	51.5	42.7	178.1	>200	24.3	25.1
Transporte de electrones												
Basal	135.1	>200	107.2	142.6	46.1	195.4	52.6	>200	122.3	152.2	46.6	74.8
Fosforilante	152.6	184.3	86.5	>200	22.0	>200	26.2	>200	23.7	131.9	48.8	30.8
Desacoplado	17.9	104.5	14.4	55.7	16.8	22.2	23.5	67.6	46.1	50.0	63.5	84.3
PS I												
DCPIP(red) a MV	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
PS II												
H_2O a DCPIP/ $K_3[Fe(CN)_6]$	57.4	137.6	41.6	79.4	90.1	71.8	24.0	101.4	128.9	114.5	>200	142.1
H_2O a SiMo	102.7	97.7	71.4	84.1	99.3	26.3	71.4	40.3	23.5	11.2	135.6	14.6
DPC a DCPIP	174.7	132.0	102.4	>200	>200	81.0	>200	193.3	>200	>200	>200	>200

6. Análisis por CLAR de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae*

Las preusomerinas y palmarumicinas producidas por las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* fueron analizadas mediante CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) (Figura 21). Los perfiles cromatográficos muestran que las cuatro variantes difieren principalmente en la concentración de los bisnaftoespirocetales (Cuadro 13). Estos resultados explican la diferencia en la actividad biológica demostrada por los extractos a nivel de semillas, mitocondrias y cloroplastos.

La actividad mostrada por los extractos del medio de cultivo de las variantes C1c, C1e y C1e2b sobre la germinación, crecimiento de la raíz y respiración de las semillas de prueba, puede deberse a la presencia de altas concentraciones de la Pr EG₃. La alta concentración de la Pa CP₂ en el extracto de la variante C1c mic puede ser la responsable del efecto fitotóxico demostrado sobre las semillas de *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum*, *L. sativa* y *E. crus-galli* (Cuadro 13).

Por otro lado, la actividad biológica obtenida por los extractos del medio de cultivo de las variantes morfológicas C1e y C1e2a sobre la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, podría estar asociada a la presencia de los picos observados en la región cromatográfica entre 0 a 7 min (Figura 21), que en una investigación posterior se estudiará. La actividad demostrada por los extractos de micelio en el transporte de electrones desacoplado, podría estar asociada a la alta concentración de la Pr EG₄; mientras que la actividad inhibitoria sobre el Te⁻ en el PS II de H₂O a DCPIP/K₃[Fe(CN)₆] pudiera deberse a la concentración de la Pa CP₁₇ (Cuadro 13).

Los resultados, en conjunto, muestran que algunos bisnaftoespirocetales minoritarios que no fueron evaluados sobre las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis, tienen actividad fitotóxica relevante sobre plantas. Esta observación sugiere que, el efecto fitotóxico de los extractos orgánicos está dado por los diferentes metabolitos biosintetizados por *E. gomezpompae*, que inhiben la fotosíntesis en el PS II.

Las cuatro variantes, además de presentar cambios morfológicos, también difieren en la cantidad de metabolitos secundarios producidos, estas características son parte de la plasticidad fenotípica de *E. gomezpompae*. No obstante, la suma de todos los metabolitos secundarios producidos por cada variante morfológica es altamente fitotóxica.

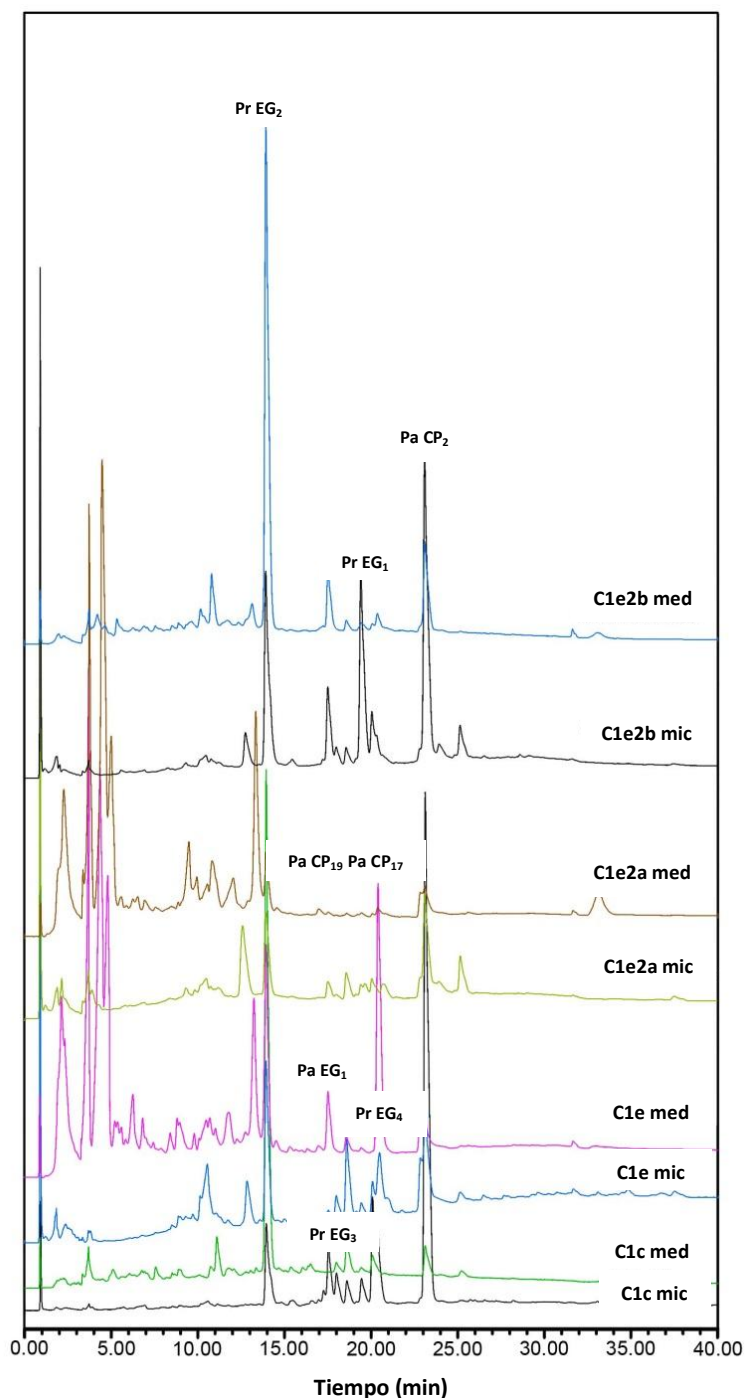


Figura 21. Perfiles de CLAR a 225 nm de las diferentes preusomerinas y palmarumicinas presentes en los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae*.

Cuadro 13. Análisis por CLAR de las preusomerinas y palmarumicinas presentes en los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae*.

Variante Morfológica	Compuestos Detectados	Compuestos Mayoritarios (% de area)
C1c mic	Pr EG ₁ , Pr EG ₂ , Pr EG ₃ , Pr EG ₄ , Pa EG ₁ , Pa CP ₁₉ , Pa CP ₁₇ , Pa CP ₂	Pa CP ₂ (54.6), Pa CP ₁₇ (9.1), Pr EG ₂ (8.6), Pa EG ₁ (7.3),
C1c med	Pr EG ₁ , Pr EG ₂ , Pr EG ₃ , Pr EG ₄ , Pa EG ₁ , Pa CP ₁₇ , Pa CP ₂	Pr EG ₂ (62.4), Pa CP ₂ (8.7), Pa CP ₁₇ (8.5)
C1e mic	Pr EG ₂ , Pr EG ₄ , Pa CP ₁₉ , Pa CP ₁₇ , Pa CP ₂	Pr EG ₂ (29.8), Pa CP ₂ (25.6), Pr EG ₄ (16.0),
C1e med	Pr EG ₂ , Pr EG ₄ , Pa EG ₁ , Pa CP ₁₇ , Pa CP ₂	Pa CP ₁₇ (38.8), Pr EG ₂ (22.9), Pa EG ₁ (8.3)
C1e 2a mic	Pr EG ₁ , Pr EG ₂ , Pr EG ₃ , Pr EG ₄ , Pa EG ₁ , Pa CP ₁₉ , Pa CP ₁₇ , Pa CP ₂	Pr EG ₂ (20.4), Pa CP ₂ (32.3)
C1e 2a med	Pr EG ₂ , Pa CP ₂	Pr EG ₂ (14), Pa CP ₂ (12)
C1e 2b mic	Pr EG ₁ , Pr EG ₂ , Pr EG ₃ , Pr EG ₄ , Pa EG ₁ , Pa CP ₁₉ , Pa CP ₁₇ , Pa CP ₂	Pa CP ₂ (32.4), Pr EG ₂ (20.1), Pr EG ₁ (19.6), Pa EG ₁ (7.3)
C1e 2b med	Pr EG ₁ , Pr EG ₂ , Pr EG ₃ , Pr EG ₄ , Pa EG ₁ , Pa CP ₁₉ , Pa CP ₁₇ , Pa CP ₂	Pr EG ₂ (63.2), Pa CP ₂ (14.5), Pa EG ₁ (8.6)

VII. Conclusiones

La determinación cuantitativa de la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo de las variantes morfológicas del hongo endófito *Edenia gomezpompae*, sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración de las plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum* y *Lactuca sativa*, demostró que todos los extractos inhibieron significativamente y de manera dependiente de la concentración los tres procesos fisiológicos evaluados. El crecimiento de la raíz y la respiración fueron los procesos más afectados, y el extracto de medio de cultivo de la variante morfológica C1c el más activo.

Los compuestos puros biosintetizados por las variantes morfológicas del hongo endófito *E. gomezpompae* inhibieron de manera dependiente de la concentración, la germinación, crecimiento de la raíz y la respiración de las plántulas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum* y *Echinochloa crus-galli*. En general, las preusomerinas ensayadas demostraron mayor potencial fitotóxico sobre las tres plantas prueba, que las palmarumicinas y el ergostano, con valores de CI_{50} menores a la máxima concentración de prueba que fue de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos resultados comprueban que el hongo *E. gomezpompae* puede ser considerado como una fuente de compuestos que regulan el crecimiento vegetal.

Los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y los bisnaftoespirocetales inhiben de manera dependiente de la concentración el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial, empleando como blanco mitocondrias aisladas de hojas de *Spinacea oleracea*. Únicamente a la máxima concentración de prueba (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostraron efectos inhibitorios significativos, siendo los porcentajes de inhibición menores al 50%.

Los extractos derivados del micelio poseen mayor efecto inhibitorio sobre la respiración de mitocondrias de *S. oleracea* que los extractos de medio de cultivo. Los extractos de medio de cultivo (37.9 %) y micelio (39.2%) de la variante morfológica C1e2a mostraron la

mayor actividad biológica. Las preusomerinas EG₁ (25.6%) y EG₄ (33.4%), y las palmarumucinas CP₂ (26.2%) y Pa CP₁₇ (14.9%), demostraron los mayores porcentajes de inhibición en el consumo de O₂ mitocondrial.

La respiración mitocondrial no es el principal mecanismo de acción fitotóxico los extractos orgánicos de las variantes morfológicas y de los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *E. gomezpompae*.

Los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* inhiben la síntesis de ATP de H₂O a MV, en cloroplastos aislados de hojas de *S. oleracea*, de manera dependiente de la concentración. En general, los extractos de medio de cultivo muestran mayor inhibición que los extractos de micelio. Las IC₅₀ de todos los tratamientos se encuentran en un intervalo de 15.9 a 106.2 µg/mL.

Los extractos derivados del medio de cultivo de las variantes morfológicas C1e (IC₅₀= 55.7 µg/mL), C1e2a (IC₅₀= 15.9 µg/mL) y C1e2b (IC₅₀= 42.7 µg/mL), inhibieron en un 100% la síntesis de ATP a 150 µg/mL. El extracto orgánico del medio de cultivo de la variante morfológica C1e2a (IC₅₀= 15.9 µg/mL) presentó la mayor actividad biológica sobre la síntesis de ATP. Las preusomerinas EG₁ y EG₄, y las palmarumucinas CP₂ y Pa CP₁₇, inhiben la síntesis de ATP de H₂O a MV, de manera dependiente de la concentración. Las Pa CP₁₇ (IC₅₀= 24.3 µM) y Pa CP₂ (IC₅₀= 25.1 µM) presentaron mayor actividad inhibitoria que las Pr EG₁ (IC₅₀= 178.1) y Pr EG₄ (IC₅₀> 200).

En general, los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* muestran actividad inhibitoria dependiente de la concentración sobre el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado. En general, presentan valores de CI₅₀< 200 µg/mL, comportándose como inhibidores potentes de la reacción de Hill.

Los extractos del micelio de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* fueron más activos sobre el Te⁻ basal, fosforilante y desacoplado, que los extractos derivados del medio de cultivo. Los extractos orgánicos derivados del micelio de las variantes C1e2a

(Cl_{50} = 46.1 μ g/mL) y C1e2b (Cl_{50} = 52.6 μ g/mL) fueron los más activos sobre el Te^- basal. El extracto del medio de cultivo de la variante C1e2b fue el único que presentó activación del Te^- basal. Actuando como un agente desacoplante débil e inhibidor de la reacción de Hill. El Te^- fosforilante también fue más afectado por la presencia de los extractos de micelio de las variantes C1e2a (Cl_{50} = 22.0 μ g/mL) y C1e2b (Cl_{50} = 26.2 μ g/mL). El Te^- desacoplado fue más afectado por los extractos orgánicos del micelio de variantes morfológicas C1e (Cl_{50} = 14.4 μ g/mL), C1e2a (Cl_{50} = 16.8 μ g/mL) y C1c (Cl_{50} = 17.9 μ g/mL).

Las preusomerinas EG₁ y EG₄, y las palmarumucinas CP₂ y Pa CP₁₇, inhibieron el Te^- basal, fosforilante y desacoplado, de manera dependiente de la concentración, con valores de Cl_{50} < 200 μ M.

El Te^- basal fue más afectado por la presencia de las Pa CP₁₇ (Cl_{50} = 46.6 μ M) y Pa CP₂ (Cl_{50} = 74.8 μ M) que por las Pr EG₁ (Cl_{50} = 122.3 μ M) y Pr EG₄ (Cl_{50} = 152.2 μ M). Las Pr EG₁ (Cl_{50} = 23.7 μ M) y la Pa CP₂ (Cl_{50} = 30.8 μ M) presentan los mayores porcentajes inhibición sobre el Te^- fosforilante. El Te^- desacoplado fue más afectado por la presencia de las Pr EG₁ (Cl_{50} = 46.1 μ M) y Pr EG₄ (Cl_{50} = 50.0 μ M). Los bisnaftoespirocetales puros actúan como inhibidores de la reacción de Hill.

El Te^- en el PS I de DCPIP(red) a MV no fue inhibido significativamente por la presencia los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de las cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae*, ni por los bisnaftoespirocetales puros evaluados a la máxima concentración de prueba, que fue de 200 μ g/mL para los extractos orgánicos y de 200 μ M para los compuestos puros.

El Te^- en el PS II de H₂O a DCPIP/K₃[Fe(CN)₆] fue inhibido de manera dependiente de la concentración por los extractos orgánicos y compuestos puros. Los extractos de las variantes C1e mic y C1e med a 200 μ g/mL, y por el extracto de la variante C1e2b mic a 150 μ g/mL inhiben en un 100% el Te^- en el PS II. Los extractos de micelio de las variantes morfológicas C1e2b (Cl_{50} = 24.0 μ g/mL), C1e (Cl_{50} = 41.6 μ g/mL) y C1c (Cl_{50} = 57.4 μ g/mL)

mostraron el mayor potencial biológico. Las Pr EG₄ (CI₅₀ 114.5 μM) y EG₁ (CI₅₀ 128.9 μM) muestran la mayor inhibición sobre el Te⁻ de H₂O a DCPIP/K₃[Fe(CN)₆].

Los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y los compuestos puros evaluados, poseen mayor inhibición sobre el Te⁻ en la reacción parcial de H₂O a SiMo (CI₅₀< 200 μg/mL) en el PS II que en la reacción parcial de DPC a DCPIP (CI₅₀> 200 μg/mL). El efecto inhibitorio observado por todos los tratamientos en las reacciones parciales del PS II fue dependiente de la concentración y en general, los extractos de micelio provocaron mayor inhibición que los extractos de medio de cultivo.

El extracto orgánico de medio de cultivo de la variante morfológica C1e2a reveló la mayor actividad en el Te⁻ en las reacciones parciales de H₂O a SiMo (CI₅₀= 26.3 μg/mL) y de DPC a DCPIP (CI₅₀= 81.0 μg/mL). El Te⁻ en la reacción parcial de H₂O a SiMo fue más afectado por la presencia de la preusomerina EG₄ (CI₅₀= 11.2 μM) y la palmarumicina CP₂ (CI₅₀= 14.6 μM)

El sitio de inhibición de los extractos orgánicos y de las preusomerinas y palmarumicinas evaluadas está localizado en el PS II, entre P₆₈₀ y Q_A.

Los perfiles cromatográficos obtenidos por CLAR de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de las cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae* difieren principalmente en la concentración de los bisnaftoespirocetales producidos. Estos resultados explican la diferencia en la actividad biológica manifestada por los extractos a nivel de semillas, mitocondrias y cloroplastos.

Los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de las cuatro variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y los bisnaftoespirocetales biosintetizados, constituyen candidatos para el desarrollo de agentes herbicidas alternativos útiles en la agricultura moderna, con un efecto inhibitorio sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis, específicamente en Te⁻ en el PS II entre P₆₈₀ y Q_A.

VIII. Perspectivas

- Cultivar en mediana escala las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y aislar y purificar en cantidad suficiente las preusomerinas y palmarumicinas producidas.
- Aislar y purificar los compuestos correspondientes a los picos observados por CLAR en tiempo de retención de 0 a 7 min en los extractos de derivados del medio del cultivo de las variantes morfológicas C1e y C1e2b. Establecer su potencial fitotóxico en plantas.
- Evaluar el efecto de las palmarumicinas EG₁ y CP₁₉, y las preusomerinas EG₂ y EG₃ sobre las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis.
- Realizar un estudio de relación estructura actividad.
- Llevar a cabo estudios en invernadero sobre el efecto pre-emergente de los extractos orgánicos de las variantes *E. gomezpompae*, así como de los bisnaftoespirocetales puros y determinar su potencial fitotóxico sobre planta entera. Evaluar su efecto sobre la fase luminosa de la fotosíntesis.
- Determinar preliminarmente la toxicidad de los extractos orgánicos de las variantes morfológicas de *E. gomezpompae* y compuestos puros sobre el crustáceo *Artemia salina* y sobre líneas celulares de macrófagos.

IX. Referencias

- Aly, A., Debbab, A., Kjer, J. & Proksch, P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity*, 41, 1-16.
- Anaya, A.L., Mata, R., Sims, J.J., González-Coloma, A., Cruz-Ortega, R., Guadaño, A., Hernández-Bautista, B., Midland, S., Ríos, G. & Gómez-Pompa, A. (2003). Allelochemical Potential of *Callicarpa acuminata*. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 2761-2776.
- Armendáriz-Guillén, B. (2013). Hongos Endófitos Productores de Metabolitos Secundarios con Potencial Fitotóxico y Antifúngico. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Arnold, A.E., Maynard, Z. & Gilbert, G.S. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycology Research*, 105, 1502-1507.
- Azevedo, L., Maccheroni Jr., J.W., Pereira, J.O. & de Araújo., W.L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 717-3458.
- Bode, H., Walker, M. & Zeeck, A. (2000). Secondary Metabolites by Chemical Screening: Cladospirones B to I from Sphaeropsidales sp. F-249707 by Variation of Culture Conditions. *European Journal of Organical Chemistry*, 3185-3193.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry*, 72, 248-254.

