



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON  
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIOOMICETO DE HONGOS ENDÓFITOS CON  
POTENCIAL ANTAGÓNICO AISLADOS DE *Mimosa affinis* Y *Sapium  
macrocarpum*

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. RODRIGO VILLANUEVA SILVA

TUTORA :

.... DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CDMX, JUNIO 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Jurado asignado**

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dra. Irma Susana Rojas Tomé

Secretario: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Tutora:

---

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Sustentante:

---

Q.F.B. Rodrigo Villanueva Silva

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 1-4 del Departamento de Productos Naturales  
del Instituto de Química de la UNAM



## **Agradecimientos**

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento, a las siguientes Instituciones:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo el presente trabajo a través de los proyectos 179194 e IN207117, respectivamente, y por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con número de becario 576665.

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto de Química, la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM, que contribuyeron en mi formación profesional.

Asimismo, expreso mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por su ayuda, sus enseñanzas, su confianza y su apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A cada uno de los miembros del jurado: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Irma Susana Rojas Tomé y Dra. María Isabel Aguilar Laurents, por las valiosas aportaciones realizadas durante la revisión de este trabajo.

A los siguientes técnicos académicos de los laboratorios del Instituto de Química, UNAM:

A la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar y a la Q. María de los Ángeles Peña González por la capacitación y ayuda en el manejo del equipo Bruker 300 y por su apoyo en la obtención de espectros de RMN de 300 y 400 MHz.

Al M. en C. Héctor Ríos Olivares, por su apoyo en la obtención de espectros de RMN de 400 MHz.

Al personal del Laboratorio Universitario de RMN (LURMN) en IQ-UNAM, en especial a las Dras. Nuria Esturau Escofet y Beatriz Quiroz García por los espectros realizados con la tecnología del equipo Bruker 700 MHz.

A los técnicos académicos del laboratorio de Espectrometría de masas: Ing. Q. Luis Velasco-Ibarra, Dr. Francisco Javier Pérez Flores y Dra. María del Carmen García González, por la obtención de los espectros de masas.

A la responsable del laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría, la Q.F.B. María Del Rocío Patiño Maya, por la obtención de los espectros en la región de infrarrojo.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras del Instituto de Biología de la UNAM, por su colaboración en la identificación taxonómica de los hongos endófitos.

A mi familia por su cariño, comprensión y apoyo incondicional, en cada momento de mi vida, han contribuido en gran medida en mi persona y mis logros personales.

A mis compañeros del laboratorio 1-4 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, por su apoyo y consejos durante mi estancia en el, y por compartir el gusto por trabajar la química de los hongos endófitos.

A mis compañeros y amigos del Programa de Maestría por sus convivencias. En especial al M. en C. Gerardo Padierna Jiménez, por sus consejos y las agradables convivencias.

Finalmente, pero no menos importante, a las Dra. Bertha Tlapal Bolaños y Olga Gómez del Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México, por la donación de los hongos fitopatógenos.

## Dedicatoria

A mi familia, a quienes amo y admiro por su esfuerzo, perseverancia, y sobre todo, por darme su apoyo y lo necesario para ser feliz.

A mis amigos, sin su amistad, la vida no sería alegre.

---

## Contenido

	Página
<b>Lista de abreviaturas</b>	xii
<b>Lista de figuras</b>	xv
<b>Lista de cuadros</b>	xxiii
<b>I. Resumen</b>	1
<b>II. Abstract</b>	2
<b>III. Introducción</b>	3
<b>IV. Antecedentes</b>	5
1. Problemas actuales que enfrenta la agricultura mundial	5
2. Presencia de enfermedades en los cultivos agrícolas	6
3. Hongos fitopatógenos con importancia agrícola	7
3.1. <i>Alternaria alternata</i>	8
3.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	9
4. Oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola	12
4.1. <i>Phytophthora capsici</i>	13
4.2. <i>Pythium aphanidermatum</i>	15
5. Uso de agroquímicos sintéticos para el control de plagas y enfermedades de las plantas	16
5.1. Uso de fungicidas en el control de enfermedades de las plantas	17
6. Resistencia a los fungicidas comerciales y sus limitaciones de uso	19
7. Uso de productos naturales y agentes de control biológico como alternativas para la protección de cultivos	20
7.1. Importancia de los productos naturales como fuente de	20

---

compuestos novedosos útiles en agricultura	
8. Microorganismos endófitos	26
8.1. Interacciones químico-ecológicas entre plantas y hongos	26
9. Métodos tradicionales en el estudio de hongos endófitos para el aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos	33
10. Hongos endófitos con potencial antagónico aislados de <i>Mimosa affinis</i> y de <i>Sapium macrocarpum</i>	34
<b>V. Hipótesis</b>	39
<b>VI. Objetivos</b>	40
1. Objetivo general	40
2. Objetivos particulares	40
<b>VII. Desarrollo experimental</b>	42
1. Hongos endófitos de <i>M. affinis</i> y <i>S. macrocarpum</i>	42
2. Métodos para el cultivo de hongos endófitos	42
3. Cultivo de los hongos endófitos en medio líquido CPD	43
4. Obtención de los extractos orgánicos	43
5. Análisis cromatográfico en capa fina de los extractos orgánicos	44
6. Evaluación del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos	44
7. Selección de las mejores condiciones de cultivo del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13 con potencial antifúngico y antioomiceto	46
8. Cultivo del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13 a mayor escala empleando las mejores condiciones de crecimiento	47
9. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto total de medio de cultivo del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13	47



## Contenido

---

---

9.1. Obtención de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34)	48
10. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto total de micelio del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13	49
10.1. Obtención de la 6,11-dihidroxi-3,8-dimetoxi-1-metilbenzo[b]xanton-7,10,12-triona (35) o bikaverina	49
11. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos 9, 34 y 35	50
12. Determinación de la concentración inhibitoria media (CI50) sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba	51
13. Determinación del mecanismo de acción de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34), sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura	54
12.1. Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre las características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos fitopatógenos de prueba	54
12.2. Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la permeabilidad de la membrana celular y sobre la respiración	
12.3.1. Obtención de las disoluciones de prueba	55
12.3.2. Obtención del micelio húmedo de los cuatro microorganismos fitopatógenos	57
12.3.3. Efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos fitopatógenos de prueba	57
12.3.4. Efecto sobre la respiración de los microorganismos fitopatógenos de prueba	58
<b>VIII. Resultados y Discusión</b>	<b>60</b>
1. Cultivo en pequeña escala de los hongos endófitos cultivables <i>in vitro</i> de las especies <i>M. affinis</i> y <i>S. macrocarpum</i>	60

2. Evaluación del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura	63
3. Selección y determinación de la mejor condición de cultivo del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13	67
4. Cultivo a mayor escala del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13 y estudio químico biodirigido de sus extractos orgánicos	71
5. Aislamiento, purificación y caracterización estructural de los compuestos responsables de la actividad biológica	74
5.1. Caracterización de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )	74
5.2. Caracterización de 6,11-dihidróxi-3,8-dimetoxi-1-metil benzo[b]xanton-7,10,12-triona ( <b>35</b> ) o bikaverina	78
5.3. Actividad biológica reportada de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ), 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) y bikaverina ( <b>35</b> )	81
6. Determinación del mecanismo de acción de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ), del hongo <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13, sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola	85
6.1. Efecto de la concentración de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) sobre el crecimiento micelial y la morfología macro y microscópica de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola	86
6.1.1. Efecto de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) sobre las características macro y microscópicas del micelio de <i>P. capsici</i>	91
6.1.2. Efecto de los compuestos <b>9</b> y <b>34</b> sobre las características macro y microscópicas del micelio de <i>P. aphanidermatum</i>	94

## Contenido

---

---

6.1.3	Efecto de los compuestos <b>9</b> y <b>34</b> sobre las características macro y microscópicas del micelio de <i>A. alternata</i>	100
6.1.4	Efecto de los compuestos <b>9</b> y <b>34</b> sobre las características macro y microscópicas del micelio de <i>F. oxysporum</i>	106
6.2.	Efecto de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) sobre la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura	112
6.3.	Efecto de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9, 10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) sobre la respiración de los microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura	117
<b>IX. Conclusiones</b>		128
<b>X. Referencias bibliográficas</b>		131
<b>Anexo. Espectrometría y espectroscopía</b>		
<b>Espectro 1.</b> Espectro de masas del ácido fusárico ( <b>9</b> ) obtenido por la técnica de impacto electrónico.		144
<b>Espectro 2.</b> Espectro en el IR del ácido fusárico ( <b>9</b> ).		145
<b>Espectro 3.</b> RMN <sup>13</sup> C del ácido fusárico ( <b>9</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).		146
<b>Espectro 4.</b> RMN-DEPT-90 del ácido fusárico ( <b>9</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).		147
<b>Espectro 5.</b> RMN-DEPT-135 del ácido fusárico ( <b>9</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )		148
<b>Espectro 6.</b> RMN <sup>1</sup> H del ácido fusárico ( <b>9</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).		149
<b>Espectro 7.</b> Espectro HSQC del ácido fusárico ( <b>9</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).		150
<b>Espectro 8.</b> Espectro de masas del ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) obtenido por la técnica de impacto electrónico.		151
<b>Espectro 9.</b> Espectro en el IR del ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ).		152
<b>Espectro 10.</b> RMN <sup>13</sup> C del ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).		153