Chen, S., Xu, X., Dai, X., Yang, C. & Qiang, S. (2007). Identification of tenuazonic acid as a novel type of natural photosystem II inhibitor binding in QB-site of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 306–318.

Collman, J.P., Dey, A., Barile, C.J., Ghosh, S. & Decréau, R.A. (2009). Inhibition of Electrocatalytic O₂ Reduction of Functional CcO Models by Competitive, Non-Competitive and Mixed Inhibitors. *Inorganical Chemistry*, 48, 10528-10534.

Copping, L.G. & Hewitt, G. (1998). Chemistry and mode of Action of Crop Protection Agents. *The Royal Society of Chemistry*.

Degli Esposti, M. (1997). Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1364, 222-235.

Dong, J., Song, H., Li, J., Tang, Y., Sun, R., Wang, L., Zhou, Y., Wang, L., Shen, K., Wang, C. & Zhang, K. (2008). Ymf 1029A#E, Preussomerin Analogues from the Fresh-Water-Derived Fungus YMF 1.01029. *Journal of Natural Products*, 71, 952-956.

Duke, S. & Dayan, F. (2011). Modes of Action of Microbially-Produced Phytotoxins. *Toxins*, 3, 1038-1064.

Duke, S.O. (1990). Overview of Herbicide Mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, 263-271.

Faeth, S.H. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*, 98, 25-36.

Gavrilescu, M. (2005). Review: Fate of Pesticides in the Environmental and its Bioremediation. *Enginery Life Science*, 5, 497-526.

Gravilescu, M. (2005). Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Engineering Life Science*, 500.

Green, M.J. & Owen, M. (2010). Herbicide-resistant crops: Utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5819-5829.

Hawksworth, D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycology Research*, 105, 1422-1432.

Krohn, K., Beckmann, K., F1örke, U., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Busemann, S. & Bringmann, G. (1997). New Palmarumycins CP4a and CP 5 from *Coniothyrium palmarum*: Structure Elucidation, Crystal Structure Analysis and Determination of the Absolute Configuration by CD Calculations. *Tetrahedron*, 53, 3101-3110.

Macías, M.L., Rojas, I.S., Mata, R. & Lotina-Hennsen, B. (1999). Effect of Selected Coumarins on Spinach Chloroplast Photosynthesis *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2137-2140.

Macías-Rubalcava, M.L., Hernández-Bautista, B.E., Jiménez-Estrada, M., González, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T., Hernández-Ortega, S., Saucedo-García, A., Murià-González, J. & Anaya, A.L. (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, 69, 1185–1196.

Macías-Rubalcava, M.L., Ruiz-Velasco Sobrino, M.E., Meléndez-González, C. & Hernández-Ortega, S. (2014). Naphthoquinone Spiroketal and Organic Extracts from the Endophytic Fungus *Edenia gomezpompae* as Potential Herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [dx.doi.org/10.1021/jf500965k](https://doi.org/10.1021/jf500965k)

Martínez-Luis, S., Della-Togna, G., D. Coley, P., Kursar, T.A., Gerwick, W.H. & Cubilla-Rios, L. (2008). Antileishmanial Constituents of the Panamanian Endophytic Fungus *Edenia* sp. *Journal of Natural Products*, 71, 2011-2014.

Matsumura, F. (2004). Contemporary Issues on Pesticide Safety. *Journal of Pesticide Science*, 29, 299-303.

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

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

Morales-Flores, F., Aguilar, M.I., King-Díaz, B., de Santiago-Gómez, J.R. & Lotina-Hennsen, B. (2007). Natural diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 91, 71–80.

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

Murià-González, M.J. (2010). Papel de los bisnaftoespirocetales del hongo endófito *Edenia gomezpompae* en la interacción antagónica con *Guignardia mangiferae* y *Phytophthora capsici*. Posgrado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM.

Najafpour, M., Teixeira, R., Pereira, J. & Pereira, W. (2012). Applied Photosynthesis. Chapter 1: Photosynthetic Inhibitors. *InTech*, 3-16.

Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2005). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Omega, 4° ed., pp. 401-402, 496-508, 602-625, 691-750.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (1990). *Manejo de malezas para países en desarrollo*. Departamento de Agricultura. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s0e.htm>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2009). *Alimentación, nutrición y agricultura*. Agriculture and consumer protection. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/u9920t/u9920t09.htm#TopOfPage>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2001). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001*. Dirección Informativa de la FAO.

Pimentel, M., Molina, G., Dionísio, A.P., Mar óstica Jr, M.R. & Pastore, G. (2011). The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Biotechnology Research International*, 11.

Polishook, J.D., Dombrowski, A.W., Tsou, N., Salituro, G. & Curotto, J.E. (1993). Preussomerin D from the Endophyte *Hormonema dematioides*. *Mycologie*, 85, 62-64.

Prajoubklang, A., Sirithunyalug, B., Charoenchai, P., Suvannakad, R., Sriubolmas, N., Piyamongkol, S., Kongsaree, P. & Kittakoop, P. (2005). Bioactive Deoxypreussomerins and Dimeric Naphthoquinones from *Diospyros ehretioides* Fruits: Deoxypreussomerins May Not Be Plant Metabolites But May Be from Fungal Epiphytes or Endophytes. *Chemistry and Biodiversity*, 2, 1358-1367.

Ramsay, R., Ackrell, B., Coles, C., Singer, T., White, G. & Thorn, D. (1980). Reaction site of carboxanilides and of thenoyltrifluoroacetone in complex II*. *Process Natural Academic Science*, 78, 825-828.

Ravindranath, N., Ravinder Reddy, M., Mahender, G., Ramu, R., Ravi Kumar, K. & Biswanath D. (2004). Deoxypreussomerins from *Jatropha curcas*: are they also plant metabolites? *Phytochemistry*, 65, 2387-2390.

Rödiger, A., Baudisch, B., Klösigen & R.B. (2009). Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *Journal of Plant Physiology*, 1-5.

Rosell, G., Quero, C., Coll, J. & Guerrero, A. (2008). Biorational insecticides in pest management. *Journal of Pesticide Science*, 33, 103-121.

S. Lazo, J.S., Tamura, K., Vogt, A., Jung, J., Rodríguez, S., Balachandran, R., Day, B.W. & Wipf, P. (2000). Antimitotic Actions of a Novel Analog of the Fungal Metabolite Palmarumycin CP₁. *Journal Pharmaceutical Experimental Therapeutics*, 296, 364-371.

Sánchez-Fernández, R. E. (2010). Potencial Alelopático de Extractos del Micelio y Medio de Cultivo de un Hongo Endófito Aislado de *Lonchocarpus Castilloi* (Fabaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

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

Schulz, B., Boyle, C. (2005). Review: The endophytic continuum. *Mycology Reserch*, 109, 661–686.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Rommert, A.K. & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycology Research*, 106, 996-1004.

Seephonkai, P., Isaka, M., Kittakoop, P., Palittapongarnpim, P., Kamchonwongpaisan, S., Tanticharoen, M. & Thebtaranonth, Y. (2001). Evaluation of Antimycobacterial, Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of Preussomerins Isolated from the Lichenicolous Fungus *Microsphaeropsis* sp. BCC 3050. *Planta Medicine*, 68, 45-48.

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

Soman, A.G., Gloer, J.B., Koster, B. & Malloch, D. (1999). Sporovexins A-C and a New Preussomerin Analog: Antibacterial and Antifungal Metabolites from the Coprophilous Fungus *Sporormiella vexans*. *Journal of Natural Products*, 62, 659-661.

Stengel, A., Benz, J.P., Soll, J. & Bölter, B. (2010). Redox-regulation of protein import into chloroplasts and mitochondria. Similarities and differences. *Plant Signaling & Behavior* 5:2, 105-109.

Strobel, G. & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 67, 491-502.

Strobel, G. (2002). Rainforest Endophytes and Bioactive Products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22, 315-333.

Strobel, G. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5, 535-544.

Strobel, G. (2005). Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 240-244.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67, 257-268.

Tan, R.X. & Zou, W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Production*, 18, 448-459.

Veiga, T.A.M., Silva, S., Archundia-Camacho, F., Filho, E.R., Vieira, P.C., Fernandes, J., Silva, M.F., Muller, M.M. & Lotina-Hennsen, B. (2007). Inhibition of Photophosphorylation and Electron Transport Chain in Thylakoids by Lasiodiplodin, a Natural Product from *Botryosphaeria rhodina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4217-4221.

Vilella, D., Sánchez, M., Platas, G., Salazar, O., Genilloud, O., Royo, I., Cascales, C., Martín, I., Díez T., Silverman, K.C., Lingham, R.B., Singh, S.B., Jayasuriya, H. & Peláez, F. (2000). Inhibitors of farnesylation of Ras from a microbial natural screening products program. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25, 315-327.

Voet D. & Voet J.G. (2006). Capítulos 15-20, 22: *Bioquímica*. (pp. 424-602, 630-660). Médica Panamericana: México.

Wakabayashi, K. & Böguer, P. (2002). Target Sites for Herbicides: Entering 21st Century. *Pest Management Science*, 58, 1149-1154.

Weber, H.A. & Gloer, J.B. (1991). The Preussomerins: Novel Antifungal Metabolites from the Coprophilous Fungus *Preussia isomera* Cain. *Journal of Organical Chemistry*, *56*, 4355-4360.

Wild, D. (1975). Mutagenicity Studies on Organophosphorus Insecticides. *Mutation Research*, *32*, 133-150.

Wipf, P., Hopkins, T.D., Jung, J.K., Rodríguez, S., Birmingham, A., Southwick, E.C., Lazo, J.S. & Powis, G. (2001). New Inhibitors of the Thioredoxin–Thioredoxin Reductase System Based on a Naphthoquinone Spiroketal Natural Product Lead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *11*, 2637–2641.

Wipf, P., Jung, J.K., Rodríguez, S. & Lazo, J. (2005). Synthesis and biological evaluation of deoxypreussomerin A and palmarumycin CP1 and related naphthoquinone spiroketals. *Tetrahedron*, *57*, 283-296.

Wipf, P., Lynch, S., Powis, G., Birmingham, A. & Englund, E. (2005). Synthesis and biological activity of prodrug inhibitors of the thioredoxin–thioredoxin reductase system. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *3*, 3880–3882.

Wipf, P., Lynch, S.M., Birmingham, A., Tamayo, G., Jiménez, A., Campos, N. & Powis, G. (2005). Natural Product Based Inhibitors of the Thioredoxin – Thioredoxin Reductase System. 1-90.

Yamaguchi, I. & Fujimura, M. (2005). Recent Topics on Action Mechanisms of Fungicides. *Journal of Pesticide Science*, *30*, 67-74.

Yu-Xiao, L., Xiao-Ming, X., Xin-Bin D. & Sheing Q. (2007). Alternaria alternata Crofton-Weed Toxin: a Natural Inhibitor of Photosystem II in Chlamydomonas reinhardtii Thylakoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5180-5185.

Zhang, H., Song, Y. & Tan, R. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Products*, 23, 753–771.

X. Anexos

Publicaciones Generadas

Naphthoquinone Spiroketal and Organic Extracts from the Endophytic Fungus *Edenia gomezpompae* as Potential Herbicides

Martha L. Macías-Rubalcava,^{*,†,‡} M. Emma Ruiz-Velasco Sobrino,^{†,‡} Claudio Meléndez-González,^{†,‡} and Simón Hernández-Ortega^{†,§}

[†]Instituto de Química, [‡]Departamento de Productos Naturales, and [§]Laboratorio de Rayos X, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510, Mexico

S Supporting Information

ABSTRACT: From the fermentation mycelium of the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* were obtained several phytotoxic compounds including two new members of the naphthoquinone spiroketal family, namely, palmarumycin EG₁ (1) and preussomerin EG₄ (4). In addition, preussomerins EG₁–EG₃ (7–9) and palmarumycins CP₁₉ (2), CP₁₇ (3), and CP₂ (6), as well as ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (5), were obtained. Compounds 2, 3, and 5 are new to this species. The structures of palmarumycins CP₁₉ (2) and CP₁₇ (3) were unambiguously determined by X-ray analysis. The isolates and mycelium organic extracts from four morphological variants of *E. gomezpompae* caused significant inhibition of seed germination, root elongation, and seedling respiration of *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum*, and *Echinochloa crus-galli*. The treatments also affected respiration on intact mitochondria isolated from spinach.

KEYWORDS: *Edenia gomezpompae*, endophytic fungi, *Callicarpa acuminata*, naphthoquinone spiroketals, preussomerins, palmarumycins, phytotoxic compound, germination, root elongation, seedling respiration, mitochondrial respiration

■ INTRODUCTION

In a previous investigation we described the major antifungal components from *Edenia gomezpompae*, an endophytic fungus isolated from *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae).^{1,2} Thus, bioassay-guided fractionation of the active mycelium extract led to the isolation of four naphthoquinone spiroketals, namely, palmarumycin CP₂ (6), and preussomerins EG₁ (7), EG₂ (8), and EG₃ (9). Preussomerins 7–9 displayed significant growth inhibition against three endophytic fungi (*Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., and *Guignardia manguifera*) isolated from the same host plant and against four economically important phytopathogenic microorganisms (*Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, and *Alternaria solani*).²

As part of our systematic search for potential pesticide agents from *E. gomezpompae* and its morphological variants, the isolation, structure elucidation, and phytotoxic properties of additional naphthoquinone spiroketals were undertaken. It is important to point out that the morphological variants of *E. gomezpompae* have not been investigated previously. Four morphological variants were cultivated using fermentation in potato dextrose broth under static conditions. The phytotoxic effects of mycelia extracts and compounds were assessed on seed germination, root elongation, and seedling respiration of *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum*, and *Echinochloa crus-galli*. In addition, the effects on respiration in intact mitochondria isolated from spinach leaves were investigated.

■ MATERIALS AND METHODS

General Experimental Procedures. Melting points were measured in a Fisher–Johns apparatus and are uncorrected. The IR spectra were obtained using KBr disks on a Perkin-Elmer 599-B (Waltham, MA, USA) spectrophotometer. UV spectra were obtained

on a Shimadzu 160 UV (Shimadzu Scientific Instruments Inc., Columbia, MD, USA) spectrometer in MeOH solution. Optical rotations were taken on a JASCO DIP 360 (JASCO, Easton, MD, USA) polarimeter. NMR spectra including COSY, NOESY, HMBC, and HSQC experiments were recorded on a Bruker DMX500 (Bruker, Billerica, MA, USA), in CDCl₃, at either 500 (¹H) or 125 (¹³C) MHz, using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. EI mass spectra were performed using a Hewlett-Packard 5890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) mass spectrometer. X-ray analysis of compounds 2 and 3 was accomplished on a Bruker Smart apex diffractometer (Bruker) equipped with graphite-monochromated Mo K α radiation (λ = 0.71073 Å). Open column chromatography was on silica gel 60 (70–230 mesh, Merck, Rahway, NJ, USA). Analytical and preparative TLC separations were performed on precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck).

Fungal Material. The fungal strain of *E. gomezpompae* was isolated from surface-sterilized leaves of *C. acuminata* collected at the Ecological Reserve “El Eden”, Quintana Roo State, Mexico. A specimen of the plant was deposited at the University of California, Riverside, Herbarium (2641. L.M. Ortega-Torres). Cultures of the fungus were preserved by lyophilization in N₂. Subcultures were obtained in several culture media, such as potato dextrose agar (PDA), V8 agar, and others. Dried cultures of this fungus have been deposited at the J. H. Miller Mycological Herbarium (GAM) of the University of Georgia and in the fungus collection of Herbario Nacional de México (MEXU), UNAM, under accession numbers GAM 16175 and MEXU 25346, respectively.^{1,2}

Morphological variants of *E. gomezpompae* were obtained: C1c, C1e, C1e2a, and C1e2b. Figure 1 shows characteristic culture morphology of *E. gomezpompae* variants. It is noteworthy that the variants were stable and did not revert after >10 transfers.

Received: November 30, 2013

Revised: April 1, 2014

Accepted: April 1, 2014



Figure 1. Morphological variants of *Edenia gomezpompae*: (A) colony appearance on potato dextrose agar (PDA) after 14 days at 25 °C; (B) reverse of culture showing typical reddish-brown pigmentation.

Fermentations of Morphological Variants of *E. gomezpompae*. Each morphological variant of *E. gomezpompae* (C1c, C1e, C1e2a, and C1e2b) was cultured in Fernbach flasks (2800 mL), each containing 1200 mL of potato dextrose broth (PDB). Each flask was inoculated with three 1 cm² agar plugs taken from a stock culture of *E. gomezpompae* on PDA maintained at 28 °C. Flask cultures were incubated under static conditions at 28 °C and a 12:12 h light–dark photoperiod with a T12 30 W fluorescent light (Phillips, Chihuahua, Mexico) for 90 days.

Extraction of Phytotoxins Produced by *E. gomezpompae*. At the end of fermentation, whole broth was filtered through cheesecloth to separate the culture medium from the mycelium. The culture medium (Med) was subsequently extracted with CH₂Cl₂ (equal volume × 5) and EtOAc (equal volume × 5). Both organic phases were combined and filtered over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to yield 169 mg (C1c Med), 242 mg (C1e Med), 342 mg (C1e2a Med), and 149 mg (C1e2b Med) of a reddish solid. The mycelium (Myc) was macerated with 2 L of CH₂Cl₂ (× 5) and 2 L of EtOAc (× 5). The combined organic phases were filtered over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to yield 821 mg (C1c Myc), 979 mg (C1e Myc), 2086 mg (C1e2a Myc), and 1901 mg (C1e2b Myc) of a reddish solid.

Isolation of Phytotoxic Compounds from *E. gomezpompae*. The combined phytotoxic extracts of morphological variants from *E. gomezpompae* (~5 g) were subjected to column chromatography on silica gel (630 g) eluting with a gradient of *n*-hexane/CH₂Cl₂ (100:0 to 0:100) and CH₂Cl₂/MeOH (99.9:0.1 to 50:50). From this chromatography, 241 fractions (200 mL each) were obtained. Fifteen fractions, F-I–F-XV, were pooled according to TLC analysis.

Bioactivity in a Petri dish bioassay showed 10 active pools (FIII–FXII). From primary fractions V (313 mg) and VII (188 mg) eluted with low-polarity *n*-hexane/CH₂Cl₂ (6:4), the known palmarumycins CP₂ (6) and CP₁₇ (3) were isolated, respectively; then, they were purified by successive recrystallizations from CH₂Cl₂. The yields from this process included 128 mg of 6 and 31 mg of 3. From fraction VIII (365.5 mg) eluted with *n*-hexane/CH₂Cl₂ (2:8) was isolated preussomerin EG₁ (7). After exhaustive washing with an *n*-hexane/dichloromethane mixture (1:1), as well as recrystallization from CH₂Cl₂/MeOH (99:1), 75 mg of compound 7 was obtained. Active fraction IX (111.7 mg) eluted with 100% CH₂Cl₂ was purified by successive preparative TLC (CH₂Cl₂ × 2) to yield preussomerin EG₄ (4) (25.9 mg) and an additional 26 mg of 7. Fraction X (467 mg), eluted with CH₂Cl₂/MeOH (99:1), was chromatographed on a silica gel (135 g) column, eluting with a gradient of *n*-hexane/CH₂Cl₂

(50:50 to 0:100) and CH₂Cl₂/MeOH (99.9:0.1 to 50:50). Thirteen secondary fractions were obtained (F-XI–F-XI3). Fraction X-9 (140 mg), eluted with CH₂Cl₂/MeOH (99:1), was further resolved by extensive preparative TLC (*n*-hexane/acetone 80:20) to yield 6.8 mg of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (5), 24 mg of preussomerin EG₃ (9), 6 mg of palmarumycin EG₁ (1), and 16.6 mg of palmarumycin CP₁₉ (2). Primary fraction XI (870 mg), eluted with CH₂Cl₂/MeOH (98:2), was rechromatographed on a silica gel (149 g) column, eluting with a gradient of CH₂Cl₂/MeOH mixtures (99.9:0.1 to 50:50). Twelve secondary fractions were obtained (F-XII–F-XII2). From secondary fraction XI-5 (186 mg), eluted with CH₂Cl₂/MeOH (98:2), preussomerin EG₂ (8) (12.1 mg) spontaneously crystallized, and after successive recrystallizations from CH₂Cl₂/MeOH (9:1), 9.5 mg of preussomerin EG₂ (8) was obtained. Finally, extensive TLC (*n*-hexane/acetone 80:20 × 2) of fraction XI-2 (8.5 mg) yielded an additional 3.0 mg of palmarumycin CP₁₉ (2) (Figure 2).

Phytogrowth-Inhibitory Bioassays. The phytogrowth inhibitory activity of organic extracts from four morphological variants of *E. gomezpompae* and pure compounds was evaluated on seed germination, root elongation, and seedling respiration of two dicotyledonous species, *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae (amaranth)) and *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* (Solanaceae) (Italian tomato; pomodoro), and one monocotyledonous plant, *Echinochloa crus-galli*; Poaceae (barnyardgrass). Amaranth seeds were purchased at a local market in Tulyehualco in Mexico Federal District, and the tomato seeds were purchased at Semillas Berentsen, S.A. de C.V. in Celaya, Guanajuato State, whereas barnyardgrass seeds were collected from plants grown at the Instituto de Ecología (UNAM) greenhouse.

Bioassays to test the phytotoxic effects of the organic extracts of culture media and mycelia from morphological variants of *E. gomezpompae* on seedling growth were evaluated using a Petri dish bioassay.^{3,4} The pure compound and organic extracts were evaluated at 50, 100, and 200 μg/mL by dilution in agar (1%). Each treatment was added to sterile agar in 6 cm Petri dishes prior to its solidification (~40 °C). Pure agar (1%) was used as negative control and agar with Rival [glyphosate: *N*-(phosphonomethyl)glycine] (Monsanto, Sao Paulo, Brazil) at 50, 100, and 200 μg/mL as positive control. Thirty seeds of each test plant were sown directly onto the agar of each Petri dish following a complete randomized design with four replications per treatment. The number of seeds used for each experiment was selected so that appreciable change in O₂ uptake could be detected. Petri dishes were wrapped in Parafilm foil and randomly placed in a germination cabinet under conditions of darkness at 27 °C. Seed germination, root

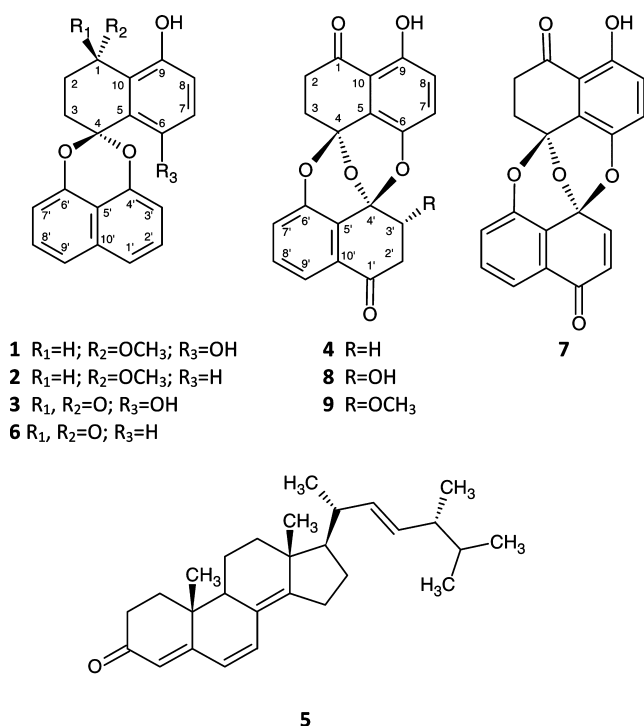


Figure 2. Structures of phytotoxic compounds isolated from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae*.

elongation, and seedling respiration were measured 24 h after treatment for *A. hypochondriacus*, 48 h after treatment for *E. crus-galli*, and 72 h after treatment for *S. lycopersicum*.³

Seed respiration was measured polarographically as oxygen uptake during the germination process with a Clark-type electrode connected to a YSI 5300A biological oxygen monitor. The seedlings were transferred into a glass chamber containing 4 mL of air-saturated deionized water at 27 °C. Oxygen uptake, in the presence of different concentrations of organic extracts and pure compounds, was measured during 3 min. The requirement for oxygen was plotted as a percentage of the control at 100%.⁴

Isolation of Intact Mitochondria. Mitochondria were obtained by employing a modification of the proposed protocol by Rödinger et al.⁵ One hundred and twenty grams of fresh green and turgid spinach leaves were washed with distilled water; then the central rib and the apex were removed. Afterward, they were fragmented into pieces and soaked in 200 mL of an extraction buffer (0.45 M sucrose, 15 mM MOPS, 1.5 mM EGTA, adjusting the pH to 7.4 with KOH and adding 0.6% PVP immediately prior to its use, 0.2% BSA, 10 mM DTT, and 0.2 mM PMSF). All of these were blended in a blender in five 5 s periods for each at maximal speed. Then, the homogenate was filtered through a six-layer cloth filter and centrifuged at 9000 rpm for 5 min. The pellet was discarded and the supernatant centrifuged at 16000 rpm for 10 min. The supernatant was again discarded, and the pellet that contained mitochondria was resuspended with a fine brush in 2 mL of washing buffer (0.3 M sucrose, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, adjusting the pH 7.2 with KOH and adding 0.2 M PMSF immediately prior to its use). Later, this suspension was placed in tubes containing Percoll concentration gradients. The gradient was previously prepared with 6 mL of 45, 25, and 5% of Percoll and 0.3 M sucrose buffer, 10 mM MOPS, pH 7.2, with KOH. The suspension was centrifuged for 45 min at 12800 rpm. Then, the intact mitochondria formed a plug, which was recovered on the 45% fraction of Percoll. This plug was added to 15 mL of resuspension buffer (0.3 M mannitol, 10 mM MOPS, 1 mM EDTA). The matrix was pH adjusted to 7.4 with KOH by adding 0.1% BSA immediately prior to its use and centrifuged during 15 min at 12800 rpm; finally, the pellet was resuspended in the buffer, and resuspension buffer was added in sufficient quantity to obtain 10 μg protein/ μL (about 6 mL). The entire isolation process

was carried out at 4 °C. Protein concentration was determined according to the method of Bradford.⁶

Once the mitochondria were isolated from the intact mitochondria suspension, 500 μL was transferred into a glass chamber. Oxygen consumption for the mitochondria at 27 °C was measured every 5 s for 3 min using a Clark-type electrode connected to a YSI 5300A biological oxygen monitor. The extracts were evaluated at 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the pure compounds were tested at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Only 2,4-dinitrophenol, used as positive control, was tested within the 10–800 μM concentration range. Linear regression analysis of the decreasing oxygen concentration in each extract or pure compound quantitatively determined oxygen consumption for the sample.

HPLC Analysis for Monitoring Secondary Metabolites Profile of the Extracts of Morphological Variants. HPLC analyses were performed on an Alliance 2695 system equipped with a model 2996 photodiode array detector (Waters, Milford, MA, USA). Analytical HPLC was performed using a reversed phase column (Atlantis C₁₈, 5 μm \times 150 mm \times 4.6 mm i.d.), at room temperature with a flow rate of 0.6–1 mL/min. The samples were filtered through a 0.4 μm nylon filter before HPLC analysis. Control of the equipment, data acquisition, and processing and management of chromatographic information were performed by the Empower 2.0 software program (Waters). The chromatograms were overlapped and colors added by using Gimp ver. 2.8.8 software, but no modifications were made in scale proportions.

Five milligrams of organic extracts from culture medium and mycelium of each morphological variant was taken and dissolved in 1 mL of acetonitrile. After filtering, they were analyzed by reversed phase HPLC using a gradient system starting with MeCN/H₂O, 80:20, to 100% MeCN for 0–30 min with a flow rate of 0.6 mL/min and maintaining this up to 40 min, with a flow rate of 1 mL/min. A known amount of an authentic pure sample of each compound was analyzed, and its retention time and peak size were determined. Retention times (t_R) of preussomerin and palmarumycin peaks were detected at wavelengths of 225 nm: 8 (t_R 13.9 min), 1 (t_R 17.4 min), 9 (t_R 18.0 min), 4 (t_R 18.6 min), 7 (t_R 19.5 min), 2, 3 (t_R 20.1 min), and 6 (t_R 23.3 min).

Statistical Analysis. Experimental results concerning the effect of culture media and the mycelia extracts from morphological variants of *E. gomezpompae* and pure compounds on phyto-growth inhibitory activity and intact mitochondrial oxygen consumption were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey statistical tests⁷ utilizing GraphPad Prism ver. 5.01 statistical computer software (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). The IC₅₀ value (50% inhibitory concentration) for each activity was calculated by Probit analysis⁸ based on the average percentage of inhibition obtained at each concentration of the different treatments. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD). A *P* value of ≤ 0.05 (*) was employed to indicate statistical significance.

Palmarumycin EG₁ (1). Colorless solid powder, mp 230 °C (decomp); $[\alpha]_D^{25} = -14$ (c 0.1, CHCl₃); UV λ_{max} (log ϵ) 328.5 (3.3), 325.5 (3.13), 314.5 (3.46), 310.6 (3.42), 300.5 (3.58), 296 (3.54), 288 (3.58), 255 (2.82), 226.5 (4.38), 212.6 (4.16); IR t_{max} (KBr) 3453, 3063, 1608, 1468, 1409, 1376, 1264, 1053 cm^{-1} ; ¹H and ¹³C NMR, see Table 2; EIMS m/z 350 [M^+ (19)], 318 (100), 301 (7), 300 (7), 273 (7), 175 (7), 160 (24), 144 (7), 131 (8), 115 (5); HRMS m/z 350.11540 (calcd for C₂₁H₁₈O₅, 350.11542).

Preussomerin EG₄ (4). Yellowish amorphous solid, mp 242.1–246.0 °C; UV λ_{max} (log ϵ) 360 (3.65), 332 (3.47), 315 (3.56), 281 (3.12), 258 (4.17), 243.5 (4.01), 220 (4.48) nm; IR t_{max} (KBr) 3434, 3085, 1690, 1642, 1593, 1473, 1365, 1331, 1291, 1230 cm^{-1} ; ¹H and ¹³C NMR, see Table 3; ESIMS m/z 350 [M^+ (100)], 332 (7), 305 (4), 192 (9), 176 (82), 174 (34), 175 (19), 147 (8), 120 (4), 91 (4), 77 (4), 55 (5); HRMS m/z 350.0788 (calcd for C₂₀H₁₄O₆, 350.0790).

X-ray Crystallographic Analysis of Palmarumycins CP₁₉ (2) and CP₁₇ (3). Colorless crystals of dimension 0.36 \times 0.18 \times 0.2 mm and yellow prisms of dimension 0.30 \times 0.20 \times 0.20 mm were obtained from slow evaporation of CH₂Cl₂ solution, for CP₁₉ (2) and CP₁₇ (3), with empirical formulas C₂₁H₁₈O₅ and C₂₀H₁₄O₅ and *M_r* = 334.35 and *M_r* = 334.31, respectively. CP₁₉ (2) crystallized in monoclinic P2₁ (no.

4) and CP₁₇ (3) crystallized in triclinic system, P-1 (no. 2). The cell dimensions for CP₁₉ (2) were $a = 12.927(3) \text{ \AA}$, $b = 7.925(2) \text{ \AA}$, $c = 17.046(4) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 109.883(3)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 1642.2(7) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $D_{\text{calcd}} = 1.352 \text{ Mg/m}^3$, $m\mu = 0.093 \text{ mm}^{-1}$, and $F(000) = 704$, and those for CP₁₇ (3) were $a = 8.5101(6) \text{ \AA}$, $b = 12.8482(9) \text{ \AA}$, $c = 15.1746(10) \text{ \AA}$, $\alpha = 66.0760(10)^\circ$, $\beta = 83.5180(10)^\circ$, $\gamma = 89.6990(10)^\circ$, $V = 1505.44(18) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $D_{\text{calcd}} = 1.475 \text{ Mg/m}^3$, $m\mu = 0.107 \text{ mm}^{-1}$, and $F(000) = 696$. Temperature = 298(2) K. Both compounds were irradiated with Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) on the Bruker Smart APEX diffractometer with AXS CCD area detector using a SMART program.¹⁷ The data reduction was performed with the SAINT program.⁹ Totals of 12965 and 12393 reflections were collected, of which 6016 ($R_{\text{int}} = 0.0644$) and 5289 ($R_{\text{int}} = 0.0324$) were independent, respectively. The structures were solved by direct methods and refined using full-matrix least-squares on F^2 using the programs SHELXS¹⁰ and SHELXL,¹⁰ respectively. The ORTEP-3¹¹ program was used to prepare the figures. Two crystallographic independent molecules were found in the unit cell in both compounds. The final values $S = 0.846$, $R_1 = 0.545$ and $wR_2 = 0.0884$ were based on 3304 reflections observed, 459 parameters for CP₁₉ (2), and $S = 0.865$, $R_1 = 0.0362$, and $wR_2 = 0.0728$ were based on 5289 reflections observed, 463 parameters for CP₁₇ (3). The largest different peak and hole were 0.400 and $-0.148 \text{ e \AA}^{-3}$ and 0.147 and $-0.162 \text{ e \AA}^{-3}$, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological Variants of *E. gomezpompae*. The endophytic fungus *E. gomezpompae* was obtained from the leaves of *C. acuminata* collected at the Ecological Reserve "Eden"; four isolates of this species corresponding to strains C1c, C1e, C1e2a, and C1e2b were obtained. The differences in macroscopic characteristics exhibited by these strains were significant (Figure 1). However, microscopic characteristics and molecular studies revealed they were from the same species;¹ therefore, they were morphological variants of *E. gomezpompae* (isolate C1c). The morphological characteristics of microorganisms can be affected during antagonistic interspecific interactions due to their phenotypic plasticity, that is, the ability of a single genotype to produce more than one alternative form of morphology, physiological state, and/or behavior in response to environmental conditions.¹² Therefore, it is important to study whether the biological activity is modified by the morphological variants of the fungus, particularly because many secondary metabolites of fungal origin are of economic value due to their many and diverse biological activities.

In this context, we investigated the phytotoxic properties of the culture media and mycelia organic extracts of four morphological variants of *E. gomezpompae* as well as those of their pure compounds. The strains were grown under static conditions on PDB. In these conditions the mycelia of the fungi were developed better. The culture media and the mycelia were extracted with CH_2Cl_2 and EtOAc. The initial phytotoxic activity of the resulting extracts was evaluated on seed germination, root elongation, and seedling respiration of *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum*, and *E. crus-galli* using a Petri dish bioassay. According to the results summarized in Table 1, all extracts inhibited seed germination, root elongation, and seedling respiration of the three target species in a concentration-dependent manner (data not shown). The extracts from culture media were more phytotoxic than the mycelia extracts, showing IC₅₀ values of $<200 \mu\text{g/mL}$. The extracts of morphological variant C1c showed the highest phytotoxic potential.

Isolation of Phytotoxic Compounds Produced by *E. gomezpompae*. TLC and HPLC chromatograms of the

Table 1. Phytogrowth-Inhibitory Activity of the Organic Extract from Morphological Variants of *Edenia gomezpompae* on the Germination, Root Elongation, and Seedling Respiration of *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum*, and *Echinochloa crus-galli*

organic extract ^a	seed	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		
		germination	root growth	respiration
C1c Myc	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	128.7	53	96.8
	<i>E. crus-galli</i>	112.5	197.8	66.9
C1c Med	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	82.5	161.5
	<i>S. lycopersicum</i>	194.5	109.9	147.3
	<i>E. crus-galli</i>	>200	15.1	56.9
C1e Myc	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	>200	>200
	<i>E. crus-galli</i>	>200	>200	>200
C1e Med	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	112.2	147.9
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	173.5	152.3
	<i>E. crus-galli</i>	143.8	88.67	55.9
C1e2a Myc	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	>200	>200
	<i>E. crus-galli</i>	>200	>200	>200
C1e2a Med	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	>200	>200
	<i>E. crus-galli</i>	>200	>200	>200
C1e2b Myc	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	>200	>200
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	>200	139.1
	<i>E. crus-galli</i>	>200	>200	>200
C1e2b Med	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	127.7	132.5
	<i>S. lycopersicum</i>	144.1	131.8	>200
	<i>E. crus-galli</i>	187.2	198.2	197.8
Rival	<i>A. hypochondriacus</i>	>200	115.5	114.1
	<i>S. lycopersicum</i>	>200	105.7	83.5
	<i>E. crus-galli</i>	>200	94.9	84.9

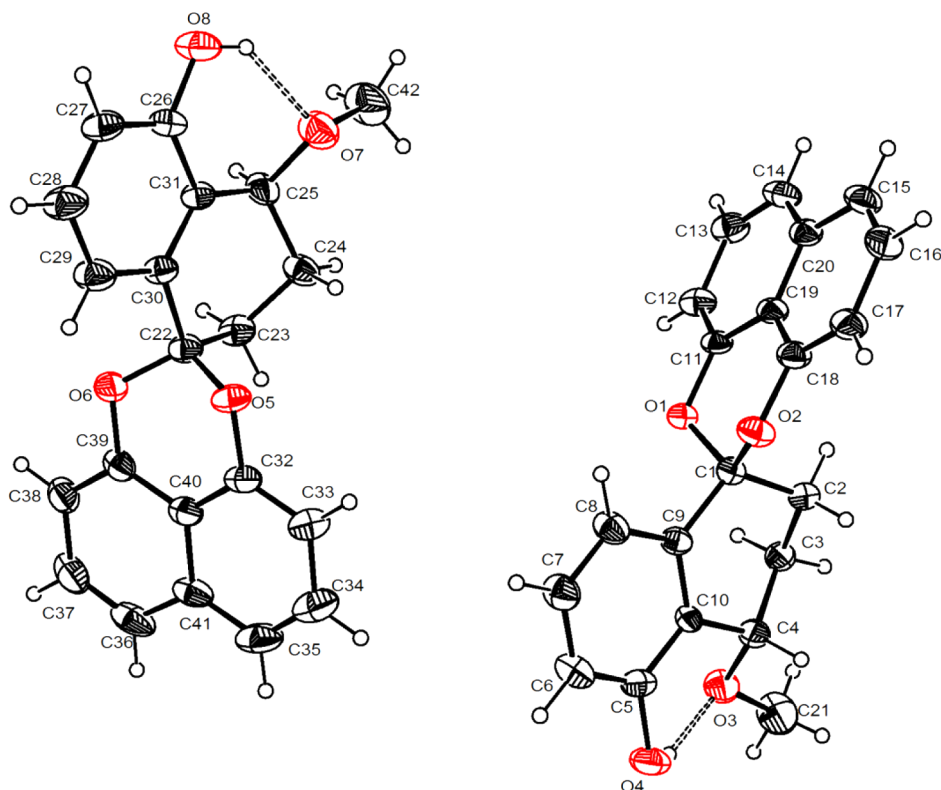
^aRival = glyphosate, *N*-(phosphonomethyl) glycine (positive control); Med, culture medium; Myc, mycelium.

morphological variant extracts exhibited similar profiles. Therefore, the extracts were combined and fractionated by column chromatography for chemical analysis. This process led to the isolation of compounds 1–9, including two new naphthoquinone spiroketals, namely, palmarumycin EG₁ (1) and a preussomerin EG₄ (4), which were characterized by extensive spectroscopic methods. In addition, known preussomerins EG₁–EG₃ (7–9) and palmarumycins CP₁₉ (2), CP₁₇ (3), and CP₂ (6) and the ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (5) were obtained (Figure 2). Compounds 2, 3, and 5 are new to this species. Compounds 6–9 were identified by comparison with authentic samples;² compounds 2,² 3,^{13,14} and 5^{15,16} were identified from their IR and ¹H NMR spectroscopic data. These were identical to those previously described in the literature.