---

<b>Espectro 11.</b> RMN-DEPT-90 del ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	154
<b>Espectro 12.</b> RMN-DEPT-90 del ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	155
<b>Espectro 13.</b> RMN <sup>1</sup> H del ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	156
<b>Espectro 14.</b> Espectro HSQC del ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	157
<b>Espectro 15.</b> Espectro de masas de la bikaverina ( <b>35</b> ) obtenido por la técnica de impacto electrónico.	158
<b>Espectro 16.</b> Espectro en el IR de la bikaverina ( <b>35</b> ).	159
<b>Espectro 17.</b> RMN <sup>13</sup> C de la bikaverina ( <b>35</b> ) (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	160
<b>Espectro 18.</b> Espectro HSQC editado de la bikaverina ( <b>35</b> ) (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). CH y CH <sub>3</sub> se muestran en escala de grises.	161
<b>Espectro 19.</b> RMN <sup>1</sup> H de la bikaverina ( <b>35</b> ) (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	162
<b>Espectro 20.</b> Espectro HMBC de la bikaverina ( <b>35</b> ) (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	163

---

## Lista de abreviaturas

<b>AcOH</b>	ácido acético
<b>AcOEt</b>	acetato de etilo
<b>CC</b>	cromatografía en columna abierta
<b>CCF</b>	cromatografía en capa fina de fase normal
<b>CCF-C<sub>18</sub></b>	cromatografía en capa fina de fase reversa
<b>CCFP-C<sub>18</sub></b>	cromatografía en capa fina preparativa de fase reversa
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	cloroformo deuterado
<b>CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D</b>	ácido trifluoroacético deuterado
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	diclorometano
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	acetonitrilo
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	metanol
<b>CI<sub>50</sub></b>	concentración inhibitoria media
<b>CPD</b>	medio caldo papa dextrosa
<b>CZM</b>	carbendazim
<b>δ<sub>C</sub></b>	desplazamiento químico de carbono
<b>δ<sub>H</sub></b>	desplazamiento químico de hidrógeno
<b>d</b>	señal doble
<b>ddt</b>	señal doble de doble de triple
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FRAC</b>	Comité de Acción para la Resistencia de Fungicidas
<b>g</b>	gramo
<b>h</b>	señal séxtuple

## Lista de abreviaturas

---

<b>HSQC</b>	espectroscopía de coherencia heteronuclear cuántica simple
<b>HMBC</b>	espectroscopía de correlación heteronuclear de enlace múltiple
<b>Hz</b>	hertz
<b>IE</b>	impacto electrónico
<b>IR</b>	infrarrojo
<b>I<sub>TC</sub></b>	inhibición de la tasa de consumo de oxígeno
<b>J</b>	constante de acoplamiento
<b>L</b>	litro
<b>m</b>	señal múltiple
<b>µg</b>	microgramos
<b>mg</b>	miligramos
<b>MHz</b>	megahertz
<b>mm</b>	milímetros
<b>mL</b>	mililitros
<b>µM</b>	micromolar
<b>MA</b>	medio arroz
<b>MX</b>	metalaxil
<b>t</b>	señal triple
<b>TC<sub>O<sub>2</sub></sub></b>	tasa de consumo de oxígeno
<b>PDA</b>	medio papa dextrosa agar
<b>ppm</b>	partes por millón (1 ppm = 1 µg/mL)
<b>q</b>	señal cuádruple
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	resonancia magnética nuclear de hidrógeno
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	resonancia magnética nuclear de carbono

## Lista de abreviaturas

---

<b>s</b>	señal simple
<b>s/seg</b>	segundo
<b>sp.</b>	sin especie
<b>spp.</b>	especies del género
<b>USEPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América

---

## Lista de figuras

- Figura 1.** Predicción del aumento de la población y de la demanda del consumo de cereales (Modificado de Maienfisch & Stevenson, 2015). 6
- Figura 2.** Ejemplos de enfermedades causadas por el hongo fitopatógeno *A. alternata*. (A) Moho negro del jitomate (*Solanum lycopersicum*). (B) Corazón mohoso del manzano (*Malus domestica*). 8
- Figura 3.** Fotografías del anverso (A) y reverso (B) de un cultivo de tres días en medio papa dextrosa agar (PDA) del hongo fitopatógeno *A. alternata*. Preparaciones en fresco del micelio teñidas con azul de lactofenol a 40x (C y D). (a) Conidióforo, (b) conidios individuales septados longitudinalmente, (c) conidios en cadena, (d) hifas dematiaceas e (e) hifas jóvenes no pigmentadas. 9
- Figura 4.** Toxinas producidas por la especie *A. alternata*. Tentoxina (1), ácido tenuazónico (2), alternariol (3), altenueno (4), altertoxina I (5), altertoxina II (6), altertoxina III (7). 10
- Figura 5.** Ejemplos de enfermedades causadas por el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. (A) Marchitez vascular del jitomate (*Solanum lycopersicum*). (B) Marchitez del frijol (*Phaseolus vulgaris*). (C) Infección del banano (*Musa paradisiaca*). 11
- Figura 6.** Fotografías del anverso (A) y reverso (B) de un cultivo de tres días en PDA del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. Preparaciones en fresco del micelio teñidas con rojo congo (C) y azul de lactofenol (D), respectivamente, a 40x. (a) Hifas septadas, (b) macroconidios y (c) microconidios. 11
- Figura 7.** Toxinas producidas por *Fusarium* sp., enniatina A (8), ácido fusárico (9), T-2 (10) y fumonisina B<sub>1</sub> (11). 12
- Figura 8.** Árbol filogenético que muestra las relaciones evolutivas entre las principales grupos de eucariotas. Los oomicetos y los hongos se destacan en recuadros (Modificado de Latijnhouwers *et al.*, 2003). 13



## Lista de figuras

---

- Figura 9.** Ejemplos de enfermedades causadas por el oomiceto fitopatógeno *P. capsici*. (A) Marchitamiento de chile morrón (*Capsicum annuum*). (B) Mildiú en calabaza (*Cucurbita pepo*). (C) Mildiú del jitomate (*Solanum lycopersicum*). 14
- Figura 10.** Fotografías del anverso (A) y reverso (B) de un cultivo de tres días en PDA del oomiceto fitopatógeno *P. capsici*. Preparaciones en fresco del micelio teñidas con rojo congo (C) y azul de lactofenol (D), respectivamente, a 40x. (a) Hifas cenocíticas, (b) esporangióforos y (c) esporangios. 14
- Figura 11.** Ejemplos de enfermedades causadas por el oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*. (A) Pudrición de sandía (*Citrullus lanatus*). (B) Pudrición de pepino (*Cucumis sativus*). 15
- Figura 12.** Fotografías del anverso (A) y reverso (B) de un cultivo de 24 horas en PDA del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*. Preparaciones en fresco del micelio teñidas con azul de lactofenol a 40x (C y D). (a) Hifas cenocíticas, (b) esporangio y (c) vesícula esporangial. 16
- Figura 13.** Contribución de los productos de protección de cultivos a las ventas en el mercado de agroquímicos en el año 2014 (Modificado de Maienfisch & Stevenson, 2015). 17
- Figura 14.** Principales mecanismos de acción de los fungicidas utilizados en la agricultura y algunas sustancias antifúngicas utilizadas en medicina. Las líneas discontinuas indican las estructuras, organelos y procesos metabólicos vitales de los hongos. Los sitios de acción de los diferentes fungicidas están señalados con líneas continuas. Se incluyen algunos compuestos antifúngicos de uso limitado (R) (Modificado de Deacon, 2006). 18

- Figura 15.** Compuestos basados en productos naturales (CBPN). Los CBPN incluyen a los productos naturales *per se* (PN), a los derivados semisintéticos (DSPN) y los compuestos sintéticos basados en producto natural (CSMPN). Los equivalentes sintéticos de producto natural (ESPN), son compuestos sintéticos con mecanismos similar a los productos naturales pero cuyo descubrimiento se realizó de forma diferente (Modificado de Sparks *et al.*, 2017). 21
- Figura 16.** Fungicidas basados en productos naturales (**A**) y basados en productos naturales y equivalentes sintéticos de productos naturales (**B**) (Modificado de Sparks *et al.* 2017). 22
- Figura 17.** Interpretación química-ecológica de las interacciones costo-beneficio entre plantas y hongos. Antagonismo balanceado (**A**), desarrollo de síntomas de enfermedad (**B**), reciprocidad endófito-fitopatógeno (**C**), estrategia de supervivencia de los endófitos (**D**), sinergismo balanceado (**E**), (Modificado de Kusari *et al.*, 2012). 28
- Figura 18.** Actividad antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum* sobre el crecimiento de *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, evaluados a 250 ppm. Las barras oscuras representan los extractos obtenidos del medio de cultivo y las claras los extractos obtenidos del micelio. (\*) Resultados estadísticamente significativos con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ,  $n=4$ ). Controles positivos Ridomil 4E® (MX) y Prozicar 50® (CZM) evaluados a 250 ppm. 65
- Figura 19.** Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum* sobre el crecimiento de *A. alternata* y *F. oxysporum*, evaluados a 250 ppm. Las barras oscuras representan los extractos obtenidos del medio de cultivo y las claras los extractos obtenidos del micelio. (\*) Resultados estadísticamente significativos con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ,  $n=4$ ). Controles positivos Ridomil 4E® (MX) y Prozicar 50® (CZM) evaluados a 250 ppm. 66

## Lista de figuras

---

- Figura 20.** Hongos endófitos aislados de *S. macrocarpum* con el mayor potencial antioomiceto y antifúngico a nivel de extractos orgánicos. 64
- Figura 21. (A y B)** Comparación de los rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 bajo diferentes condiciones. **(C)** Actividad antifúngica y antioomiceto de los diferentes extractos orgánicos, evaluados a la concentración de 250 ppm. (\*) Resultados estadísticamente significativos con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Controles positivos Prozicar 50® (CZM) y Ridomil 4E® (MX) evaluados a 250 ppm. 70
- Figura 22.** Actividades antifúngica y antioomiceto de las fracciones primarias obtenidas del medio de cultivo y del micelio del hongo *Fusarium* sp. aislamiento SME13 cultivado en medio CPD, bajo condiciones de incubación estáticas. Los bioensayos se realizaron a una concentración de 250 ppm. (\*) Resultados estadísticamente significativos con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Controles positivos Ridomil 4E® (MX) y Prozicar 50® (CZM). 73
- Figura 23.** Estructura de los ácidos fusárico **(9)** y 9,10-deshidrofusárico **(34)**. 77
- Figura 24.** Estructura de 6,11-dihidroxi-3,8-dimetoxi-1-metil-benzo[b]xanton-7,10,12-triona **(35)**, conocido como bikaverina. 81
- Figura 25.** Análogos del ácido fusárico **(9)** aislados de *Fusarium* spp. Éster metílico del ácido fusárico **(36)**, éster metílico del ácido 9,10-deshidrofusárico **(37)**, ácido 10,11-dihidroxfusárico **(38)**, análogo diácido del ácido fusárico **(39)**, ácido 10-hidroxi-11-clorofusárico **(40)**, fusaricato A **(41)**, fusaricato B **(42)**, fusaricato C **(43)**, fusaricato D **(44)**, fusaricato E **(45)**, fusaricato F **(46)** y fusaricato G **(47)**. 83

- Figura 26.** Efecto antimicrobiano de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, y sobre los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum*. Controles positivos: Captán 50® y Consist Max®. (\*) Resultados estadísticamente significativos ( $P < 0.05$   $n=4$ ). 88
- Figura 27.** Fotografía del micelio del cultivo control del oomiceto fitopatógeno *P. capsici* en PDA (A). Preparación en fresco del micelio teñido con rojo congo a 40x (B). Estructuras asexuales importantes del micelio de *P. capsici*: (a) hifas cenocíticas gruesas, (b) esporangióforo y (c) esporangios maduros de forma ovoides. 91
- Figura 28.** Fotografías del efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (30), y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del oomiceto fitopatógeno *P. capsici*, en las curvas concentración vs respuesta. 93
- Figura 29.** Fotografías de las preparaciones en fresco del oomiceto fitopatógeno *P. capsici* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido fusárico (9) a 5 ppm (E-H), PDA-CH<sub>3</sub>OH al 0.3% (I-L), ácido 9,10-deshidrofusárico a 5 ppm (34) (M-P). 94
- Figura 30.** Fotografía del micelio del cultivo control del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum* en PDA (A). Preparación en fresco del micelio teñida con azul de lactofenol a 40x (B). Estructuras asexuales importantes del micelio de *P. aphanidermatum*: (a) hifas cenocíticas, (b) esporangio globoso terminal y (c) vesícula esporangial. 95
- Figura 31.** Fotografías del efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*, en las curvas concentración vs respuesta. 96

## Lista de figuras

---

- Figura 32.** Fotografías de las preparaciones en fresco del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones de ácido fusárico (9). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido fusárico (9) a 5 (E-H), 10 (I-L), 15 (M-P), 20 (Q-T) y 25 ppm (U-X). 97
- Figura 33.** Fotografías de las preparaciones en fresco del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido 9,10-deshidrofusárico (34). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido 9,10-deshidrofusárico (34) a 5 (E-H), 10 (I-L), 15 (M-P), 20 (Q-T) y 25 ppm (U-X). 98
- Figura 34.** Fotografías de las preparaciones en fresco del micelio de *P. aphanidermatum* teñidas con rojo congo a 40x obtenidas a partir de los cultivos control y en presencia del ácido fusárico (9) y del ácido 9,10-deshidrofusárico (34), ambos a 10, 20 y 25 ppm. Las regiones dañadas de las hifas están rodeadas con líneas discontinuas. (a) Esporangios maduros, (b) esporangios inmaduros. 99
- Figura 35.** Fotografía del micelio del cultivo control del hongo fitopatógeno *A. alternata* (A). Preparación en fresco del micelio teñida con azul de lactofenol a 40x (B). Tipos de hifas presentes en *A. alternata*: (a) hifas dematiaceas septadas, (b) hifas jóvenes no pigmentadas. 101
- Figura 36.** Fotografías del efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *A. alternata*, en las curvas concentración vs respuesta. 102
- Figura 37.** Fotografías de las preparaciones en fresco del hongo fitopatógeno *A. alternata* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido fusárico (9). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido fusárico (9) a 50 (E-H), 100 (I-L) y 150 ppm (M-P). 103

- Figura 38.** Fotografías de las preparaciones en fresco del hongo fitopatígeno *A. alternata* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido 9,10-deshidrofusárico (34). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido 9,10-deshidrofusárico (34) a 50 (E-H), 100 (I-L), 150 (M-P), 200 (Q-T) y 250 ppm (U-X). 104
- Figura 39.** Preparaciones en fresco del micelio de *A. alternata* teñidas con azul de lactofenol a 40x obtenidas a partir de los cultivos control y en presencia de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) a 50 y 150 ppm. 105
- Figura 40.** Fotografía del micelio del cultivo control del hongo fitopatígeno *F. oxysporum* (A). Preparación en fresco del micelio teñida con azul de lactofenol a 40x (B). Estructuras asexuales importantes del micelio de *F. oxysporum*: (a) hifas delgadas y septadas, (b) macroconidios y (c) microconidios. 106
- Figura 41.** Fotografías del efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34), y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del hongo fitopatígeno *F. oxysporum*, en las curvas concentración vs respuesta. 108
- Figura 42.** Fotografías del micelio del hongo fitopatígeno *F. oxysporum* (A) en los cultivos control y en presencia de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) a 250 ppm. 109
- Figura 43.** Fotografías de las preparaciones en fresco del hongo fitopatígeno *F. oxysporum* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido fusárico (9). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido fusárico (9) a 50 (E-H), 100 (I-L), 150 (M-P), 200 (Q-T) y 250 ppm (U-X). 110
- Figura 44.** Fotografías de las preparaciones en fresco del hongo fitopatígeno *F. oxysporum* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido 9,10-deshidrofusárico (34). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido 9,10-deshidrofusárico (34) a 50 (E-H), 100 (I-L), 150 (M-P), 200 (Q-T) y 250 ppm (U-X). 111

## Lista de figuras

---

- Figura 45.** Preparaciones en fresco del micelio de *F. oxysporum* teñidas con rojo congo a 40x obtenidas a partir de los cultivos control y en presencia de (A) ácidos fusárico (9), y (B) ácido 9,10-deshidrofusárico (34), ambos a 250 ppm. 112
- Figura 46.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la permeabilidad de la membrana celular de los oomicetos *P. capsici* (A) y *P. aphanidermatum* (B). Control positivo: Consist Max®. (\*) Valores estadísticamente significativos. 115
- Figura 47.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la permeabilidad de la membrana celular del micelio de los hongos *A. alternata* (A) y *F. oxysporum* (B). Control positivo: Consist Max®. (\*) Valores estadísticamente significativos. 116
- Figura 48.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la tasa de consumo de oxígeno (TC<sub>O<sub>2</sub></sub>) del micelio del oomiceto fitopatógeno *P. capsici* a las 2, 4 y 6 h de incubación. 118
- Figura 49.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la tasa de consumo de oxígeno (TC<sub>O<sub>2</sub></sub>) del micelio del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum* a las 2, 4 y 6 h de incubación. 119
- Figura 50.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la tasa de consumo de oxígeno (TC<sub>O<sub>2</sub></sub>) del micelio del hongo fitopatógeno *A. alternata* a las 2, 4 y 6 h de incubación. 120
- Figura 51.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la tasa de consumo de oxígeno (TC<sub>O<sub>2</sub></sub>) del micelio del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* a las 2, 4 y 6 h de incubación. 121
- Figura 52.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (30) sobre la respiración del micelio de los oomicetos *P. aphanidermatum* (A) y *P. capsici* (B). Control positivo: Consist Max®. 124
- Figura 53.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la respiración del micelio de los hongos *A. alternata* (A) y *F. oxysporum* (B). Control positivo: Consist Max®. 125

---

## Lista de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Ejemplos de equivalentes sintéticos a productos naturales (ESPN) empleados actualmente en la agricultura (Modificado de Sparks <i>et al.</i> , 2017).	23
<b>Cuadro 2.</b> Productos naturales que tienen aplicación comercial como agentes de protección a cultivos (Copping <i>et al.</i> , 2007).	24
<b>Cuadro 3.</b> Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos aislados de hongos endófitos.	30
<b>Cuadro 4.</b> Hongos endófitos aislados de la planta <i>M. affinis</i> .	36
<b>Cuadro 5.</b> Hongos endófitos aislados de la planta <i>S. macrocarpum</i> .	37
<b>Cuadro 6.</b> Días de medición del crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba.	45
<b>Cuadro 7.</b> Condiciones de cultivo del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13.	46
<b>Cuadro 8.</b> Fraccionamiento primario del extracto de medio de cultivo CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOEt del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13 cultivado en medio CPD.	48
<b>Cuadro 9.</b> Fraccionamiento primario del extracto de micelio CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOEt del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13 cultivado en medio CPD.	50
<b>Cuadro 10.</b> Concentraciones empleadas de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) y del control positivo Captán 50® para la obtención de los valores de CI <sub>50</sub> sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba.	52
<b>Cuadro 11.</b> Concentraciones empleadas del control positivo Consist Max® para la obtención de los valores de CI <sub>50</sub> sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba.	53