Structural Elucidation of Compounds 1 and 4. Palmarumycin EG₁ (1). The molecular formula was established

Table 2. NMR Spectroscopic Data for Palmarumycin EG₁ (1) (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

position	δ_C	DEPT mult	δ_H (mult, J in Hz)	HMBC H→C	NOESY
1	75.5	CH	4.85 (1H, pseudo t dd, 6.0, 7.5)	C-2, -3, -5, -9, -10, OCH ₃	3, 2a, CH ₃ O-1, OH-9
2	27.2	CH ₂	1.98 m 2.42 m	C-1, -3, -4, C-1, -3, -4, -10	2b, 3 2a, 3
3	22.5	CH ₂	2.13 m	C-1, -2, -4, -5	1, 2a, 2b, CH ₃ O-1
4	102.5	C			
5	122.1	C			
6	149.5	C			
7	119.2	CH	6.94 (1H, d, 9.0)	C-6, -9, -10	
8	120.0	CH	6.96 (1H, d, 9.0)	C-6, -9, -10	
9	149.4	C			
10	119.5	C			
1'	121.2	CH	7.56 (1H, dd, 1.0, 7.5)	C-3', -4', -5', -10'	2', 3'
2'	127.5	CH	7.46 (1H, dd, 7.5, 7.5)	C-3', -4', -10'	1', 3'
3'	110.4	CH	7.00 (1H, dd, 1.0, 7.5)	C-1', -4', -5'	2', 1'
4'	146.5	C			
5'	113.8	C			
6'	147.1	C			
7'	110.5	CH	7.02 (1H, dd, 1.0, 7.5)	C-5', -6', -9'	8', 9'
8'	127.6	CH	7.47 (1H, dd, 7.5, 8.5)	C-6', -7', -10'	7', 9'
9'	121.6	CH	7.57 (1H, dd, 1.0, 8.5)	C-5', -6', -7', -10'	8', 7'
10'	134.2	C			
OH-6			7.57 (1H, s)	C-6, -7	
OH-9			7.03 (1H, s)	C-8, -9	1, CH ₃ O-1
CH ₃ O-1	54.2	CH ₃	3.48 (3H, s)	C-1	1, 3, OH-9

Figure 3. X-ray crystal structure of palmarumycin CP₁₉ (2).

as C₂₁H₁₈O₅ (13 unsaturations) by HRMS. The IR spectrum displayed the absorption bands indicative of the presence of hydroxyl (3453 cm⁻¹) and aromatic groups (1608 cm⁻¹). ¹H and ¹³C NMR spectra suggested that the molecule was a deoxypreussomerin type of compound related to palmarumycin CP₁₉ (2). The 1,8-dihydroxynaphthalene ring system and the

substitution pattern in the nonaromatic ring in both molecules were identical, but the third aromatic ring was different. Thus, the two exchangeable singlets D₂O at δ 7.57 (OH-6) and 7.03 (OH-9), plus the AB-spin system at δ 6.94 (d, J = 9.0 Hz; H-7) and 6.96 (d, J = 9.0 Hz; H-8) in the ¹H NMR spectrum indicated the presence of a *p*-hydroquinone fragment in the

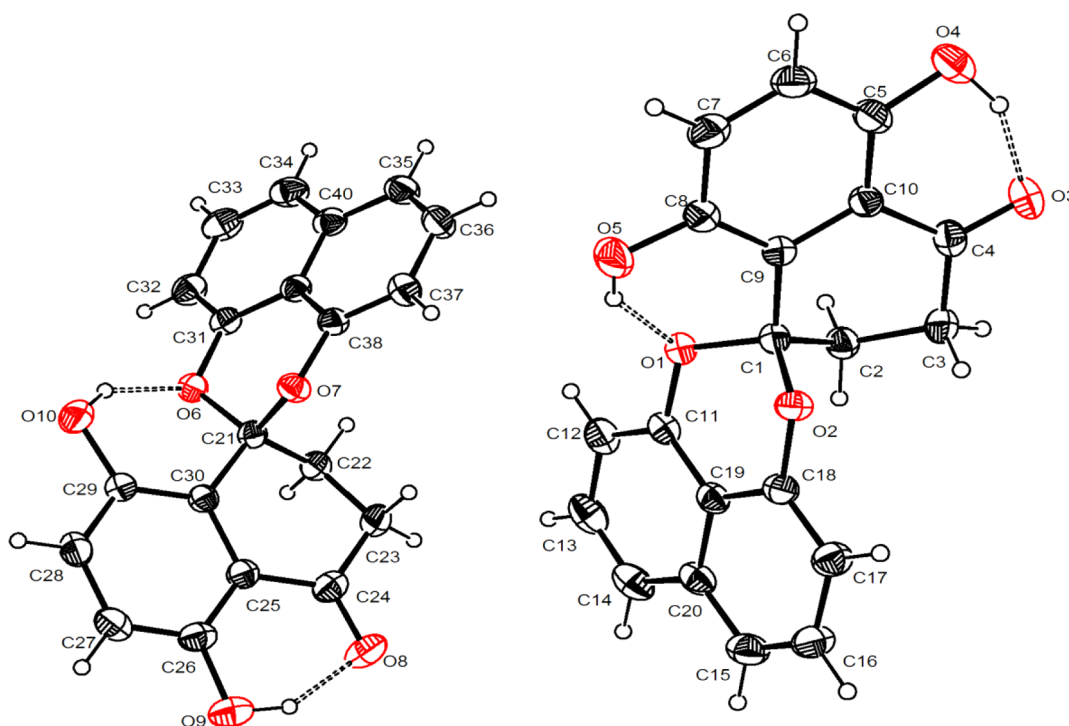


Figure 4. X-ray crystal structure of palmarumycin CP₁₇ (3).

Table 3. NMR Spectroscopic Data for Preussomerin EG₄ (4) (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

position	δ_c	mult DEPT	δ_H (mult, J in Hz)	HMBC H \rightarrow C	NOESY
1	202.2	C			
2a	33.7	CH ₂	2.90 (1H, ddd, 19.5, 5.5, 2.0)	C-1, -3, -4, -10	2b, 3a, 3b
2b			3.36 (1H, ddd, 19.5, 13.5, 5.5)	C-1, -3, -4	2a, 3a, 3b
3a	32.7	CH ₂	2.50 (1H, ddd, 13.5, 13.5, 5.5)	C-1, -2, -4, -5, -6, -6'	2a, 2b, 3b,
3b			2.71 (1H, ddd, 13.5, 5.5, 2.0)		2a, 2b, 3a
4	93.3	C			
5	120.0	C			
6	141.4	C			
7	126.0	CH	7.03 (1H, d, 9.5)	C-4, -5, -6, -9, -10	8
8	120.6	CH	6.91 (1H, d, 9.5)	C-5, -6, -7, -9, -10	7, OH-9
9	157.2	C			
10	113.0	C			
1'	195.8	C			
2a'	33.8	CH ₂	2.86 (1H, ddd, 19.0, 5.5, 2.0)	C-1', -3', -4', -10'	2b', 3a', 3b'
2b'			3.28 (1H, ddd, 19.0, 13.5, 5.5)	C-1', -3', -4'	2a', 3a', 3b'
3a'	32.8	CH ₂	2.46 (1H, ddd, 13.5, 13.5, 5.5)	C-1', -2', -4', -5', -6, -6'	2a', 2b', 3b'
3b'			2.74 (1H, ddd, 13.5, 5.5, 2.0)	C-1', -2', -4', -5', -6, -6'	2a', 2b', 3a'
4'	93.3	C			
5'	122.5	C			
6'	149.4	C			
7'	120.5	CH	7.62 (1H, dd, 1.0, 8.0)	C-4', -5', -6', -8', -9', -10'	8', 9
8'	130.8	CH	7.39 (1H, dd, 8.0, 8.0)	C-5', -6', -7', -9', -10'	7', 9'
9'	121.4	CH	7.07 (1H, dd, 1.0, 8.0)	C-4', -5', -6', -7', -8', -10'	8', 7'
10'	130.9	C			
OH-9			11.69 (1H, s)	C-1, -7, -8, -9, -10	8

molecule. Signals at δ 149.5 and 149.4 in the ¹³C NMR confirmed this assignment. Furthermore, the correlations observed in the NOESY and HMBC spectra supported the presence of the hydroxyl groups at C-6 and C-9 of the palmarumycin skeleton (Table 2). The signals and coupling pattern in the ¹H NMR spectrum for the oxymethine (δ 4.85, H-1, pseudo-t dd, J = 6.0, 7.5 Hz) and methoxy groups (s, δ_H

3.48) were similar to those of palmarumycin CP₁₉ (2), suggesting that 1 was its 6-hydroxy analogue; the HMBC and ¹H–¹H NOESY data (Table 2), as well as the mass fragments at m/z 318 and 160 were assignable to hydrobenzoquinone and 1,8-dihydroxynaphthalene subunits, respectively, were consistent with this structural proposal. Finally the negative value of

the specific optical rotation led us to propose the same *S* absolute configuration at C-1 as for 2.^{14,17,18}

Palmarumycins CP₁₉ (2) and CP₁₇ (3) were previously described by Martínez-Luis et al. as new metabolites from *Edenia* sp. obtained from the leaves of *Petrea volubilis* L.¹⁴ The spectroscopic and spectrometric properties of both compounds were identical to those reported. In the present study, however, we confirmed the structural assignments of 2 and 3 by single-crystal diffraction X-ray analysis (Figures 3 and 4).

Preussomerin EG₄ (4). Mass spectrometric analysis of preussomerin EG₄ (4) gave a molecular ion at *m/z* 350 (C₂₀H₁₄O₆, 14 unsaturations), thus differing from preussomerin EG₁ (7) by 2 mass units. The infrared spectrum of 4 showed absorption bands for a conjugated carbonyl at 1642 cm⁻¹. As with compound 7, the NMR spectrum contained resonances for 1,2,3-trisubstituted and 1,2,3,4-tetrasubstituted aromatic rings. The most obvious differences in the spectra (Table 3) were the absence of the two vinyl signals (δ_C/δ_H 133.27/6.56 and 141.24/7.17) for the *cis*-olefinic nuclei of preussomerin EG₁ (7).² Instead, the ¹H NMR spectrum of 4 displayed four self-coupled aliphatic protons in the upfield region of the spectrum between δ 2.50 (H-2') and 3.36 (H-3'), which were correlated with the signals at δ 33.8 and 32.8, respectively, in the HSQC experiment. Two conjugated carbonyls appearing at δ_C 195.8 and 202.2 were also detected in the ¹³C NMR spectrum, which were assigned to C-1' and C-1, respectively, on the basis of the observed HMBC correlations (Table 3). The other HMBC and NOESY correlations summarized in Table 3, as well as the mass fragments at *m/z* 174, 175, and 176 observed in the MS spectrum, were in agreement with structure 4 for the new natural product,¹⁹ which was given the common name of preussomerin EG₄.

Phytogrowth-Inhibitory Activity of the Natural Compounds. Natural products 2–9 were evaluated for their ability to inhibit the seed germination, root elongation, and seedling respiration of *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum*, and *E. crus-galli*. Figure 5 depicts the phytotoxic effect of the isolate compounds at 100 μ g/mL. The results are expressed as inhibition percentages. In general, the compounds tested exhibited a significant phytotoxic effect and were more potent as germination and root elongation inhibitors than as seedling respiration inhibitors (Figure 5). All eight compounds reduced the germination of the three target species. Compounds 4 and 7–9 at 100 μ g/mL inhibited germination by >50%, being more potent than the positive control Rival (glyphosate) (Figure 5A). Compounds 2, 8, and 9 were more active as root elongation inhibitors (>50%) of *A. hypochondriacus* and *E. crus-galli*. Only compound 8 significantly inhibited (>50%) the root elongation of three species (Figure 5B). On the other hand, the compounds tested also significantly inhibited the seedling respiration of *S. lycopersicum*. The phytotoxic activity was comparable to that of the positive control. Only compound 2 significantly inhibited the oxygen consumption of three seedlings, and compounds 4 and 7 also significantly inhibited the seedling respiration of *S. lycopersicum* and *E. crus-galli* (Figure 5C). In summary, all compounds inhibited seed germination, root elongation, and seedling respiration of the three target species in a concentration-dependent manner. Table 4 summarizes the phytotoxic effect of the isolate compounds expressed as IC₅₀ values. The IC₅₀ values confirm that, in general, compounds 2–9 were more potent as germination and root elongation inhibitors than as seedling respiration inhibitors.

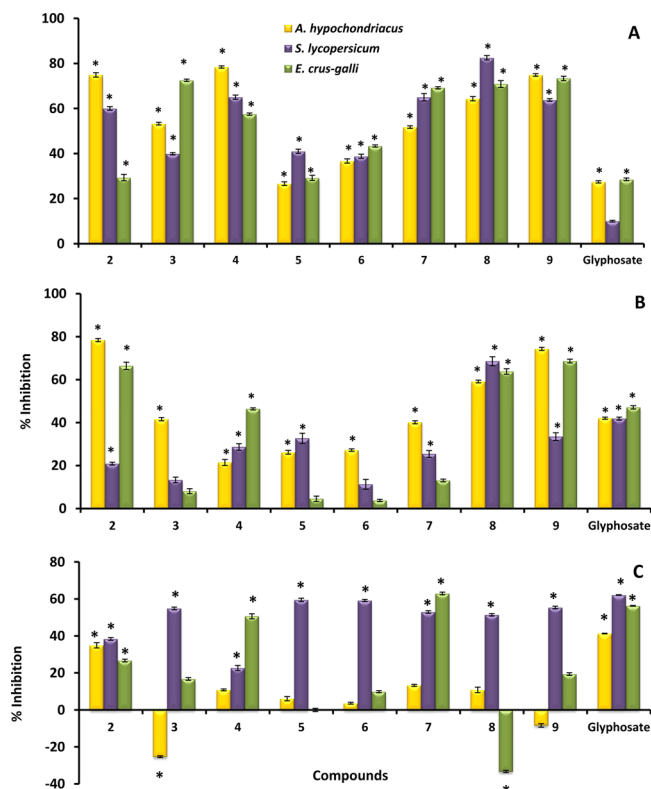


Figure 5. Phytotoxic effect of bioactive compounds (100 μ g/mL) isolated from endophytic fungus *Edenia gomezpompae* on (A) seed germination, (B) root elongation, and (C) seedling respiration of *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum*, and *Echinochloa crus-galli*. Palmarumycins CP₁₉ (2) and CP₁₇ (3), preussomerin EG₄ (4), ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (5), palmarumycin CP₂ (6), and preussomerins EG₁ (7), EG (8), and EG₃ (9). A positive value represents inhibition; a negative value represents stimulation. Vertical bars represent SD, *n* = 4; (*)*P* < 0.05.

Mitochondrial Oxygen Consumption. In an attempt to discover potential herbicidal agents with an effect on respiration, the phytotoxic extracts from morphological variants of *E. gomezpompae* and pure compounds were further evaluated for their capacity to inhibit mitochondrial respiration in intact mitochondria isolated from spinach. In general, the extracts demonstrated significant inhibition in the mitochondrial respiratory chain at the highest test concentration of 200 μ g/mL (Figure 6). However, the inhibitory effect was low. Both organic extracts of morphological variant C1e2a and the mycelium extracts of morphological variants C1e were most active on mitochondrial respiration, inhibiting its activity by approximately 40%. It is noteworthy that extracts of morphological variant C1e2a were the least phytotoxic on the three plants tested (IC₅₀ values of >200 μ g/mL); however, these were the extracts with the greatest effect on mitochondrial oxygen consumption, indicating the presence of the phytotoxic compounds.

Furthermore, oxygen consumption in intact mitochondria was significantly inhibited by compounds 2–9; however the effect was lower than that of the positive control. In general, preussomerins were more active than palmarumycins. Preussomerins EG₄ (4) and EG₁ (7) and palmarumycins CP₁₇ (3) and CP₂ (6) were more active, inhibiting 34, 26, 17, and 26%, respectively (Figure 6).

Table 4. Phytogrowth-Inhibitory Activity of Isolated Compounds from *Edenia gomezpompae* on the Germination, Root Elongation, and Seedling Respiration of *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum*, and *Echinochloa crus-galli*

compd ^a	seed	IC ₅₀ (μM)		
		germination	root growth	seedling respiration
2	<i>A. hypochondriacus</i>	194.0	180.8	416.5
	<i>S. lycopersicum</i>	240.4	>598.8	378.7
	<i>E. crus-galli</i>	516.2	213.5	531.7
3	<i>A. hypochondriacus</i>	272.1	342.5	594.6
	<i>S. lycopersicum</i>	378.4	>598.8	238.0
	<i>E. crus-galli</i>	206.6	471.3	>598.8
4	<i>A. hypochondriacus</i>	179.4	330.6	>571.4
	<i>S. lycopersicum</i>	214.6	478.0	>571.4
	<i>E. crus-galli</i>	237.1	279.1	264.9
5	<i>A. hypochondriacus</i>	466.0	465.1	>510.2
	<i>S. lycopersicum</i>	429.6	337.2	204.3
	<i>E. crus-galli</i>	285.7	276.0	>510.2
6	<i>A. hypochondriacus</i>	397.2	562.0	>628.9
	<i>S. lycopersicum</i>	347.2	>628.9	272.0
	<i>E. crus-galli</i>	380.5	>628.9	>628.9
7	<i>A. hypochondriacus</i>	271.8	300.0	>574.7
	<i>S. lycopersicum</i>	216.1	534.8	277.3
	<i>E. crus-galli</i>	207.8	>574.7	216.9
8	<i>A. hypochondriacus</i>	208.2	225.7	>546.5
	<i>S. lycopersicum</i>	168.6	199.7	259.0
	<i>E. crus-galli</i>	183.3	214.2	>546.5
9	<i>A. hypochondriacus</i>	170.5	166.6	>526.3
	<i>S. lycopersicum</i>	198.4	355.8	240.5
	<i>E. crus-galli</i>	182.1	195.8	>526.3
Rival	<i>A. hypochondriacus</i>	>1183.4	683.4	675.1
	<i>S. lycopersicum</i>	>1183.4	625.4	494.1
	<i>E. crus-galli</i>	>1183.4	561.5	502.4

^aRival = glyphosate, *N*-(phosphonomethyl) glycine (positive control).

HPLC Analysis of Secondary Metabolites Production from Extracts of Morphological Variants. Preussomerin and palmarumycin contents in morphological variants of *E. gomezpompae* were analyzed by HPLC (Figure 7). The chromatographic profiles showed that the four variants showed differences in the concentration of the major components (Table 5). These results could be due to the phenotypic plasticity of *E. gomezpompae*; accordingly, each phenotype, with different morphology and different biological activity, exhibited also important differences in chemical compound production.