## Lista de cuadros

---

<b>Cuadro 12.</b> Concentraciones de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ), 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) y del control positivo para los bioensayos de permeabilidad de la membrana celular.	56
<b>Cuadro 13.</b> Concentraciones de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ), 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) y del control positivo para los bioensayos de respiración.	56
<b>Cuadro 14.</b> Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos aislados de <i>M. affinis</i> , derivados de cultivos en pequeña escala.	61
<b>Cuadro 15.</b> Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos aislados de <i>S. macrocarpum</i> , derivados de cultivos en pequeña escala.	62
<b>Cuadro 16.</b> Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito <i>Fusarium</i> sp. aislamiento SME13.	74
<b>Cuadro 17.</b> Datos espectroscópicos de RMN $^{13}\text{C}$ y $^1\text{H}$ a 100 MHz y 400 MHz, respectivamente, de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) en $\text{CDCl}_3$ ( $\delta$ en ppm).	77
<b>Cuadro 18.</b> Datos espectroscópicos de RMN $^{13}\text{C}$ y $^1\text{H}$ a 175 MHz y 700 MHz, respectivamente, del compuesto <b>35</b> en $\text{CDCl}_3$ ( $\delta$ en ppm).	80
<b>Cuadro 19.</b> Concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) en ppm de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola.	89
<b>Cuadro 20.</b> Concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) en $\mu\text{M}$ de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola.	90
<b>Cuadro 21.</b> Concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) expresada en ppm de los ácidos fusárico ( <b>9</b> ) y 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> ) sobre la respiración del micelio de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura.	126

**Cuadro 22.** Concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) expresada en  $\mu\text{M}$  de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre la respiración del micelio de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura

127



---

## I. Resumen

El presente trabajo describe la investigación sobre el potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos cultivables de las plantas *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*. Dichas especies fueron colectadas en una zona altamente biodiversa bajo un criterio ecológico. Asimismo, este trabajo trata del estudio químico biodirigido del hongo *Fusarium* sp. SME13 aislado de *S. macrocarpum*, y tiene como objetivo el aislamiento de compuestos orgánicos que conduzcan al desarrollo de plaguicidas alternativos.

Se evaluó la actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de los hongos endófitos sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos: dos hongos, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*; y dos oomicetos, *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*. Dichas especies son causantes de pérdidas económicas en cultivos con importancia agrícola. Este estudio demostró que los extractos orgánicos de los hongos endófitos poseen una mayor actividad antioomiceto que antifúngica.

Lo anterior permitió seleccionar el hongo *Fusarium* sp. SME13 de *S. macrocarpum* para su estudio químico biodirigido. Como resultado, se aislaron los ácidos fusárico y 9,10-deshidrofusárico y la bikaverina. Los ácidos inhibieron el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba, por lo que contribuyen a la actividad antifúngica y antioomiceto observada a nivel de extracto.

De manera adicional, los ácidos orgánicos aislados modifican las características del micelio y la forma de las hifas de los microorganismos fitopatógenos de prueba, así como alteraciones en la permeabilidad de su membrana celular y la inhibición de su respiración, con un efecto mayor sobre los oomicetos.

Finalmente, la presente investigación contribuye al conocimiento de los hongos endófitos aislados de plantas que crecen en zonas altamente biodiversas del país, además de que pone de manifiesto la importancia del estudio de los productos naturales endofíticos en el descubrimiento de compuestos con potencial uso como agroquímicos alternativos.

---

## II. Abstract

The present work describes the research on the antifungal and antioomycete potential of the organic extracts of the cultivable endophytic fungi of the plants *Mimosa affinis* and *Sapium macrocarpum*. These species were collected in a highly biodiverse area under an ecological strategy. Also, this work deals of bioassay guided chemical study of the fungus *Fusarium* sp. SME13 isolated from *S. macrocarpum*, and aims to isolate organic compounds that lead to the development of alternative pesticides.

The antifungal and antioomycete activity of the organic extracts of culture medium and mycelium of the endophytic fungi were evaluated on the growth of four phytopathogenic microorganisms: two fungi, *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*; And two oomycetes, *Phytophthora capsici* and *Pythium aphanidermatum*. These species cause economic losses in crops of agricultural importance. This study demonstrated that the organic extracts of the endophyte fungi have a higher antioomycete than antifungal activity.

This allowed the selection of the fungus *Fusarium* sp. SME13 of *S. macrocarpum* for its bioassay chemical study. As a result, fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and bikaverine were isolated. Acids inhibited the growth of phytopathogenic test organisms, thus contributing to the antifungal and antioomycete activity observed at the extract level.

Additionally, the isolated organic acids modify the characteristics of the mycelium and the shape of the hyphae of the test phytopathogenic microorganisms, as well as alterations in the permeability of their cellular membrane and the inhibition of their respiration, with a greater effect on the oomycetes.

Finally, the present research contributes to the knowledge of isolated endophytic fungi of plants growing in highly biodiverse areas of the country, in addition to highlighting the importance of the study of endophytic natural products in the discovery of compounds with potential use as alternative agrochemicals.

---

### III. Introducción

A lo largo de la historia, la agricultura mundial ha enfrentado problemas relacionados al suministro de alimentos y la calidad de los mismos. Una de las principales causas de la disminución en el rendimiento de los cultivos agrícolas, es el daño generado por la presencia de enfermedades, en especial causadas por hongos y oomicetos fitopatógenos, plagas y malezas, los cuales han sido más severos como consecuencia del cambio climático (Agrios, 2004; FAO, 2008).

Los agroquímicos sintéticos son y seguirán siendo un componente principal en la protección y cuidado de cultivos con importancia comercial. Sin embargo, en las últimas décadas la aplicación excesiva e inadecuada de los agroquímicos comúnmente empleados, ha generado problemas de resistencia en los organismos blancos y la aparición de especies más nocivas. De manera adicional, una gran cantidad de estas sustancias químicas han demostrado ser tóxicas para los microorganismos y animales no-blancos e inclusive, para los seres humanos expuestos, y provocar daños severos al ambiente (Villaverde *et al.*, 2016; Jang, 2016; Leadbeater, 2011; Agrios, 2004).

En este sentido, los productos naturales han tenido un impacto significativo en el descubrimiento de moléculas novedosas y prototipos estructurales para el desarrollo de bioplaguicidas y plaguicidas con potencial uso en la agricultura moderna (Sparks *et al.* 2017). De los productos naturales, los biosintetizados por hongos y, en particular los producidos por los endófitos, constituyen una fuente importante de productos naturales, debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos debido a las interacciones químico-ecológicas que se establecen entre las plantas hospedadoras y sus hongos endófitos (Kusari *et al.*, 2012; Gould, 2009; Magan & Aldred, 2008; Zhang *et al.*, 2006).

La investigación que se ha generado hasta el momento sobre hongos endófitos, ha permitido establecer estrategias para optimizar el proceso de obtención de metabolitos secundarios bioactivos, las cuales abarcan desde el aislamiento de los hongos de sus plantas hospedadoras hasta los bioensayos preliminares para la búsqueda de sustancias bioactivas (Yu *et al.*, 2010; Suryanarayanan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006).

En este contexto, la presente investigación pretende contribuir al desarrollo de nuevos agentes antifúngicos y antioomicetos de origen natural, útiles en la agricultura moderna, a través de la evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos orgánicos de hongos

endófitos aislados de las plantas *Mimosa affinis* y *Sapium macrocarpum*, sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura, y el posterior estudio químico biodirigido de uno de los hongos endófitos con mayor potencial antifúngico y antioomiceto, con el objetivo de aislar y caracterizar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica.

---

## IV. Antecedentes

### 1. Problemas actuales que enfrenta la agricultura mundial

La agricultura mundial ha enfrentado problemas relacionados al abastecimiento insuficiente y la baja calidad de los alimentos, debido a la mayor demanda de estos y a la disminución del rendimiento de los cultivos ocasionado por la presencia de enfermedades causados por microorganismos, plagas y malezas (Maienfisch & Stevenson, 2015; Agrios, 2004).

Con respecto a las enfermedades y plagas, el cambio climático ha modificado su distribución geográfica, los cultivos que pueden infectar o atacar y la severidad con la que lo hacen (FAO, 2008). De manera adicional, el uso irracional de los plaguicidas sintéticos, ha generado que muchos de los agentes causantes de enfermedades en los cultivos, desarrollen resistencia a los productos comúnmente empleados para su control (Villaverde *et al.*, 2016; Leadbeater, 2011). En los puntos siguientes se abordarán con mayor detalle cada uno de los problemas implicados en la agricultura mundial.