The highest activity on mitochondrial respiration of culture broth extracts of morphological variants C1e and C1e2a could be associated with the presence of many peaks in the chromatographic region from 0 to 7 min, which should be further investigated. On the other hand, the highest activity against seed germination, root elongation, and seedling respiration of C1c, C1e, and C1e2b culture media extracts

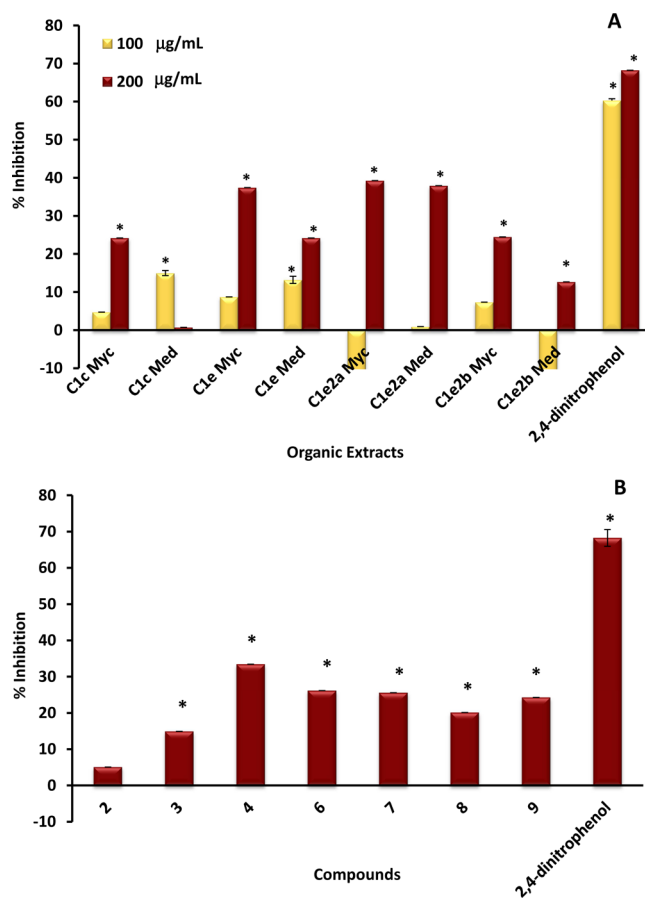


Figure 6. Inhibitory activity of the organic extract (100 and 200 μg/mL) from (A) morphological variants of *Edenia gomezpompae* and (B) phytotoxic compounds (200 μg/mL) on mitochondrial oxygen consumption on intact mitochondria isolated from spinach. Palmarumycins CP₁₉ (2) and CP₁₇ (3), preussomerin EG₄ (4), palmarumycin CP₂ (6), and preussomerins EG₁ (7), EG (8), and EG₃ (9). A positive value represents inhibition; a negative value represents stimulation. Vertical bars represent SD, *n* = 4; (*) *P* < 0.05.

can be associated with the presence in high amounts of preussomerin EG₃ (8), and the highest inhibitory activity of C1c of mycelium extracts was associated with the highest abundance of palmarumycin CP₂ (6)

Because all components detected in each variant were active, they are of possible benefit for the plant species hosting the fungus in its natural habit. The endophytic fungi generally exist harmlessly within their host, but under different conditions they could be facultative pathogens.²⁰ On the other hand, the secondary metabolites produced by endophytic fungi play a role in vivo and are important for numerous metabolic interactions between fungi and their plant hosts, such as signaling and regulation of the symbiosis.^{21,22} Some may also serve in the overall biology of the plant, especially as it relates to insects and disease, as well as other environmental stresses including drought tolerance.^{23–25} One of the important roles of endophytic fungi is to initiate the biological degradation of dead or dying plant hosts, which is necessary for nutrient recycling.²⁶ As a result, it is possible that the phytotoxins produced by *E. gomezpompae* are involved in the role in plant host defense and/or in the biological degradation of dead or dying plant hosts.

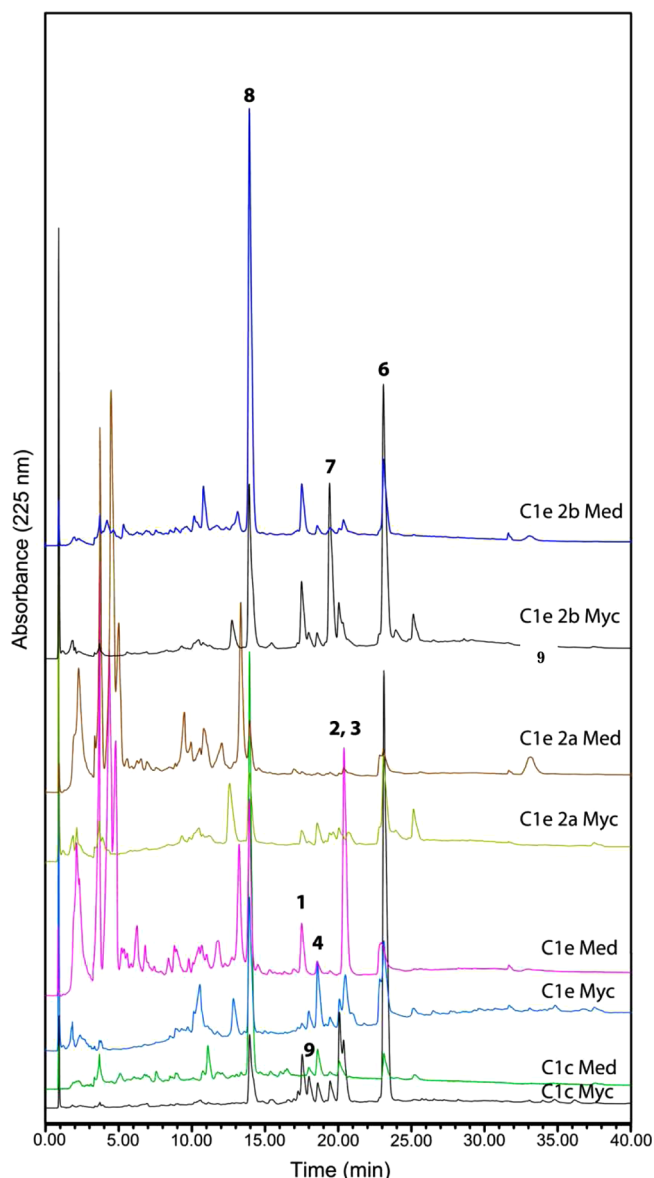


Figure 7. HPLC profiles of preussomerins and palmarumycins present in organic extract from morphological variants of *E. gomezpompae* in static liquid culture fermentation at 225 nm. Palmarumycins EG₁ (1), CP₁₉ (2), and CP₁₇ (3), preussomerin EG₄ (4), palmarumycin CP₂ (6), and preussomerins EG₁ (7), EG (8), and EG₃ (9).

Table 5. HPLC Analysis of Preussomerins and Palmarumycins Present in Organic Extract from Morphological Variants of *E. gomezpompae*

morphological variant ^a	comps detected	major comps (% area)
C1c Myc	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	6 (54.6), 3 (9.1), 8 (8.6), 1 (7.3)
C1c Med	1, 3, 4, 6, 7, 8, 9	8 (62.4), 6 (8.7), 3 (8.5)
C1e Myc	2, 3, 4, 6, 8	8 (29.8), 6 (25.6), 4 (16.0)
C1e Med	1, 3, 4, 6, 8	3 (38.8), 8 (22.9), 1 (8.3)
C1e2a Myc	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	8 (20.4), 6 (32.3)
C1e2a Med	6, 8	8 (14), 6 (12)
C1e2b Myc	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	6 (32.4), 8 (20.1), 7 (19.6), 1 (7.3)
C1e2b Med	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	8 (63.2), 6 (14.5), 1 (8.6)

^aMed, culture medium; Myc, mycelium.

In summary, naphthoquinone spiroketals 2–8 biosynthesized by four morphological variants of *E. gomezpompae* possess phytotoxic properties against seed germination, root elongation, and seedling respiration of two dicotyledon species, *A. hypochondriacus* and *S. lycopersicum*, and one monocotyledon plant, *E. crus-galli*, and a slight effect on the respiration of intact mitochondria. According to these results, further studies will be carried out to better understand the mechanism of action associated with the phytotoxic effects of the organic extracts and selected phytotoxins produced by *E. gomezpompae*. In particular, preussomerins EG₄ (4) and EG₁ (7) and palmarumycins CP₁₇ (3) and CP₂ (6) will be considered for exploration in the immediate future on the basis of their inhibitory effect on oxygen consumption in intact mitochondria.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Bioassays to test the phytotoxic effects of isolated compounds from morphological variants of *E. gomezpompae* on the germination, root elongation, and seedling respiration of *A. hypochondriacus*, *S. lycopersicum*, and *E. crus-galli* were evaluated at 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>. Crystallographic data for palmarumycins CP₁₉ (2) and CP₁₇ (3) reported in this paper have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) as supplementary publications CCDC 967944 and CCDC 96794, respectively. Copies of the data can be obtained, free of charge, from http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(M.L.M.-R.) Phone: + 52 (55) 56 22 44 32. Fax: + 52 (55) 56 16 22 17. E-mail: mlmacias@unam.mx, mamaciasr@gmail.com.

Funding

This work was supported by Grants CONACyT 81017 and 179194.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Ana Luisa Anaya Lang and Q.A. Blanca Estela Hernández-Bautista from Instituto de Ecología, UNAM, for their valuable support during the development of this research. We are also grateful to Beatriz Quiroz, Héctor Ríos, Elizabeth Huerta, Ma. de los Ángeles Peña, Isabel Chávez, Luis Velasco-Ibarra, Javier Pérez Flores, and Rocío Patiño from Instituto de Química, UNAM, for recording NMR, MS IR, and UV spectra. We are also grateful to Carmen Loyola from Instituto de Biología, UNAM, for her valuable help with the photographic work and to Jordi Muria González for his help in HPLC analyses.

■ REFERENCES

- (1) González, M. C.; Anaya, A. L.; Glenn, A. E.; Saucedo-García, A.; Macías-Rubalcava, M. L.; Hanlin, R. T. A new endophytic ascomycete from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. *Mycotaxon* **2007**, *101*, 251–260.
- (2) Macías-Rubalcava, M. L.; Hernández-Bautista, B. E.; Jiménez-Estrada, M.; González-Villaseñor, M. C.; Glenn, A. E.; Hanlin, R. T.; Saucedo-García, A.; Muria-González, J. M.; Hernández-Ortega, S.; Anaya, A. L. Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity

from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1185–1196.

(3) Macías-Rubalcava, M. L.; Hernández-Bautista, B. E.; Oropeza, F.; Duarte, G.; González, C.; Glenn, A. E.; Hanlin, R. T.; Anaya, A. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36*, 1122–1131.

(4) Céspedes, C. L.; Calderón, J. S.; Salazar, J. R.; Lotina-Hennsen, B.; Segura, R. Plantgrowth inhibitory activity of cedrelanolide from *Cedrela salvadorensis*. *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27*, 137–149.

(5) Rödiger, A.; Baudisch, B.; Klösgen, R. B. Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *J. Plant Physiol.* **2009**, *167*, 620–624.

(6) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *7*, 248–254.

(7) Mead, R.; Curnow, R. N.; Hasted, A. M. Statistical methods. In *Agriculture and Experimental Biology*, 3rd ed.; Chapman and Hall, CRC: Boca Raton, FL, USA, 2002.

(8) Zar, J. H. *Biostatistical Analysis*; Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, USA, 2007.

(9) Bruker. *SAINT & SMART Program*; Bruker AXS Inc.: Madison, WI, USA, 2007.

(10) Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr.* **2008**, *A64*, 112–122.

(11) Farrugia, L. J. ORTEP-3. *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 849–854.

(12) West-Eberhard, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **1989**, *20*, 249–278.

(13) Martínez-Luis, S.; Della-Togna, G.; Coley, P. D.; Kursar, T. A.; Gerwick, W. H.; Cubilla-Rios, L. Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 2011–2014.

(14) Martínez-Luis, S.; Cherigo, L.; Spadafora, C.; Gerwick, W. H.; Cubilla-Rios, L. Additional anti-leishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *Rev. Latinoam. Quim.* **2009**, *37*, 104–114.

(15) Tanaka, N.; Hosoi, K. I.; Tanaka, D.; Takahashi, M. Photochemical reaction of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 843–846.

(16) Lee, W. Y.; Park, Y.; Anh, J. K.; Park, S. Y.; Lee, H. J. Cytotoxic activity of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from the sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26*, 1464–1466.

(17) Sakemi, S.; Inagaki, T.; Kaneda, K.; Hirai, H.; Iwata, E.; Sakakibara, T.; Yamauchi, Y.; Norcia, M.; Wondrack, L. M.; Sutcliffe, J. A.; Kojima, N. CJ-12,371 and CJ-12,372, two novel DNA gyrase inhibitors fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 134–142.

(18) Barrett, A. G. M.; Blaney, F.; Campbell, A. D.; Hamprecht, D.; Meyer, T.; White, A. J. P.; Witty, D.; Williams, D. J. Unified route to the palmarumycin and preussomerin natural products enantioselective synthesis of (–)-preussomerin. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2735–2750.

(19) Singh, S. B.; Zink, 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. Preussomerins and deoxypreussomerins: novel inhibitors of ras farnesyl-protein transferase. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6296–6302.

(20) Stone, J. K.; Bacon, C. W.; White, J. F., Jr. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In *Microbial Endophytes*; Bacon, C. W., White, J. F., Jr., Eds.; Dekker: New York, 2000; pp 3–30.

(21) Gunatilaka, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 509–26.

(22) Kusari, S.; Spiteller, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1203–7.

(23) Schulz, B.; Boyle, C. The endophytic continuum. *Microbiol. Res.* **2005**, *109*, 661–686.

(24) Rodriguez, R. J.; White, J. F.; Arnold, A. E.; Redman, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* **2009**, *182*, 314–30.

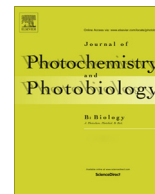
(25) Gao, F. K.; Dai, C. C.; Liu, X. Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2010**, *4*, 1346–1351.

(26) Strobel, G. A. Microbial gifts from rain forests. *Can. J. Plant Pathol.* **2002**, *24*, 14–20.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Selected phytotoxins and organic extracts from endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as light reaction of photosynthesis inhibitors



Martha Lydia Macías-Rubalcava^{a,*}, María Emma Ruiz-Velasco Sobrino^a, Claudio Meléndez-González^a, Beatriz King-Díaz^b, Blas Lotina-Hennsen^b

^a Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F. 04510, Mexico

^b Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2014
Received in revised form 29 April 2014
Accepted 5 May 2014
Available online 13 May 2014

Keywords:

Edenia gomezpompae
Endophytic fungi
Naphthoquinone spiroketals
Preussomerins
Palmarumycins
Phytotoxic compounds
Photosynthetic activities
Hill reaction inhibitors

ABSTRACT

In a search for natural herbicides, we investigated the action mechanism of the naphthoquinone spiroketals, isolated from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae*: preussomerins EG₁ (**1**) and EG₄ (**2**), and palmarumycins CP₁₇ (**3**), and CP₂ (**4**) on the photosynthesis light reactions. The naphthoquinone spiroketals **1–4** inhibited the ATP synthesis in freshly lysed spinach thylakoids from water to MV, and they also inhibited the non-cyclic electron transport in the basal, phosphorylating and uncoupled conditions from water to MV. Therefore, they act as Hill reaction inhibitors. The results suggested that naphthoquinone spiroketals **1–4** have two interactions and inhibition site on the PSII electron transport chain. The first one involves the water splitting enzyme inhibition; and, the second on the acceptor site of PSII in a similar way that herbicide Diuron, studied by polarography and corroborated by fluorescence of the chlorophyll *a* of PSII. The culture medium and mycelium organic extracts from four morphological variants of *E. gomezpompae* were phytotoxic, and the culture medium extracts were more potent than mycelium extracts. They also act as Hill reaction inhibitors.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Endophytes are microorganisms that colonise and cause asymptomatic infections in healthy plant tissues for their entire life cycle or for, at least, a significant part of the latter [1,2]. These fungi have adapted to their microenvironments that are as diverse as the number of plant species in the planet [3]. Some of these, while protecting their plant host from the external environment, live in an extremely competitive microenvironment in which they must contend for food and space against other endophytic microbes and potential plant pathogens; and, concomitantly struggle against chemical defenses from their plant host. These biotic interactions within plant tissues are the driving force of the constant and exhaustive chemical innovation that endophytes have developed during evolution [4]. Particularly, endophytic fungi provide benefits to their hosts including improved drought tolerance, protection against pathogens enhanced growth and defense against herbivory [5–11]. On the other hand, endophytic fungi produce phytotoxic compounds that help them colonize their host plants [12] and thus,

they could be used for weed control. These features, and their enormous diversity [13,14], permit to consider endophytic fungi as sources of potentially interesting metabolites that exhibit potential applications in agriculture, as antifungals, antibacterials, insecticides, nematocides, herbicidal, among others [15–19]. A strikingly high proportion of endophytic fungi (~80%) produce biologically active compounds in tests for antibacterial, fungicidal and herbicidal activities [12,17].

In spite of plants colonized by endophytic fungi not exhibiting overt disease symptoms of the fungal isolates from healthy plants, high percentage of endophytic fungi (~43%) expressed herbicidal activities [12,17]. Since the secondary metabolites isolated from endophytic fungi belong to diverse chemically compounds structural groups, the herbicidal activity is not due to one or more metabolites common to all of these microorganisms [17]. The herbicidal mycotoxins may play an important ecological role, inhibiting photosynthesis or increasing membrane permeability to improve apoplastic uptake of sugars [20–23]. For this reason, the phytotoxic fungal metabolite may be used in agriculture. These compounds can interact through different physiological process or enzyme site, such as, growth regulators, amino acid synthesis inhibitors, lipid synthesis inhibitors, carotenoid synthesis, seedling growth inhibitors, photosynthesis inhibitors, cell division

* Corresponding author. Tel.: +52 (55) 56 2244 32; fax: +52 (55) 56 16 22 17.
E-mail addresses: mlmacias@unam.mx, mamaciasr@gmail.com (M.L. Macías-Rubalcava).

inhibitors, cell membrane disrupters, cellulose synthesis, folate synthesis and pigment inhibitors, among others, affecting normal plant growth and development [24].

In our continuing search for new herbicidal lead structures from natural sources, we have recently reported the isolation and structure elucidation of several phytotoxins from the mycelium and culture broth of the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* (Pleosporaceae), isolated from *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae) [25]. The phytotoxins included several naphthoquinone spiroketals derivatives [26,27]. In addition, the phytotoxic properties of the culture medium and mycelium organic extracts from four morphological variants of *E. gomezpompae* were tested. In general, organic extracts and natural compounds showed significant phytotoxic effect on seed germination, root elongation, and seedling respiration of two weed dicotyledonous species *Amaranthus hypochondriacus* and *Solanum lycopersicum*, and one monocotyledonous plant *Echinochloa crus-galli*. The germination and root elongation were the most potent processes inhibited by the organic extracts and natural compounds than seedling respiration. The organic extracts and naphthoquinone spiroketals also showed a moderate inhibition effect on intact mitochondria respiration [27]. In view of these findings, we carried out extensive studies in order to better understand the mechanism of action associated with phytotoxic effects of organic extracts from four morphological variants of *E. gomezpompae*; and, selected phytotoxins produced by *E. gomezpompae*, such as preussomerins EG₁ (1) and EG₄ (2) and palmarumycins CP₁₇ (3) and CP₂ (4) (Fig. 1). These compounds were selected, due to their inhibitory effect on oxygen consumption on intact mitochondria. The research was conducted on the different phases of the photosynthesis light reaction. The investigated activities included ATP synthesis, electron transport rate basal, phosphorylating and uncoupled and partial reactions of the PSI and PSII, as well as, Chl *a* fluorescence of PSII measurements.