De acuerdo al análisis realizado en 2015 por Maienfisch y Stevenson de las compañías Syngenta Crop Protection y DuPont Crop Protection, respectivamente, con datos obtenidos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, siglas de Food and Agriculture Organization of United Nations), para el año 2050, se prevé que la población mundial habrá aumentado a 9 mil millones de habitantes, con una tendencia al aumento del consumo cereales (**Figura 1**), lo que impulsará la mayor demanda de alimentos. Sin embargo, de acuerdo a la valoración de la situación agrícola actual, es probable que en el futuro, la producción sea insuficiente para cubrir la cantidad de alimentos necesaria, resultando como consecuencia, casos de mala nutrición a nivel global (Maienfisch & Stevenson, 2015).



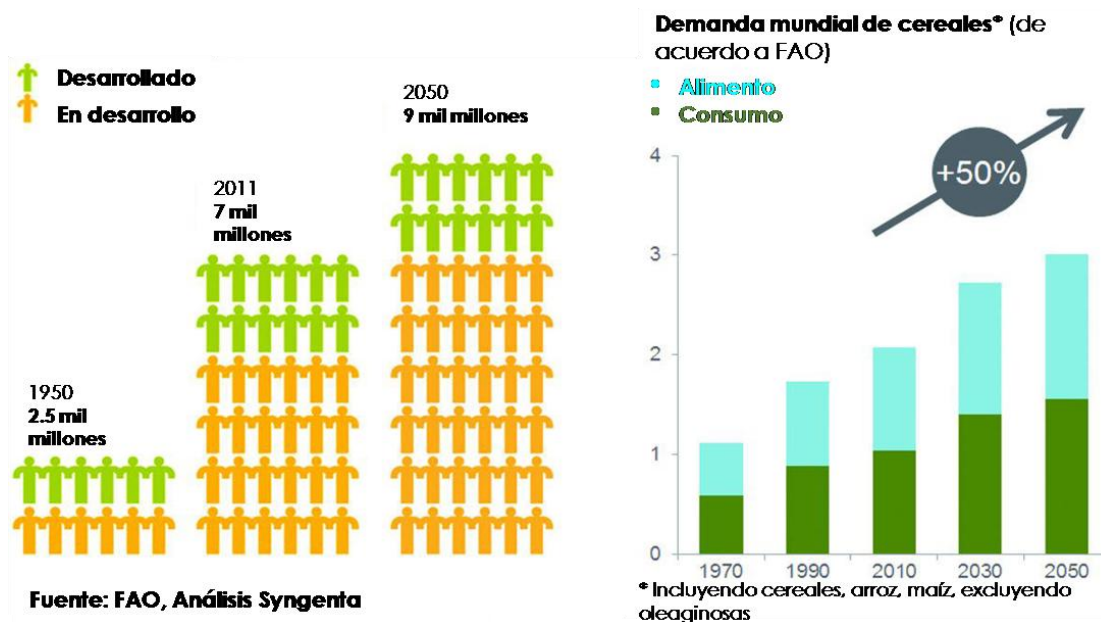


Figura 1. Predicción del aumento de la población y de la demanda del consumo de cereales (Modificado de Maienfisch & Stevenson, 2015).

## 2. Presencia de enfermedades en los cultivos agrícolas

Los agentes que causan enfermedades en las plantas, son los mismos o muy similares a aquellos que causan enfermedades en humanos y animales, éstos son virus, bacterias, hongos, protozoarios y nematodos. Todos ellos, reducen la cantidad y la calidad de los alimentos, al punto de hacerlos inconsumibles. En consecuencia, provocan un aumento de los precios en el mercado de los productos agrícolas (FAO, 2008; Agrios, 2004).

Las enfermedades de las plantas pueden definirse como la serie de repuestas visibles e invisibles de las células y tejidos vegetales, contra un organismo patógeno o factor ambiental que provoca cambios adversos en la forma, función o integridad de la planta, y que puede deteriorar o matar a la planta (Agrios, 2004).

Los hongos y los oomicetos fitopatógenos son dos de los microorganismos que atacan con mayor frecuencia a los cultivos y que causan mayores pérdidas a nivel mundial (Agrios, 2004).

Existe un número elevado de hongos fitopatógenos tanto en ecosistemas naturales como agrícolas, y virtualmente todas las especies de plantas son vulnerables a uno o más

## Antecedentes

---

patógenos. Los hongos fitopatógenos pueden producir factores de virulencia que les facilitan la infección, como enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios, reguladores del crecimiento y polisacáridos de adhesión, y a la vez, que desencadenen la respuesta de defensa de la planta. Estos factores de virulencia o efectores pueden producirse de manera constitutiva, es decir, durante el transcurso normal del crecimiento o de manera inducible, cuando crecen en ciertos sustratos tales como sus plantas hospederas (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Kamoun, 2009; Agrios, 2004).

Los metabolitos secundarios biosintetizados por los microorganismos fitopatógenos, en múltiples ocasiones resultan altamente tóxicos por ser efectivos en muy baja concentración, por lo que también son denominados toxinas. Estas toxinas dañan las células de la hospedera ya sea alterando la permeabilidad de la membrana celular o mediante la inhibición de las enzimas involucradas en el metabolismo y/o interrumpiendo los procesos fisiológicos que mantienen a la planta y que conllevan al desarrollo de enfermedad (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Agrios, 2004).

### 3. Hongos fitopatógenos con importancia agrícola

Los hongos son ubicuos en la naturaleza, poseen un papel importante en la dinámica de los ecosistemas que habitan, y su capacidad para colonizar y ocupar nichos específicos ecológicos, está determinada por su habilidad para competir efectivamente contra otros microorganismos que conforman la comunidad (Gould, 2009; Magan & Aldred, 2008; Rodriguez & Redman, 1997). Es posible que la mayoría o todos los hongos puedan expresar múltiples estilos de vida. Por ejemplo, un gran número de hongos son parásitos de plantas y pueden causar muchas de las enfermedades con relevancia económica en plantas cultivadas en todo el mundo (Agrios, 2004).

Los hongos fitopatógenos comprenden un grupo amplio y divergente de géneros y especies (Agrios, 2004). Estos microorganismos pueden tener un número limitado de hospederas compatibles o alcanzar docenas de especies de plantas (Rodriguez & Redman, 1997). Los géneros de hongos fitopatógenos significativos incluyen *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Geotrichum*, *Sclerotinia* y *Rhizoctonia* (Correia *et al.*, 2016). Por su importancia agrícola, los hongos fitopatógenos *A. alternata* y *F. oxysporum* se emplearon como fitopatógenos blanco en la presente investigación.

### 3.1. *Alternaria alternata*

Las especies del género *Alternaria* pertenecen a la familia Dematiaceae y presentan una distribución mundial. La mayoría de las especies son saprobias, pero existen parásitas de plantas, animales y humanos. De las especies que parasitan plantas, *A. solani* y *A. alternata* atacan frutas y semillas, principalmente de la familia *Solanaceae* (**Figura 2**) (Herrera & Ulloa, 1998). Sus colonias son generalmente de color gris a negro, de textura lanosa, y con borde entero (Rakotonirainy, CRCC, 2017). Los conidios y las hifas son de color café oscuro; producen conidios en cuerpos fructíferos o esporóforos discretos obclavados<sup>1</sup>, multicelulares, septados longitudinal y transversalmente con apariencia de red, (**Figura 3**) (Pitt & Hocking, 2009; Herrera & Ulloa, 1998; Ulloa & Hanlin, 1978).

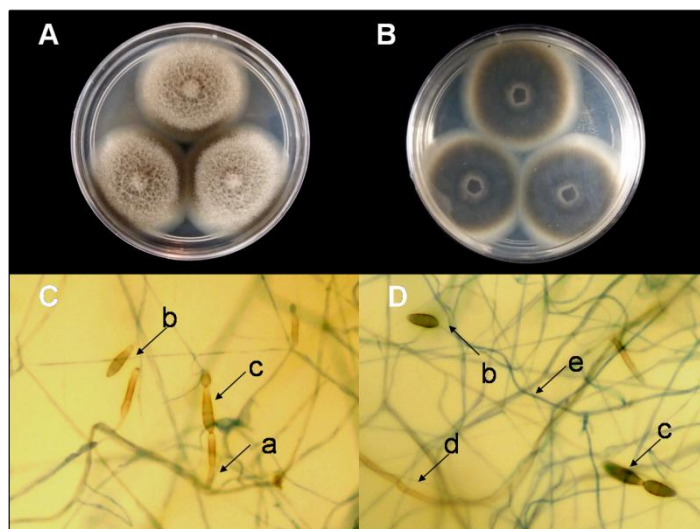
Los patotipos<sup>2</sup> de *A. alternata* atacan diferentes plantas hospederas, produciendo algunos compuestos que son tóxicos particularmente para su hospedera y que resultan contaminantes importantes de los alimentos (Agrios, 2004). La especie *A. alternata* puede producir micotoxinas como la tentoxina (1), el ácido tenuazónico (2), alternariol (3), el altenueno (4) y las altertoxinas I (5), II (6) y III (7) (Benavidez-Rozo *et al.*, 2014; Pitt & Hocking, 2009).



**Figura 2.** Ejemplos de enfermedades causadas por el hongo fitopatógeno *A. alternata*. (A) Moho negro del jitomate (*Solanum lycopersicum*). (B) Corazón mohoso del manzano (*Malus domestica*).

<sup>1</sup>Obclavado: estructura de soporte con un diámetro mayor en la parte basal que en la apical (Delgado *et al.* 2005).

<sup>2</sup>Patotipo: Poblaciones de la misma especie que difieren por su capacidad patogénica (Manners, 1993),



**Figura 3.** Fotografías del anverso (**A**) y reverso (**B**) de un cultivo de tres días en medio papa dextrosa agar (PDA) del hongo fitopatógeno *A. alternata*. Preparaciones en fresco del micelio teñidas con azul de lactofenol a 40x (**C** y **D**). (**a**) Conidióforo, (**b**) conidios individuales septados longitudinalmente, (**c**) conidios en cadena, (**d**) hifas dematiaceas<sup>3</sup> y (**e**) hifas jóvenes no pigmentadas.

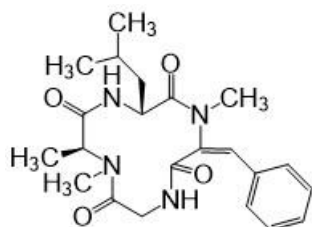
### 3.2. *Fusarium oxysporum*

El género *Fusarium* reúne una gran cantidad de especies que causan enfermedades graves en las plantas y en pacientes inmunocomprometidos. *Fusarium oxysporum* es una especie de amplia distribución geográfica, saprobia y patógena de muchas especies de plantas en las que produce principalmente marchitamiento vascular (**Figura 5**). *F. oxysporum* (**Figura 6**) es, sin duda, la especie más importante desde el punto de vista económico en el género *Fusarium*, debido a sus numerosas hospederas y el nivel de pérdidas que puede generar (Agrios, 2004; Leslie *et al.*, 2006).

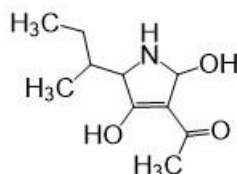
Las especies de *Fusarium* no sólo inactivan las sustancias tóxicas antipatógenos producidas por la hospedera, sino que también producen toxinas propias que aumentan su virulencia. Algunas de los metabolitos secundarios producidos por *Fusarium*, como la enniatina A (**8**) y el ácido fusárico (**9**), son fitotoxinas, es decir, son tóxicas para las plantas, mientras que otras, como las micotoxinas, T-2 (**10**) y la fumonisina B<sub>1</sub> (**11**), son tóxicas para los animales (Agrios, 2004).

<sup>3</sup>Hifas dematiaceas: hifas que presentan pigmento pardusco o negro (Romero-Cabello, 2007)

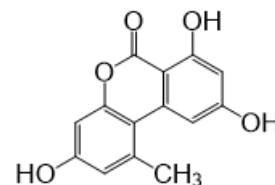
*Fusarium oxysporum* se compone de más de 120 patotipos según las hospederas que infectan. Cada una de ellas puede subdividirse en razas fisiológicas, las cuales muestran un patrón característico de virulencia en variedades diferenciadas de hospederas (Agrios, 2004).



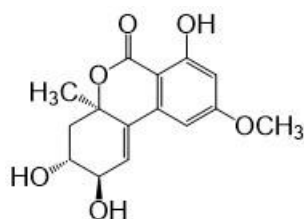
(1)



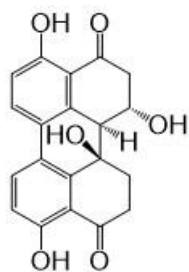
(2)



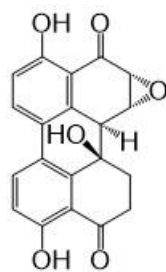
(3)



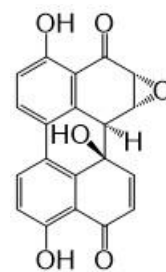
(4)



(5)

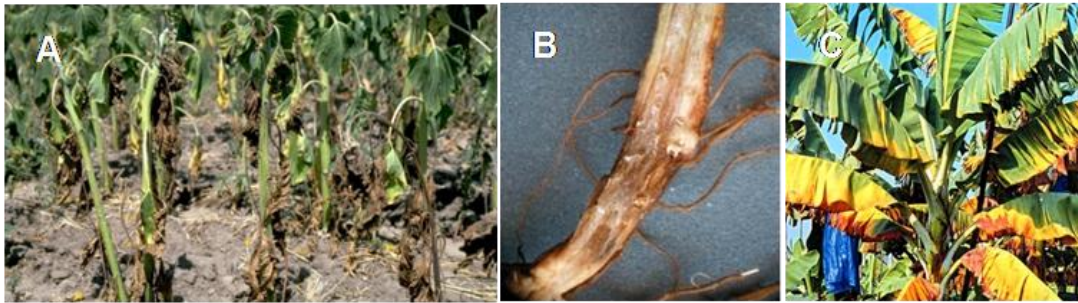


(6)

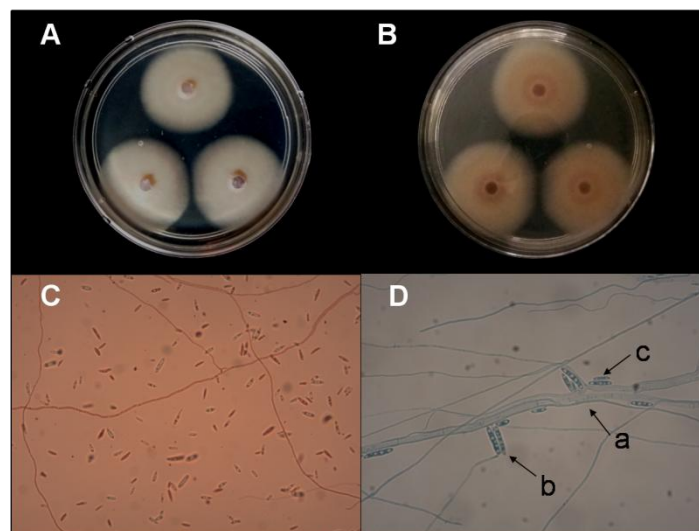


(7)

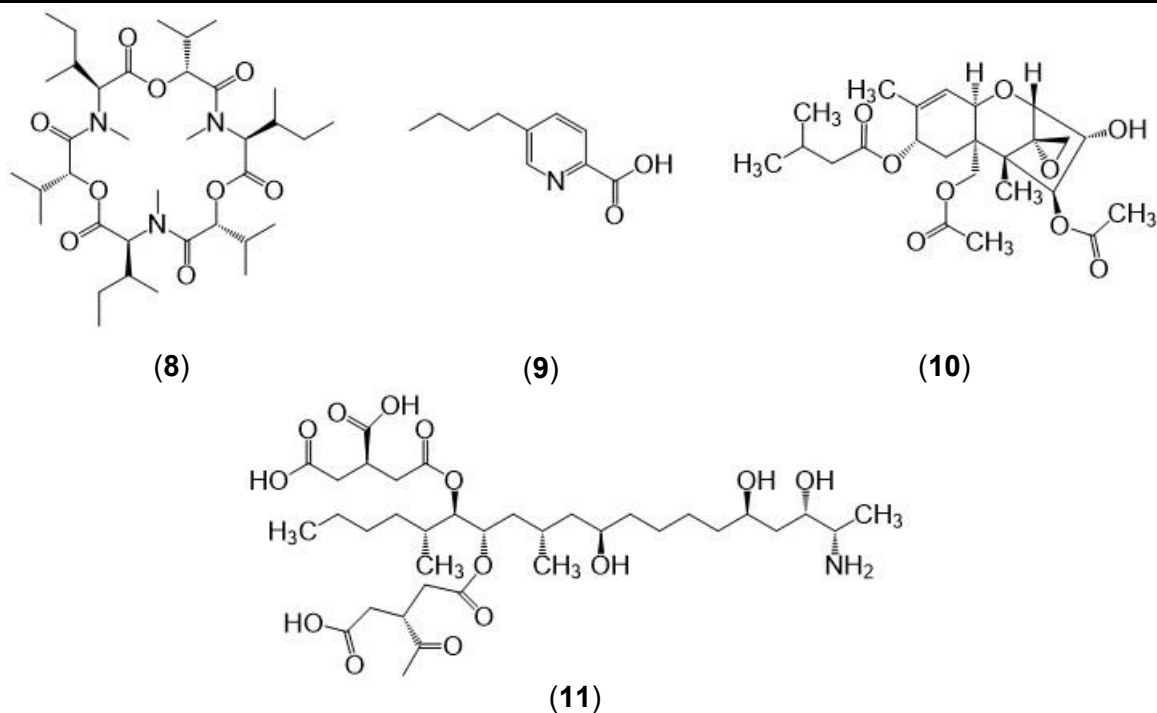
**Figura 4.** Micotoxinas producidas por la especie *A. alternata*. Tentoxina (1), ácido tenuazónico (2), alternariol (3), altenueno (4), altertoxina I (5), altertoxina II (6), altertoxina III (7).



**Figura 5.** Ejemplos de enfermedades causadas por el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. (A) Marchitez vascular del jitomate (*Solanum lycopersicum*). (B) Marchitez del frijol (*Phaseolus vulgaris*). (C) Infección del banano (*Musa paradisiaca*).



**Figura 6.** Fotografías del anverso (A) y reverso (B) de un cultivo de tres días en PDA del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. Preparaciones en fresco del micelio teñidas con rojo congo (C) y azul de lactofenol (D), respectivamente, a 40x. (a) Hifas septadas, (b) macroconidios y (c) microconidios.



**Figura 7.** Toxinas producidas por *Fusarium* sp., enniatina A (8), ácido fusárico (9), T-2 (10) y fumonisina B<sub>1</sub> (11).