2. Materials and methods

2.1. Tested materials

The phytotoxic compounds tested included preussomerins EG₁ (1) and EG₄ (2) and palmarumycins CP₁₇ (3) and CP₂ (4) (Fig. 1). Naphthoquinone spiroketals were isolated from the fungus *E. gomezpompae* as previously described [26,27]. The phytotoxic culture medium (Med) and mycelium extract (Myc), from four morphological variants of *E. gomezpompae*, were also obtained as previously described [27]. Stock solutions used for polarography and fluorescence assays of culture medium and mycelium extract as well as pure compounds, were prepared using DMSO (dimethyl

sulfoxide) as solvent and its maximum concentration in the medium was less than 0.5%.

2.2. Chloroplast isolation and chlorophyll determination

Intact chloroplasts were isolated from market spinach leaves (*Spinacea oleracea*) in the dark conditions and at 4 °C as reported [28,29]. Chloroplasts were re-suspended in a small volume of the following solution: 400 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, and 30 mM *N*-Tris[hydroxymethyl]methylglycine, (tricine) pH 8.0, with KOH addition. Chloroplasts were stored as a concentrated suspension in the dark at 4 °C. In these conditions they are stable for 8–12 h. The chlorophyll (Chl) concentration was measured according to Strain et al. [30].

2.3. ATP synthesis

Intact chloroplasts (20 µg of Chl/mL) were broken before each assay by osmotic rupture in a solution (3 mL) containing: 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM KCN, 1 mM tricine-KOH at pH 8.0, in the presence of 50 µM methylviologen (MV), and 1 mM adenosine diphosphate (ADP) at pH 6.5. The pH was adjusted to 8.0 with 50 mM KOH, and ATP synthesis was titrimetrically determined using a microelectrode (Orion Mod. 8103 Ross) connected to a potentiometer (Corning Medical, model 12, Acton, MA, USA) with an expanded scale and a Gilson recorder (Kipp & Zonen, Bohemia, NY, USA). Alkalization rates were measured in the linear part during illumination. The reaction was calibrated by back titration with saturated HCl. The reaction started when turning the light on in the presence of chloroplasts (20 µg of chlorophyll per mL) [29,31]. The extracts were tested in the concentration range 6.25–200 µg/mL and the pure compounds in the concentration range 12.5–200 µg/mL.

2.4. Electron transport rates

Determination of the light-induced non-cyclic electron transport from water to MV (methylviologen) was performed using a Clark type electrode connected to a YSI 2300 biological oxygen monitor [32,33]. Basal non-cyclic electron transport was measured in the absence of uncoupled agent (NH₄Cl); and, chemicals required for phosphorylation (ADP (adenosine diphosphate) and KH₂PO₄) by illuminating chloroplasts (20 µg Chl/mL) during 1 min in 3 mL of medium containing 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM KCN, 50 µM MV, and 15 mM tricine-KOH (pH 8.0), as previously published [32–34]. Phosphorylating non-cyclic electron transport was determined in the presence of chemicals required for phosphorylation (ADP and KH₂PO₄), using

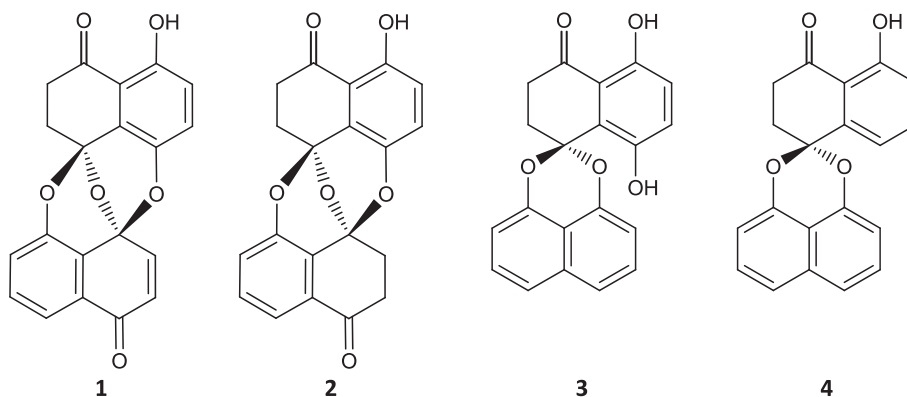


Fig. 1. Structures of phytotoxic compounds isolated from endophytic fungus *Edenia gomezpompae*.

the same way that basal electron transport from water to MV, except for the additions of 1 mM ADP and 3 mM KH_2PO_4 [32]. Uncoupled non-cyclic electron transport was tested in the presence of uncoupled agent (NH_4Cl), using the same procedure as for basal electron transport from water to MV, but with the addition of 6 mM NH_4Cl [32–34]. All reaction mixtures were illuminated for 2 min with a projector lamp (Gaf 2669), and passed through a 5 cm filter of a 1% CuSO_4 solution, resulting in actinic light (0.2 mW/cm^2). The temperature was 20°C , and, for each reaction, a negative control was performed with the chloroplasts in the reaction medium only. The extracts were tested in the concentration range 6.25–200 $\mu\text{g/mL}$, and the pure compounds were tested in the concentration range 12.5–200 $\mu\text{g/mL}$.

2.5. Partial reactions determination

Uncoupled photosystems I (PSI) and II (PSII) electron flow was performed as a non-cyclic electron transport assay. Uncoupled PSII electron flow, from water to DCPIP (2,6-dichlorophenolindiphenol), was measured by the reduction of DCPIP-supported O_2 evolution, with a 3 mL of medium containing 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 15 mM tricine-KOH (pH 8.0), 1 μM DBMIB (2,5-dibromo-6-isopropyl-3-methyl-1,4-benzoquinone), 100 μM DCPIP/500 μM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, and 6 mM NH_4Cl in illuminated chloroplasts (20 μg Chl/mL) during 1 min. Uncoupled partial reaction of PSII electron transport, from water to SiMo (sodium silicomolybdate), was determined as in PSII with 3 mL of the same medium for PSII; but, 1 μM DBMIB, and 100 μM DCPIP/500 μM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, were removed from the medium, and 200 μM SiMo and 10 μM DCMU [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] were added using chloroplasts (20 μg Chl/mL), illuminated during 1 min [35]. The uncoupled PSII partial electron transport rate from DPC (diphenylcarbazine), which donates electrons at P_{680} to DCPIP, was measured using a Beckman DU 650 spectrophotometer; and, it was determined with thylakoids previously treated with 0.8 M hydroxymethyl aminomethane (Tris) (pH 8.0), and incubated for 30 min at 4°C [36]. This treatment inhibited the water splitting enzyme.

Uncoupled PSI electron transport was determined using 3 mL of the medium used for the basal electron transport in addition to 10 μM DCMU, 100 μM DCPIP, 300 μM ascorbate, and 6 mM NH_4Cl in illuminated chloroplasts (20 μg Chl/mL) during 1 min [34,37]. These electron flow activities were monitored with a YSI 2300 biological oxygen monitor, using a Clark type electrode. All reaction mixtures were illuminated for 2 min with a projector lamp (Gaf 2669), and passed through a 5 cm filter of a 1% CuSO_4 solution, resulting in actinic light (0.2 mW/cm^2). The temperature was 20°C and, for each reaction, a negative control was performed with the chloroplasts in the reaction medium only. The extracts were tested in the concentration range 6.25–200 $\mu\text{g/mL}$; and, the pure compounds were tested in the concentration range 12.5–200 $\mu\text{g/mL}$.

2.6. Chlorophyll a fluorescence measurements

Chl *a* fluorescence transients were measured with a Handy-PEA (Plant Efficient Analyzer, from Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK), as previously described [38]. The maximum fluorescence yield from the sample was generated by illumination for 2 s with continuous light (650 nm peak wavelength, intensity equivalent of $2830 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and gain of 0.7), provided by an array of three light-emitting diodes. The reaction medium used was that employed in basal non-cyclic electron transport measurements without MV. To monitor Chl *a* fluorescence transients, aliquots of dark-adapted thylakoids, for 5 min containing 60 μg of Chl, were transferred to filter paper by gravity with a dot-blot apparatus

(Bio-Rad, United States), in order to ensure a homogeneous and reproducible distribution of thylakoids. The filter paper was dipped immediately in 3 mL of the medium with different concentrations of the tested compounds, and the control contained medium, plus the amount of DMSO. The O-J-I-P transients were analyzed according to the JIP test [39]. From the measured parameters we obtained: initial fluorescence (F_0), when plastoquinone electron acceptor pool (Q_A) is fully oxidized; maximal fluorescence level (F_M), when Q_A is transiently fully reduced; area over the curve between F_0 and F_M , which is related to the pool size of PSII electron transport acceptors [39]. Other derived parameters (Table 3) were calculated with the program Biolyzer HP3 (from Laboratory University of Geneva; available at <http://www.unige.ch/sciences/biologie/bioen>, or it is possible to contact Professor Reto J. Strasse, who designed the program).

2.7. Statistical analysis

Experimental results concerning the effect of culture media, and the mycelia extracts from morphological variants of *E. gomezpompae*; and, selected phytotoxins on different photosynthetic activities, were analyzed by Analysis of variance (ANOVA) and Tukey statistical tests utilizing GraphPad Prism ver. 5.01 statistical computer software [40]. The IC_{50} value (50% inhibitory concentration) for each activity (electron transport rates partial reactions) was calculated by Probit analysis [41], based on the average percentage of inhibition obtained at each concentration of the different treatments. Data are represented as mean \pm Standard deviation (SD). A *P* value of ≤ 0.05 was employed to indicate statistical significance.

It is important to emphasize that, in general, the effect of organic extract and naphthoquinones spiroketals **1–4** on photophosphorylation, electron transport rate from water to MV and on uncoupled partial reactions in the concentration range 25–200 $\mu\text{g/mL}$ was statistically significant ($P < 0.05$).

3. Results and discussion

The endophytic fungus *E. gomezpompae* was obtained from the leaves of *C. acuminata* (Verbenaceae), collected at the Ecological Reserve “Eden”; four isolates of this species were obtained, and these corresponded to the morphological variants denominated C1c, C1e, C1e2a, and C1e2b [27]. Considering that the culture medium and mycelium organic extracts and naphthoquinones spiroketals, from four morphological variants, showed significant phytotoxic activity [27]. In this paper we evaluated them for their capacity to inhibit different photosynthetic electron transport chain reactions, additionally Chl *a* fluorescence of PSII measurements.

3.1. Effect of organic extract and naphthoquinones spiroketals **1–4** on photophosphorylation

All phytotoxic extract from morphological variants of *E. gomezpompae* significantly inhibited the photosynthetic photophosphorylation (ATP synthesis) in freshly lysed spinach thylakoids, from water to MV, in a concentration dependent manner (Fig. 2A). IC_{50} values for the eight organic extract tested were from 15.9 to 106.2 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1). In general, the culture medium extracts (Med) were more potent than mycelium extracts (Myc). The culture medium extracts of morphological variants C1e (IC_{50} 55.7 $\mu\text{g/mL}$), C1e 2a (IC_{50} 15.9 $\mu\text{g/mL}$), and C1e 2b (IC_{50} 42.7 $\mu\text{g/mL}$), inhibited ATP synthesis by 100% at 150 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, ATP synthesis was significantly inhibited by palmarumycins CP₁₇ (**3**) (IC_{50} 24.3 μM), and CP₂ (**4**) (IC_{50} 25.1 μM), and partially

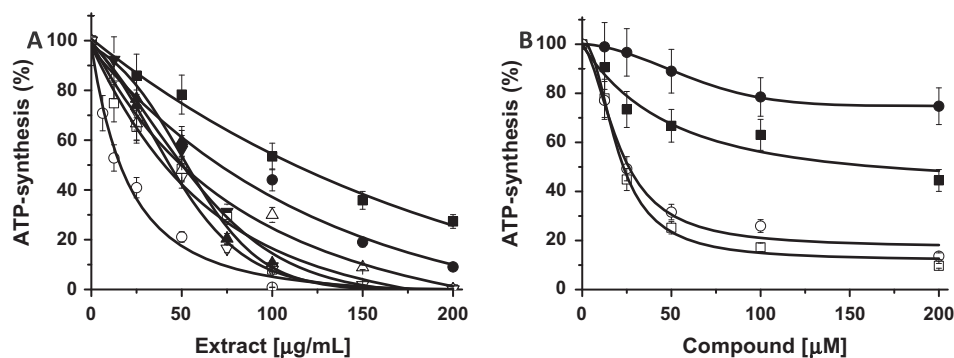


Fig. 2. (A) Inhibitory effects of increasing concentrations of organic extracts from four morphological variants of *E. gomezpompae*, C1c myc (■), C1c med (●), C1e myc (▲), C1e med (▼), C1e2a myc (□), C1e2a med (○), C1e2b myc (△), and C1e2b med (▽); Med, culture medium extract; Myc, mycelium extract. Panel B, compounds **1** (■), **2** (●), **3** (▼) and **4** (□) on ATP synthesis rate of spinach thylakoids. Control average value as 100% of activity was 1236.3 μM ATP/mg Chl \times h. The data are results of three replicates. Each point represents the mean of three determinations. Each repetition was made in different batches of chloroplasts. Vertical bars represent standard deviations. In general, the effect of organic extract and naphthoquinones spiroketals **1–4** on photophosphorylation, in the concentration range 25–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was statistically significant ($P < 0.05$).

Table 1
IC₅₀ values from ATP synthesis, basal, phosphorylating and uncoupled rates of electron transport and on partial reaction of PSII, PSI, H₂O to SiMo and DPC to DCPIP of organic extracts from four morphological variants of *Edenia gomezpompae* and preussomerins EG₁ (**1**), and EG₄ (**2**), and palmarumycins CP₁₇ (**3**), and CP₂ (**4**).

Photosynthetic activities	IC ₅₀ organic extracts from morphological variants of <i>E. gomezpompae</i> ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								IC ₅₀ compounds (μM)			
	C1c Myc	C1c Med	C1e Myc	C1e Med	C1e2a Myc	C1e2a Med	C1e2b Myc	C1e2b Med	1	2	3	4
ATP synthesis	106.2	70.4	53.7	55.7	42.0	15.9	51.5	42.7	178.1	>200	24.3	25.1
<i>Electron transport</i>												
Basal	135.1	>200	107.2	142.6	46.1	195.4	52.6	>200	122.3	152.2	46.6	74.8
Phosphorylating	152.6	184.3	86.5	>200	22.0	>200	26.2	>200	23.7	131.9	48.8	30.8
Uncoupled	17.9	104.5	14.4	55.7	16.8	22.2	23.5	67.6	46.1	50.0	63.5	84.3
<i>PSI</i>												
DCPIPred to MV	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
<i>PSII</i>												
H ₂ O to DCPIP/K ₃ [Fe(CN) ₆]	57.4	137.6	41.6	79.4	90.1	71.8	24.0	101.4	128.9	114.5	>200	142.1
H ₂ O to SiMo	102.7	97.7	71.4	84.1	99.3	26.3	71.4	40.3	23.5	11.2	135.6	14.6
DPC to DCPIP	174.7	132.0	102.4	>200	>200	81.0	>200	193.3	>200	>200	>200	>200

Myc, mycelium; Med, culture medium.

affected by preussomerins EG₄ (**2**) (IC₅₀ > 200 μM), and EG₁ (**1**) (IC₅₀ 178.1 μM) (Fig. 2B; and Table 1). Therefore, CP₂ (**4**) was the potent inhibitor to ATP synthesis, and the IC₅₀ values of **3** and **4** were lower than those of the organic extracts evaluated.

The inhibition of ATP synthesis might be inhibited in a different array of ways: by uncoupling ATP synthesis from the electron transport, by inhibiting the electron transport, and/or, by blocking the phosphorylation reaction itself. In order to investigate the mechanism of action of organic extracts and naphthoquinones spiroketals **1–4**, their effect on non-cyclic electron transport from water to MV was investigated under basal, phosphorylation, and uncoupled conditions.

3.2. Effect of organic extract and naphthoquinones spiroketals **1–4** on electron transport rate from water to MV on freshly lysed illuminated spinach chloroplasts

Organic extracts of *E. gomezpompae* inhibited the non-cyclic electron transport under the three conditions tested (basal, phosphorylating and uncoupled electron flow) from water to MV, in a concentration dependent manner, except the culture medium extract of morphological variant C1e 2b (Fig. 3A–H).

Very broadly, these results indicate that organic extracts behave as a Hill reaction inhibitor, since photosynthetic photophosphorylation and the electron transport rate were inhibited. Organic extracts were the most active inhibitors on uncoupled electron flow. IC₅₀ values were from 14.4 to 104.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all extracts tested (Table 1). Phosphorylating and uncoupled photosynthetic

electron transport was inhibited by culture medium extract of morphological variant C1e 2b (Fig. 3H). On the contrary, basal electron transfer was enhanced by extract. These results indicated that culture medium extract of C1e 2b acts as Hill reaction inhibitor and as mild uncoupler.