#### 4. Oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola

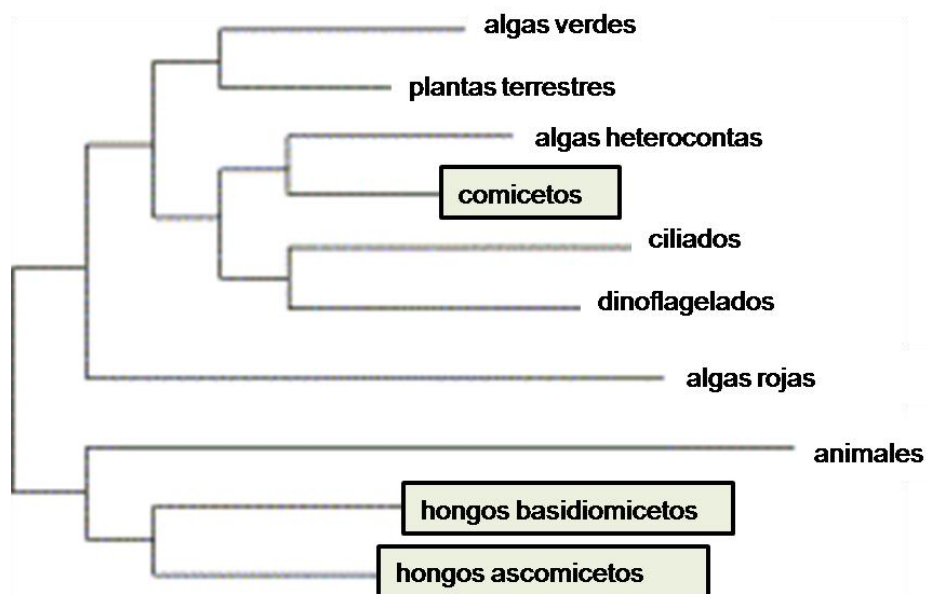
Los oomicetos son microorganismos similares a los hongos que por mucho tiempo fueron considerados como parte de este grupo, debido a que desarrollan micelio. Sin embargo, como se puede observar en las relaciones filogenéticas de la **Figura 8**, los oomicetos están más emparentados con las diatomeas y algas pardo-doradas, en el grupo de los estramenopilos o heteroconta<sup>4</sup>. Además, los oomicetos difieren de los hongos en que sus esporas son flageladas (zoosporas), son diploides en el estado vegetativo, sus hifas son cenocíticas, son parcialmente auxótrofos al esterol, utilizan una ruta biosintética diferente del aminoácido lisina y su pared celular se componen principalmente de glucanos y celulosa, y en menor proporción de quitina (Kamoun, 2009; Deacon, 2005; Latijnhouwers *et al.*, 2003).

La importancia de los oomicetos radica en que causan algunas de las enfermedades más devastadoras en los cultivos con importancia agrícola y plantas nativas (Kamoun, 2009;

<sup>4</sup>Heteroconta: El término hace referencia a la presencia de flagelos desiguales que es una característica del grupo (Des Abbayes *et al.*, 1989).

## Antecedentes

Deacon, 2005; Latijnhouwers *et al.*, 2003). En cultivos *in vitro*, los oomicetos desarrollan micelio conformado de hifas cilíndricas, muy ramificadas y cenocíticas, aunque en las hifas que han llegado a la vejez se pueden formar septos. Además, pueden producir estructuras de reproducción asexuales, esporangios, en los cuales se forman las zoosporas (**Figura 10 y 12**) (Herrera, 1998). Por su impacto negativo en la agricultura, los oomicetos fitopatógenos *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum* se utilizaron como fitopatógenos de prueba en la presente investigación.



**Figura 8.** Árbol filogenético que muestra las relaciones evolutivas entre los principales grupos de eucariotas. Los oomicetos y los hongos se destacan en recuadros (Modificado de Latijnhouwers *et al.*, 2003).

### 4.1. *Phytophthora capsici*

El género *Phytophthora* está extensamente estudiado; incluye más de 60 especies que causan pudriciones de raíces, pies y coronas, y manchas foliares en frutos de una amplia variedad de plantas herbáceas y leñosas (Kamoun, 2009; Shaw, 1988). *P. capsici* infecta una gama amplia de hospederas, incluyendo especies del género *Capsicum* y de la familia *Cucurbitaceae* (**Figura 9**), papa, berenjena y jitomate, entre otros. Los cultivos *in vitro* de *P. capsici* desarrollan micelio mullido<sup>5</sup> y finamente irradiado<sup>6</sup> (Stamps, 1984). En

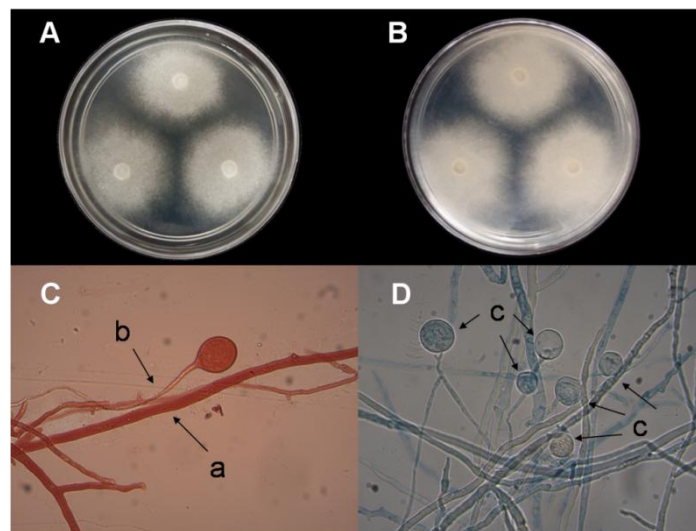
<sup>5</sup>Mullido: Blando, esponjoso.



México esta especie es importante porque causa grandes estragos en los chilares (*Capsicum annuum*) (Herrera, 1998).



**Figura 9.** Ejemplos de enfermedades causadas por el oomiceto fitopatógeno *P. capsici*. (A) Marchitamiento de chile morrón (*Capsicum annuum*). (B) Mildiú en calabaza (*Cucurbita pepo*). (C) Mildiú del jitomate (*Solanum lycopersicum*).



**Figura 10.** Fotografías del anverso (A) y reverso (B) de un cultivo de tres días en PDA del oomiceto fitopatógeno *P. capsici*. Preparaciones en fresco del micelio teñidas con rojo congo (C) y azul de lactofenol (D), respectivamente, a 40x. (a) Hifas cenocíticas, (b) esporangióforos y (c) esporangios.

<sup>6</sup>Irrradiado: Que tiene sus diversas partes dispuestas alrededor de un punto o de un eje, como los radios de una circunferencia.

### 4.2. *Pythium aphanidermatum*

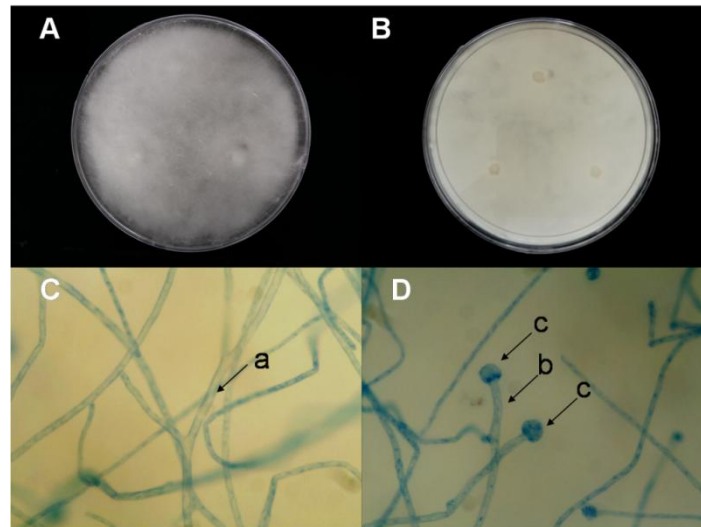
Las especies del género *Pythium* son cosmopolitas, la mayoría de ellas son saprobias facultativas que viven en suelos húmedos. Como se mencionó con anterioridad, muchas de estas especies pueden parasitar plantas causando enfermedades que impactan negativamente las actividades agrícolas. *Pythium aphanidermatum* infecta inicialmente la raíz, posteriormente, el patógeno puede moverse hacia otros tejidos mediante el sistema vascular de la planta causando una severa infección. Las enfermedades que puede producir son: marchitamiento o Damping-off<sup>7</sup> de plántulas, fuga algodonosa en cucurbitáceas (**Figura 11**) y pudrición de raíces y tallos de maíz. Esta especie puede atacar al tabaco, la remolacha azucarera, la caña de azúcar, la papaya, piña, jengibre, frijol y algodón (Kamoun, 2009; Herrera, 1998, Laundon, 1964).



**Figura 11.** Ejemplos de enfermedades causadas por el oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*. (A) Pudrición de sandía (*Citrullus lanatus*). (B) Pudrición de pepino (*Cucumis sativus*).

---

<sup>7</sup>Damping off: Las semillas y las plántulas son destruidas por los organismos del suelo antes (de la emergencia) o después que rompen la superficie del suelo (después de la brotación) (Agrios, 2004).



**Figura 12.** Fotografías del anverso (**A**) y reverso (**B**) de un cultivo de 24 horas en PDA del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*. Preparaciones en fresco del micelio teñidas con azul de lactofenol a 40x (**C** y **D**). (**a**) Hifas cenocíticas, (**b**) esporangio y (**c**) vesícula esporangial.