To obtain most information about the mechanism of action, the effect of naphthoquinone piroketals derivatives **1–4** on basal, phosphorylating and uncoupled electron flow from, water to MV, was investigated. Fig. 4A–D shows that these activities were inhibited by addition of compounds **1–4**, in a concentration-dependent manner. Compounds **1** and **2** were the most active on inhibiting the uncoupled electron transport rate with an IC₅₀ value of 46.1 and 50.0 μM , respectively. Compounds **3** and **4** were less active than **1** and **2**, with IC₅₀ values of 63.5 and 84.3 μM , respectively. Basal electron transport was less affected by **1**, **2** and **4** (IC₅₀ 122.3, 152.2, and 74.8 μM , respectively), but significantly inhibited by **3**, with IC₅₀ values of 46.6 μM . Furthermore, **2** (IC₅₀ 131.9 μM) and **3** (IC₅₀ 48.8 μM) were less active on inhibiting the phosphorylating electron transport flow than **1** (IC₅₀ 23.7 μM) and **4** (IC₅₀ 30.8 μM). Compounds **1** and **4** inhibit phosphorylating electron transport in parallel manner as concentration increases. The results suggest that naphthoquinone piroketals might have more than one mechanism of action. Compounds that inhibit ATP synthesis, and uncoupled electron transport, act as Hill reaction inhibitors by blocking the reduction of the electron transport chain acceptor (MV in this case). Further, both compounds, **1** and **2**, have the same potency as Hill reaction inhibitors demonstrated by uncoupled electron flow inhibition. Additionally, it was observed that all

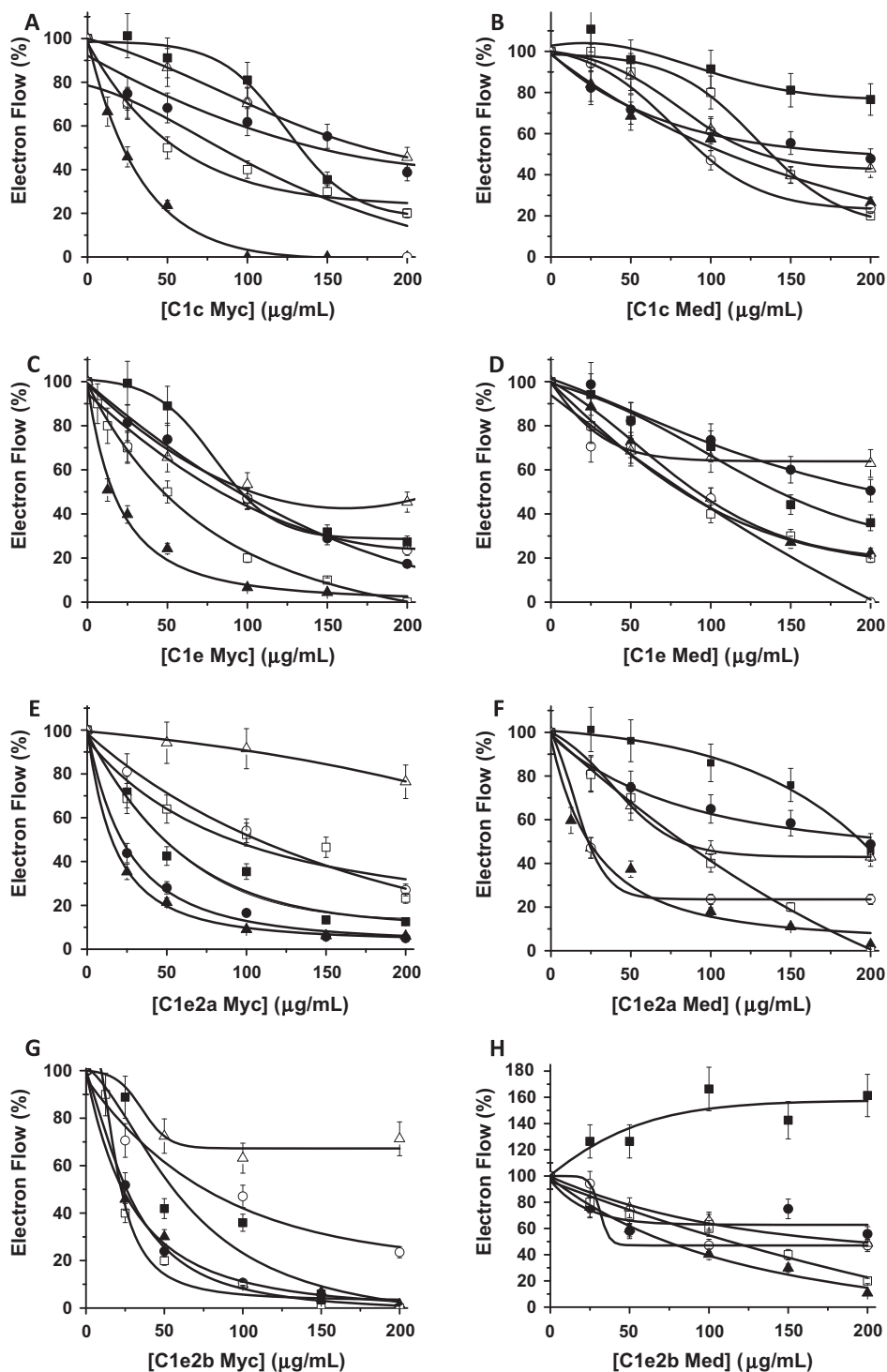


Fig. 3. Inhibitory effect of increasing concentrations of organic extracts from four morphological variants of *E. gomezpompae* on basal (■), phosphorylating (●), and uncoupled (▲) rates of electron transport; and, on uncoupled PSII measured from H₂O to DCPIP (□), and the uncoupled partial reaction of PSII from H₂O to SiMo (○), and DPC to DCPIP (△); Med, culture medium extract; Myc, mycelium extract. Control average value as 100% of activity was 412 $\mu\text{equiv e}^-/\text{mg Chl} \times \text{h}$. The data are results of three replicates. Each point represents the mean of three determinations. Each repetition was made in different batches of chloroplasts. Vertical bars represent standard deviations. In general, the effect of organic extract on electron transport rate from water to MV on freshly lysed illuminated spinach chloroplasts, in the concentration range 25–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was statistically significant ($P < 0.05$).

concentrations tested of **1** inhibit the phosphorylating electron transport rate to a higher degree than the basal, or the uncoupled electron flow (Fig. 4A and B; and Table 1). The results suggest that **1** interacts and inhibits at an energized state (electron flow coupled to ATP synthesis) than in non-energized state (basal and uncoupled electron flow), or **1** may inhibit ATP synthesis itself.

3.3. Effect of organic extract and naphthoquinones spiroketals **1–4** on uncoupled partial reactions in electron transport rate tested on spinach chloroplasts

To localize the inhibition site of organic extracts and naphthoquinone spiroketals **1–4**, in the chloroplast electron transport chain,

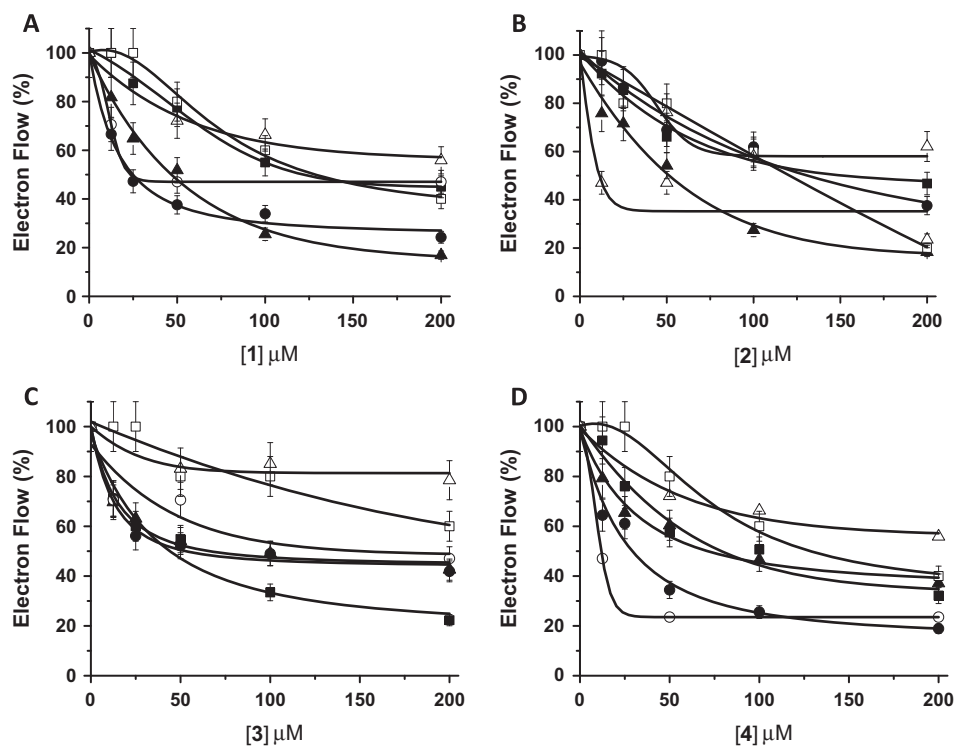


Fig. 4. Inhibitory effect of increasing concentrations of preussomerins EG₁ (1) and EG₄ (2) and palmarumycins CP₁₇ (3) and CP₂ (4), from the endophytic fungus *E. gomezpompae* on basal (■), phosphorylated (●), and uncoupled (▲) rates of electron transport, and on uncoupled PSII measured from H₂O to DCPIP (□); and, the uncoupled partial reaction of PSII from H₂O to SiMo (○), and DPC to DCPIP (△). Control average value as 100% of activity was 239.9 μequiv e⁻/mg Chl × h. The data are results of three replicates. Each point represents the mean of three determinations. Each repetition was made in different batches of chloroplasts. Vertical bars represent standard deviations. In general, the effect of naphthoquinones spiroketals 1–4 on electron transport rate from water to MV on freshly lysed illuminated spinach chloroplasts, in the concentration range 12.5–200 μg/mL, was statistically significant ($P < 0.05$).

their effect on diverse partial reactions of PSII and PSI were measured. In these experiments, different combinations of artificial electron donors and acceptors, as well as appropriate inhibitors were used. Uncoupled PSI electron transport from the reduced DCPIP to MV was not affected with the extracts and compounds 1–4 (data not shown). IC₅₀ values were >200 μg/mL for organic extracts, and >200 μM for compounds. In contrast, the uncoupled PSII electron flow was inhibited by all the samples tested (Figs. 3 and 4). Uncoupled PSII from water to DCPIP/K₃[Fe(CN)₆], from water to SiMo, and from DPC to DCPIP were inhibited in a concentration dependent manner. The mycelium extracts of

morphological variants C1e (IC₅₀ 41.6 μg/mL), and C1e 2b (IC₅₀ 24.0 μg/mL) showed the most pronounced inhibitory effect on uncoupled PSII from water to DCPIP/K₃[Fe(CN)₆], they inhibited to 100% at 200 μg/mL and 150 μg/mL, respectively (Fig. 3C and G).

The culture medium extract of morphological variants C1e (IC₅₀ 79.4 μg/mL) also inhibited uncoupled PSII from water to DCPIP/K₃[Fe(CN)₆], activity by 100%, at 200 μg/mL (Fig. 3D). On the other hand, organic extracts and compounds 1–4 were the most active inhibitors on uncoupled electron flow from H₂O to SiMo. Also, the uncoupled electron transport from DPC to DCPIP was partially

Table 2
Effect of increasing concentration of preussomerins EG₁ (1), and EG₄ (2), and palmarumycins CP₁₇ (3), and CP₂ (4) on fluorescence parameters on thylakoids previously incubated for 5 min in the dark, and with 0.8 M Tris, pH 8.0.

Compound	Concentration (μM)	F ₀	F _M	F _V	F _V /F _M	Area
1	0	163 ± 5.7	722 ± 29.5	559 ± 24.2	0.774 ± 0.003	15,318 ± 3820
	50	167 ± 9.1	727 ± 35.2	560 ± 26.1	0.770 ± 0.002	12,909 ± 1514
	100	170 ± 4.5	734 ± 26.8	564 ± 22.5	0.768 ± 0.003	18,207 ± 4197
	200	166 ± 2.1	703 ± 13.4	537 ± 11.3	0.764 ± 0.001	19,078 ± 5940
2	0	163 ± 5.7	722 ± 29.5	559 ± 24.2	0.774 ± 0.003	15,318 ± 3820
	50	162 ± 6.2	704 ± 31.2	542 ± 25.1	0.770 ± 0.003	18,812 ± 1249
	100	162 ± 104	702 ± 56.9	540 ± 46.9	0.769 ± 0.006	18,692 ± 4474
	200	174 ± 9.4	742 ± 40.4	568 ± 31.2	0.765 ± 0.003	16,588 ± 1311
3	0	162 ± 3.8	770 ± 11.8	608 ± 13.0	0.790 ± 0.005	19,304 ± 1720
	50	150 ± 2.1	720 ± 1.4	570 ± 0.71	0.792 ± 0.002	20,231 ± 4243
	100	148 ± 3.0	693 ± 3.2	545 ± 2.4	0.786 ± 0.003	21,110 ± 1629
	200	157 ± 4.6	719 ± 2.1	562 ± 1.7	0.782 ± 0.005	17,209 ± 1386
4	0	162 ± 3.8	770 ± 11.8	608 ± 13.0	0.790 ± 0.005	19,304 ± 1720
	50	147 ± 8.0	708 ± 41.6	561 ± 33.8	0.792 ± 0.002	18,036 ± 3671
	100	152 ± 8.7	703 ± 32.0	551 ± 23.4	0.784 ± 0.003	16,495 ± 1629
	200	159 ± 4.6	730 ± 21.1	571 ± 16.6	0.782 ± 0.0005	16,918 ± 1386

Table 3Derived parameters, their description and formulae using data extracted from the Chl *a* fluorescence (OJIP) transient presented in this work.

Fluorescence parameters derived from the extracted data	
$M_0 = 4(F_{300\text{ms}} - F_0)/(F_M - F_0)$	Approximated initial slope (in ms^{-1}) of the fluorescence transient $V = f(t)$
$Sm = (\text{area})/(F_M - F_0)$	Normalized total complementary area above the O-J-I-P transient (reflecting multiple turnover Q_A reduction events)
Yields or flux ratios	
$\phi_{P_0} = TR_0/ABS = [1 - F_0/F_M]$	Maximum quantum yield of primary photochemistry at $t = 0$
$\phi_{E_0} = ET_0/ABS = [1 - F_1/F_M]$	Quantum yield for electron transport at $t = 0$
$\psi_{E_0} = ET_0/TR_0 = (1 - V_j)$	Probability (at $t = 0$) that a trapped exciton moves an electron into the electron transport chain beyond Q_A
$\phi_{D_0} = 1 - \phi_{P_0} = (F_0/F_M)$	Quantum yield (at $t = 0$) of energy dissipation
$\delta R_0 = RE_0/ET_0 = (1 - V_i)/(1 - V_j)$	Efficiency with which an electron can move from the reduced intersystem electron acceptors to the PSI end electron acceptors of PSI
$\phi_{R_0} = RE_0/ABS = \phi_{P_0} \cdot \psi_{E_0} \cdot \delta R_0 = 1 - (F_1/F_M)$	Quantum yield for the reduction of end acceptors of PSI per photon absorbed
$RE_0/TR_0 = \psi_{E_0} \times \delta R_0$	Efficiency with which a trapped exciton move an electron into the electron transport chain from Q_A to the PSI end electron acceptors
Specific energy fluxes or activities (per reaction Q_A reducing PSII reaction center – RC)	
$ABS/RC = M_0(1/V_j)(1/\phi_{P_0})$	Absorption per RC
$TR_0/RC = M_0/V_j$	Trapped energy flux per RC (at $t = 0$)
$ET_0/RC = M_0(1/V_j)(\psi_{E_0})$	Electron transport flux per RC (at $t = 0$)
Phenomenological energy fluxes (per excited cross section – CS)	
ABS/CS_0	Absorption flux per CS
TR_0/CS_0	Trapped energy flux per CS (at $t = 0$)
ET_0/CS_0	Electron transport flux per CS (at $t = 0$)
De-excitation rate constants	
Kp	Photochemical de-excitation rate constant
Kn	Non-photochemical de-excitation rate constant
Sum K	The sum of photochemical and non-photochemical rate constants
Performance index at $t = 0$	
$PI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} * \frac{\phi_{P_0}}{1 - \phi_{P_0}} * \frac{\psi_{E_0}}{1 - \psi_{E_0}}$	Performance index on absorption basis

inhibited by these compounds. Compounds **1**, **2** and **4**, were more active than **3**. The highest inhibitory effect on uncoupled PSII from water to SiMo, caused by compounds **1** (51%), **2** (63%) and **4** (76%), was observed at a concentration of 25 μM . In the case of compound **3** (43%), the maximum inhibitory effect was achieved at 100 μM . IC_{50} values for extracts were from 26.3 to 102.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$; and, for compounds **1–4** were 23.5, 11.2, 135.6 and 14.6 μM , respectively.

Altogether, the results indicated that inhibition sites of naphthoquinone piroketals are at the PSII electron transport on the water splitting enzyme (OEC complex), and on the acceptor side of PSII. Finally, Table 1 summarizes the inhibition of different photosynthetic activities of the organic extract and isolates compounds **1–4** from *E. gomezpompae*. The results in Table 1 are expressed as IC_{50} values.

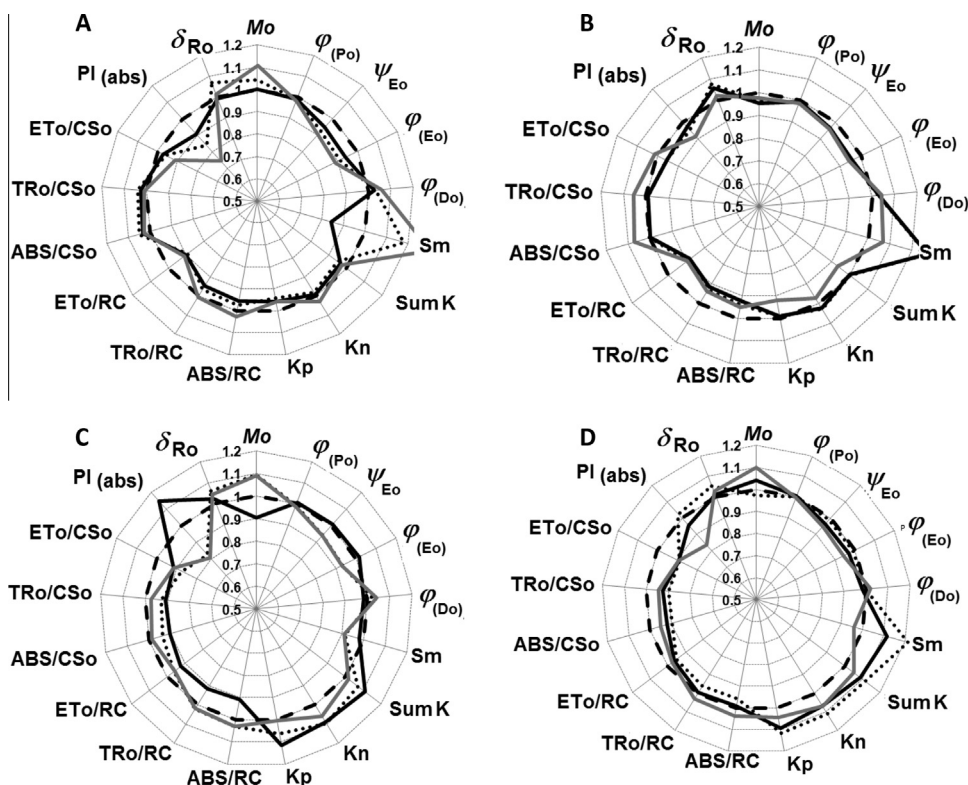


Fig. 5. Radar graphs showing the effects of naphthoquinones piroketals at 50 (black line), 100 (dot line), and 200 μM (grey line), on the derived parameters calculated from the OJIP transients of Chl *a*, presented by dark-adapted freshly lysed chloroplasts. Control is represented by dashed black line at the center of the radar and is equal to the unity. Panel A, compound **1**; B, compound **2**; C, compound **3** and D compound **4**.

3.4. Chlorophyll *a* fluorescence of PSII measurements

To corroborate the polarography results about the interaction site of the naphthoquinone piroketals **1–4**, at PSII, fluorescence of Chl *a* were measured on freshly lysed spinach chloroplasts incubated for 5 min in the dark at room temperature. Control chloroplast contained the amount of DMSO used for each treatment. The treated chloroplasts contained various concentrations of the compounds. The obtained O–J–I–P transients were analyzed according to the JIP test and the measured parameters were: fluorescence intensity level (F_0); when plastoquinone electron acceptor pool (Q_A) is fully oxidized; fluorescence level when Q_A is transiently fully reduced (F_M); variable fluorescence calculated as $F_M - F_0$, (F_V), the maximum quantum yield of primary photochemistry is at $t = 0$, ($\phi_{P_0} = F_V/F_M$); and the area over the curve is between F_0 and F_M , which relates the pool size of PSII electron transport acceptors (Area), [42]. Compounds **1** and **2** lightly increased F_0 values and F_M values remain almost constant, and the F_V/F_M values were also lightly increased (Table 2). An increase in F_0 has been

attributed to the physical separation of the PSII reaction centers from their associated pigment antennae resulting in blocked energy transfer to the PSII traps [43–46], although a part of this phenomenon could possibly reflect the accumulation of the reduced form of Q_A^- [47].

With compounds **3** and **4**, the F_0 and the F_M values decreased (Table 2). From these parameters other derived parameters were calculated (Table 3), with the program Biolyzer HP3. The effect of increasing concentrations of the naphthoquinones piroketals were plotted in radar graphs as shown in Fig. 5. In these radar plots the parameter most affected by the **1** and **2** was the performance index ($PI_{(ABS)}$), and electron transport per reaction center (ET_0/RC). These parameters decreased 25% and 10% respectively with both compounds. With compounds **3** and **4**, parameters as $PI_{(ABS)}$ also decreased, but in minor proportion; besides this, the electron transport per cross section (ET_0/CS_0), and the normalized total complementary area above the O–J–I–P transient, were diminished at the higher concentrations. All these results suggested that **1, 2, 3** and **4** inhibited the PSII electron transport. On the other hand, the

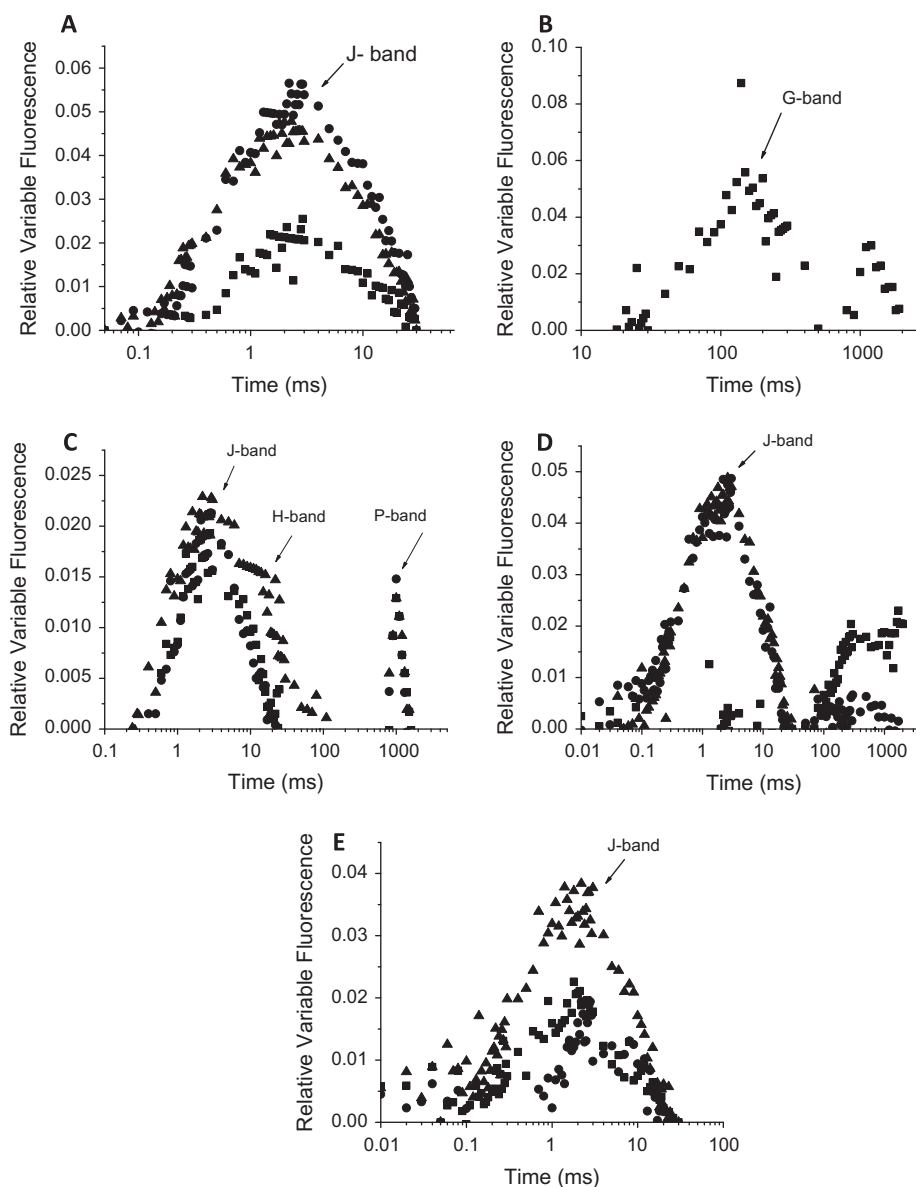


Fig. 6. Fluorescence kinetics (F_t) expressed as relative variable fluorescence: Panel A, C, D and E, between F_0 and F_5 , $V_t = (F_t - F_0)/(F_5 - F_0)$. Panel B, the IP phase normalized on the F_0 to F_1 phase = between F_5 and F_M , $V_t = (F_t - F_0)/(F_1 - F_0) - 1$. Panel A and B, compound **1**; panel C, compound **2**; panel D compound **3** and panel E, compound **4**. All compounds were assayed at concentrations of 50 (■), 100 (●) and 200 μ M (▲).

fluorescence of Chl *a* PSII transients, obtained with the naphthoquinone piroketals **1–4** treatments, were normalized using the equation $V_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$, and the difference between the treated and control normalized transients is called “relative variable fluorescence”. The relative variable fluorescence was plotted versus time, and showed an increase in intensity between 2 and 4 ms, appearing a J-band near to 2 ms. This band is an indicative of the Q_A^- increased concentration [48]. The plots of relative variable fluorescence, obtained with the different concentrations of four compounds, showed the appearance a clear J-band (near to 2 ms), with an exception of **3**, that only showed this band at 100 and 200 μ M, but not at 50 μ M (Fig. 6 Panel A, C, D and E). Further, with **1** at 50 μ M, there appeared a second band, the G-band; and **2** showed two bands. At the major concentration, an H-band appears; and, at 50, 100 and 200 μ M, the appearance of the P-band (near to 1 s) was induced [49]. The J-I phase had been showing in parallel, the reduction of the PQ-pool [50]; and the I-P phase depended on the PSI activity, representing the reduction of the ferredoxin (Fd) pool, in the presence of inactive ferredoxin-NADP⁺-reductase (FNR) [51]; so in this way, compound **1** inhibited at the acceptor side of PSII between P₆₈₀ and PQ-pool. Compound **2** has two inhibition sites; one at acceptor side of PSII and the other target was beyond to Q_A . Compound **3** also showed an increase in relative variable fluorescence between 0.1 and 1 s, but in this case this band was not well defined. Compounds **3** and **4** only inhibited at the acceptor site of PSII.

De Medeiros et al. [22] investigated the effect of 3-hydroxy-2,5-dimethylphenyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate, and 3-hydroxy-2,5-dimethylphenyl 4-[(2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoyl)oxy]-2-hydroxy-3,6-dimethylbenzoate, two depsides produced by *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus isolated from guava fruit (*Psidium guajava*, Myrtaceae) on photosynthesis in freshly lysed spinach chloroplasts. Both fungal compounds inhibited electron flow basal, phosphorylating, and uncoupled, from water to MV, acting as Hill reaction inhibitors in a similar manner as preussomerins EG₁ (**1**) and EG₄ (**2**) and palmarumycins CP₁₇ (**3**) and CP₂ (**4**) from endophytic fungus *E. gomezpompae*. Two depsides, also inhibited a similar way, partial reactions of PSII electron flow from water to 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone (DCBQ), from water to SiMo, and partially inhibited electron flow from DPC to DCPIP, acted in a similar way as naphthoquinonepiroketal **1–4**.

Both fungal compounds from *C. uredinicola* and fungal compounds from *E. gomezpompae* have shown that the highest inhibitory effect on uncoupled PSII from water to SiMo. IC₅₀ values for depsides produced by the endophytic fungus *C. uredinicola* were 68 and 22 μ M, respectively; and, for naphthoquinones spiroketals **1–4** produced by *E. gomezpompae* were 23.5, 11.2, 135.6 and 14.6 μ M, respectively. All told, the results indicated that inhibition sites of two families of compounds (naphthoquinone piroketals and depsides) are at the PSII electron transport chain at OEC complex, and on the acceptor site of PSII. This mechanism of action was supported by chlorophyll *a* fluorescence measurement which shows a J-band in a similar way to herbicide Diuron (DCMU) [52]. It is important to highlight that preussomerins EG₁ (**1**), and EG₄ (**2**), and palmarumycin CP₂ (**4**) were the most powerful on the PSII electron transport chain in freshly lysed illuminated spinach chloroplasts.

4. Conclusions

It was described that culture medium and mycelium organic extracts, from four morphological variants of *E. gomezpompae*, and preussomerins EG₁ (**1**) and EG₄ (**2**) and palmarumycins CP₁₇ (**3**) and CP₂ (**4**), possess phytotoxic properties inhibiting different

light reactions of photosynthesis. In particular, the tested compounds have an effect on the PSII electron transport chain in freshly lysed illuminated spinach chloroplasts.

According to the previous study, preussomerins and palmarumycins contents in morphological variants of *E. gomezpompae*, analyzed by HPLC, showed that the four variants presented differences in the concentration of the major components [27]. These results could be due to the phenotypic plasticity of *E. gomezpompae*; for that reason, each phenotype, with different morphology and different biological activity, exhibited also important differences in chemical compounds production. Despite this, the sum of all secondary metabolites produced by each morphological variant is highly phytotoxic.

To the best of our knowledge the phytotoxic effect on photosynthesis has not been previously described for naphthoquinones spiroketals **1–4**; therefore, these compounds could be considered as promising lead compounds for developing new herbicides and represent a rich source of bioactive compounds with potential for utilization in modern agriculture. Since endophytic fungi are poorly unstudied organisms and producers of bioactive secondary metabolites, they are a valuable source of novel natural products. Their secondary metabolites offer an enormous potential for the discovery of new agrochemicals and drugs of natural origin [15–19,52,53].

In summary, in the current study, we demonstrated, for the first time, that the preussomerins and palmarumycins from the endophytic fungus *E. gomezpompae*, of which are the main components present in the culture medium and mycelium organic extracts [27], are responsible for the *in vitro* phytotoxic properties of organic extracts from four morphological variants of *E. gomezpompae* on photosynthesis.

Acknowledgment

This work was supported by grant CONACYT 81017 and 179194.

References

- [1] O. Petrini, Fungal endophytes of tree leaves, in: J.H. Andrews, S.S. Hirano (Eds.), *Microbial Ecology of Leaves*, Springer-Verlag, New York, 1991, pp. 179–197.
- [2] K. Saikkonen, S.H. Faeth, M. Helander, T.J. Sullivan, Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants, *Annu. Rev. Ecol. Systemat.* 29 (1998) 319–343.
- [3] A.E. Arnold, Z. Maynard, G.S. Gilbert, Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity, *Mycol. Res.* 105 (2001) 1502–1507.
- [4] G. Strobel, B. Daisy, Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 491–502.
- [5] A.E. Arnold, L.C. Mejia, D. Kylo, E.I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins, E.A. Herr, Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 15649–15654.
- [6] T.J. Sullivan, J. Rodstrom, J. Vandop, J. Librizzi, C. Graham, C.L. Schardl, T.L. Bultman, Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition, *New Phytol.* 176 (2007) 673–679.
- [7] D.-X. Zhang, P. Nagabhyru, C.L. Schardl, Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants, *Plant Physiol.* 150 (2009) 1072–1082.
- [8] F.K. Gao, C.C. Dai, X.Z. Liu, Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens, *Afr. J. Microbiol. Res.* 4 (2010) 1346–1351.
- [9] A. Ren, C. Li, Y. Gao, Endophytic fungus improves growth and metal uptake of *Lolium arundinaceum*, Darbyshire Ex. Schreb. *Int. J. Phytoremed.* 13 (2011) 233–243.
- [10] M. Hubbard, J. Germida, V. Vujanovic, Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress, *Botany* 90 (2012) 137–149.
- [11] A.F. Currie, J. Wearn, S. Hodgson, H. Wendt, S. Broughton, L. Jin, in: V.C. Verma, A.C. Gange (Eds.), *Advances in Endophytic Research*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2014, pp. 61–81.
- [12] B. Schulz, C. Boyle, The endophytic continuum, *Mycol. Res.* 109 (2005) 661–686.
- [13] D.L. Hawksworth, The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation, *Mycol. Res.* 95 (1991) 641–655.

- [14] A. Aptroot, Species diversity in tropical rainforest ascomycetes: lichenized vs. non-lichenized; foliicolous vs. corticolous, *Abstracta Bot.* 21 (1997) 37–44.
- [15] M.M. Dreyfuss, I.H. Chapela, Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals, *Biotechnology* 26 (1994) 49–80.
- [16] R.X. Tan, W.X. Zou, Endophytes: a rich source of functional metabolites, *Nat. Prod. Rep.* 18 (2001) 448–459.
- [17] B. Schulz, C. Boyle, S. Draeger, A.K. Rommert, K. Krohn, Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites, *Mycol. Res.* 106 (2002) 996–1004.
- [18] S. Kumar, N. Kaushik, Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review, *Phytochem. Rev.* 11 (2012) 507–522.
- [19] S. Kusari, C. Hertweck, M. Spiteller, Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites, *Chem. Biol.* 19 (2012) 792–798.
- [20] J.B. Gloer, in: C.P. Kubicek, I.S. Druzhinina (Eds.), *Environmental and Microbial Relationships*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007, pp. 249–268.
- [21] A.L. Khan, M. Hamayun, J. Hussain, S.-M. Kang, I.-J. Lee, The newly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 produces ascotoxin, *Molecules* 17 (2012) 1103–1112.
- [22] L.S. de Medeiros, O.M. Sampaio, M.F. das, G.F. da Silva, E.R. Filho, T.A.M. Veiga, Evaluation of herbicidal potential of depsides from *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus found in guava fruit, *J. Braz. Chem. Soc.* 23 (2012) 1551–1557.
- [23] Z. Yang, M. Ge, Y. Yin, Y. Chen, M. Luo, D. Chen, A novel phytotoxic nonenolide from *Phomopsis* sp. HCCB03520, *Chem. Biodivers.* 9 (2012) 403–408.
- [24] M. Devine, S.O. Duke, C. Fedtke, *Physiology of Herbicide Action*, By PTR Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1992, p. 441.
- [25] M.C. González, A.L. Anaya, A.E. Glenn, A. Saucedo-García, M.L. Macías-Rubalcava, R.T. Hanlin, A new endophytic ascomycete from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico, *Mycotaxon* 101 (2007) 251–260.
- [26] M.L. Macías-Rubalcava, B.E. Hernández-Bautista, M. Jiménez-Estrada, M.C. González-Villaseñor, A.E. Glenn, R.T. Hanlin, A. Saucedo-García, J.M. Muria-González, S. Hernández-Ortega, A.L. Anaya, Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*, *Phytochemistry* 69 (2008) 1185–1196.
- [27] M.L. Macías-Rubalcava, M.E. Ruiz-Velasco, Sobrino, S. Hernández-Ortega, Naphthoquinone spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potential herbicides, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 3553–3562.
- [28] J.D. Mills, P. Mitchell, P. Schürmann, Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts: the role of the thioredoxin system, *FEBS Lett.* 112 (1980) 173–177.
- [29] B.A. Sánchez-Muñoz, M.I. Aguilar, B. King-Díaz, J.F. Rivero, B. Lotina-Hennsen, The sesquiterpenes β -caryophyllene and caryophyllene oxide isolated from *Senecio salignus* act as phyto-growth and photosynthesis inhibitors, *Molecules* 17 (2012) 1437–1447.
- [30] H.H. Strain, B.T. Cope, W.A. Svec, Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls, *Meth. Enzymol.* 23 (1971) 452–466.
- [31] R.A. Dilley, Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena), *Meth. Enzymol.* 24 (1972) 68–74.
- [32] S. Saha, R. Ouitrakul, S. Izawa, N. Good, Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 3204–3209.
- [33] D. Torres-Romero, B. King-Díaz, R.J. Strasser, I.A. Jiménez, B. Lotina-Hennsen, I.L. Bazzocchi, Friedelane triterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 10847–10854.
- [34] B. King-Díaz, P.D.A. Castelo-Branco, F.J.L. dos Santos, M.M.M. Rubinger, D.L. Ferreira-Alves, D. Piló-Veloso, B. Lotina-Hennsen, Furanoditerpene ester and thiocarbonyldioxy derivatives inhibit photosynthesis, *Pestic. Biochem. Physiol.* 96 (2010) 119–126.
- [35] R.T. Giaquinta, B.R. Selman, B.J. Anderson, R.A. Dilley, Inhibition of coupling factor activity of chloroplast membrane by diazonium compounds, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 2873–2878.
- [36] L.P. Vernon, E.R. Shaw, Photoreduction of 2,6-dichlorophenol by diphenylcarbazine: a photosystem 2 reaction catalyzed by Tris-washed chloroplasts and subchloroplasts fragments, *Plant Physiol.* 44 (1969) 1645–1649.
- [37] J.F. Allen, N.G. Holmes, in: M.F. Hipkinns, N.R. Baker (Eds.), *Photosynthesis, Energy Transduction. A Practical Approach*, I.R.L. Press, Oxford, United Kingdom, 1986, pp. 103–141.
- [38] T.A.M. Veiga, B. King-Díaz, A.S.F. Marques, O.M. Sampaio, P.C. Vieira, M.F.G.F. da Silva, B. Lotina-Hennsen, Furoquinoline alkaloids isolated from *Balfourodendron riedelianum* as photosynthetic inhibitors in spinach chloroplasts, *J. Photochem. Photobiol. B* 120 (2013) 36–43.
- [39] R.J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, A. Srivastava, in: G.C. Papageorgion, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2004, pp. 321–362.
- [40] R. Mead, R.N. Curnow, A.M. Hasted, *Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology*, third ed., Chapman and Hall, CRC, Boca Raton, FL, 2002.
- [41] J.H. Zar, *Biostatistical Analysis*, fifth ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2010.
- [42] H.X. Jiang, L.-S. Chen, J.G. Zheng, S. Han, N. Tang, B.R. Smith, Aluminium induced effects of photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient, *Tree Physiol.* 28 (2008) 1863–1871.
- [43] A. Srivastava, B. Guissé, H. Greppin, R.J. Strasser, Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP, *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (1997) 95–106.
- [44] P.A. Armond, O. Björkman, L.A. Staehelin, Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus, *Biochim. Biophys. Acta* 601 (1980) 433–442.
- [45] P.A. Armond, U. Schreiber, O. Björkman, Photosynthetic acclimation to temperature in the Desert Shrub, *Larrea divaricata*. II. Light-harvesting efficiency and electron transport, *Plant Physiol.* 61 (1978) 411–415.
- [46] C.A. Sundby, A. Melis, P. Mäenpää, B. Andersson, Temperature-dependent changes in the antenna size of Photosystem II. Reversible conversion of Photosystem II α to Photosystem II β , *Biochim. Biophys. Acta* 851 (1986) 475–483.
- [47] N.G. Bukhov, S.C. Sabat, P. Mohanty, Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus chloroplasts*, *Photosynth. Res.* 23 (1990) 81–87.
- [48] A. Srivastava, R.J. Strasser, Govindjee, Polyphasic rise of chlorophyll a fluorescence in herbicide resistant D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photosynth. Res.* 43 (1997) 131–141.
- [49] S.Z. Tóth, G. Schansker, G. Garab, R.J. Strasser, Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: the role of internal alternative electron donors to photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 295–305.
- [50] U. Schreiber, C. Neubauer, C. Klughammer, Devices and methods for room-temperature fluorescence analysis, *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 323 (1989) 241–251.
- [51] G. Schansker, S.Z. Tóth, R.J. Strasser, Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP, *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005) 250–261.
- [52] R.T. Giaquinta, R.A. Dilley, F.L. Crane, R. Barr, Photophosphorylation not coupled to DCMU-insensitive photosystem II oxygen evolution, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59 (1974) 985–991.
- [53] S.O. Duke, F.E. Dayan, J.G. Romagni, A.M. Rimando, Natural products as sources of herbicides: current status and future trends, *Weed Res.* 40 (2000) 99–111.