### 5. Uso de agroquímicos sintéticos para el control de plagas y enfermedades de las plantas

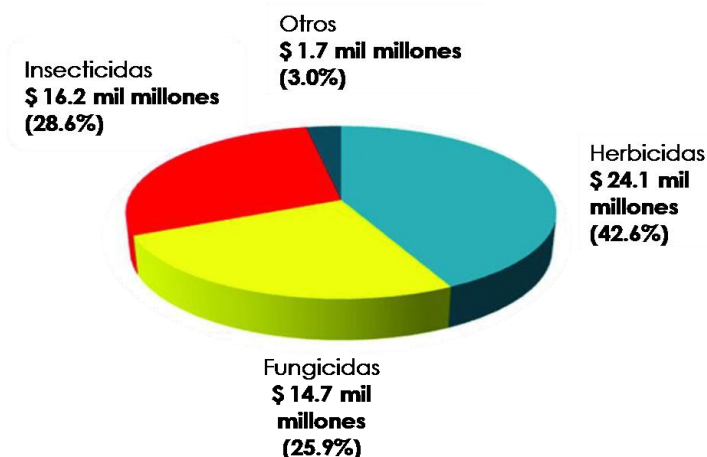
Los agroquímicos seguirán siendo un componente primordial en la protección y cuidado de cultivos con importancia comercial, así como para usos distintos al de la agricultura, por ejemplo, la jardinería y la preservación de maderas (Maienfisch & Stevenson, 2015).

Durante el siglo pasado, el control de las plagas y enfermedades dependió principalmente del uso de plaguicidas sintéticos (Villaverde *et al.*, 2016). La aplicación excesiva e inadecuada de plaguicidas sintéticos generó, por un lado, el aumento de casos de resistencia en los organismos objetivo o blanco y la aparición de especies más nocivas. Por otro lado, una gran cantidad de estas sustancias químicas demostraron ser tóxicas para los microorganismos y animales no-blanco e inclusive, para los seres humanos expuestos, lo que generó un elevado número de casos de toxicidad aguda y crónica. Además del daño a organismos vivos, los plaguicidas sintéticos han causado daños severos al ambiente, como la contaminación de suelos y depósitos naturales de agua (Villaverde *et al.*, 2016; Jang, 2016; Leadbeater, 2011; Agrios, 2004).

La producción de agroquímicos representa un sector importante en la economía mundial. En 2014, las ventas en el mercado de estos agentes, incluyendo herbicidas, insecticidas,

## Antecedentes

fungicidas, así como los productos de biotecnología, alcanzó 77.7 mil millones de dólares; únicamente los productos de protección de cultivos contribuyeron con 56.7 mil millones de dólares. De este valor, los herbicidas representaron el 42.6%, los insecticidas 28.6% y los fungicidas el 25.9% (**Figura 13**). Este análisis permite observar que los fungicidas representan uno de los grupos con mayor relevancia en el mercado de agroquímicos contribuyendo con 14.7 mil millones de dólares del valor total generado por los productos de protección de cultivos con importancia económica (Maienfisch & Stevenson, 2015).

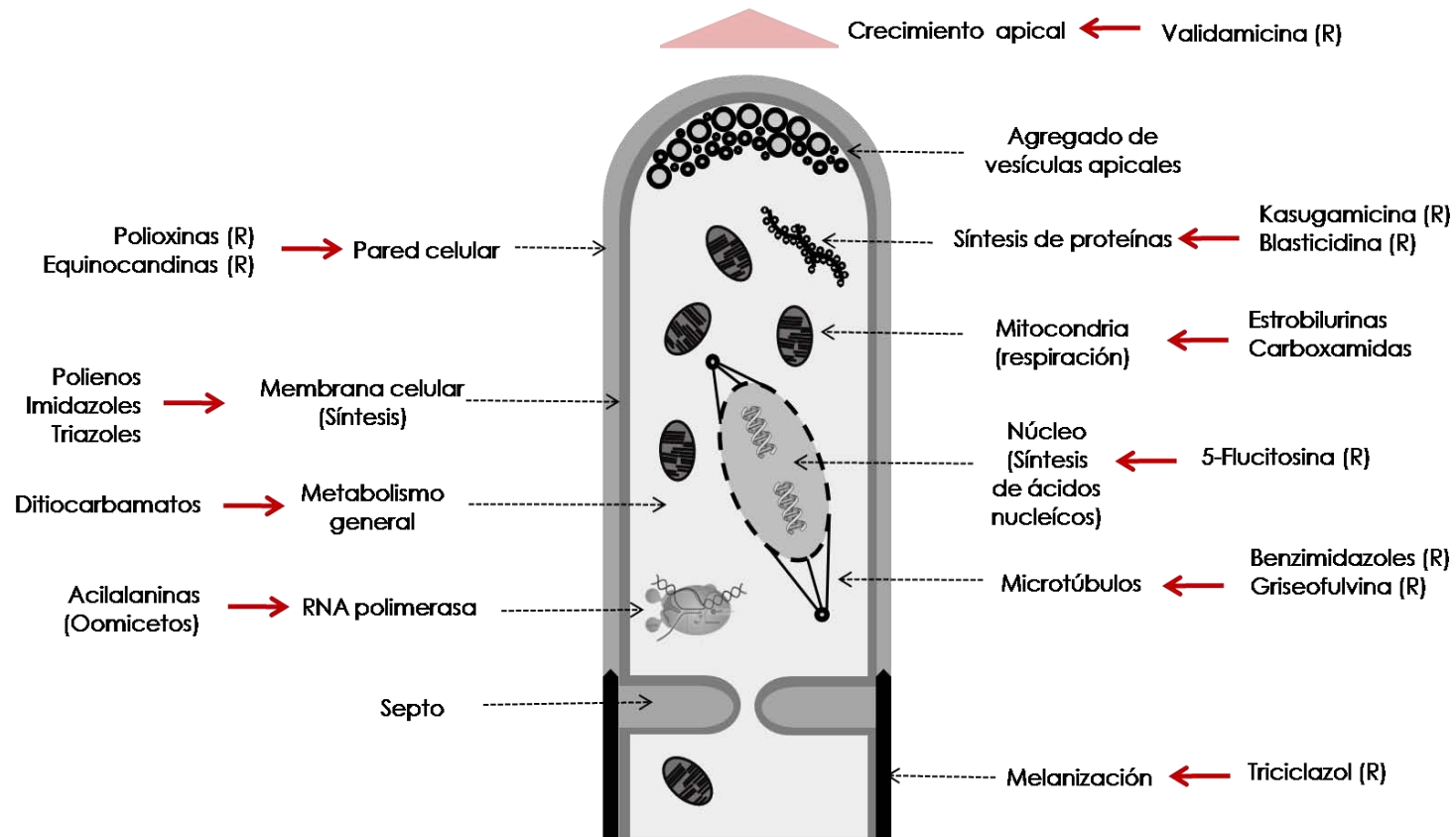


**Figura 13.** Contribución de los productos de protección a cultivos a las ventas en el mercado de agroquímicos en el año 2014 (Modificado de Maienfisch & Stevenson, 2015).

### 5.1. Uso de fungicidas en el control de enfermedades de las plantas

Los fungicidas se han utilizado por más de 200 años para proteger las plantas contra el ataque de los hongos fitopatógenos (Correia *et al.*, 2016). Estos compuestos agroquímicos son, y seguirán siendo, esenciales para mantener los altos rendimientos y la calidad de las cosechas (Correia *et al.*, 2016; Brent & Hollomon, 2007; Agrios, 2004).

Los fungicidas se pueden clasificar de acuerdo a su modo de acción y a su estructura química (Correia *et al.*, 2016; Agrios, 2004). Con respecto a su modo de acción, los fungicidas pueden eliminar a los hongos inhibiendo la síntesis de los componentes de la membrana celular, inactivando la función de enzimas o proteínas intracelulares o interfiriendo con procesos vitales, como la producción de energía o la respiración (**Figura 14**) (Sparks *et al.* 2017; Correia *et al.*, 2016; Agrios, 2004).



**Figura 14.** Principales mecanismos de acción de los antifúngicos utilizados en la agricultura y medicina. Las líneas discontinuas indican las estructuras, organelos y procesos metabólicos vitales de los hongos. Los sitios de acción de los diferentes fungicidas están señalados con líneas continuas. Se incluyen algunos compuestos antifúngicos de uso limitado (R) (Modificado de Deacon, 2006).

### 6. Resistencia a los fungicidas comerciales y sus limitaciones de uso

El problema de resistencia de los fungicidas, surge poco tiempo después a su introducción al mercado (Leadbeater, 2011). La resistencia no es inevitable y depende del impacto de los fungicidas sobre las poblaciones de patógenos (Hollomon, 2015). Algunos fungicidas como los ditiocarbamatos, benzimidazoles, dicarboximidias y fenilamidias (antioomicetos), presentan el riesgo de que sus fitopatógenos blanco desarrollen fácilmente resistencia. Otros fungicidas, como las estrobilurinas tienen que aplicarse en combinación con productos con diferente mecanismo de acción, por ejemplo, la mezcla trifloxistrobina-tebuconazol, para reducir la aparición de resistencia (Correia *et al.*, 2016; Deacon, 2005; Brent & Hollomon, 2007). El Comité de Acción para la Resistencia de Fungicidas (FRAC, por sus siglas en inglés „Fungicide Resistance Action Comitee“) trata de prolongar la eficacia de los fungicidas susceptibles de presentar problemas de resistencia y de limitar las pérdidas de los cultivos en caso de aparición de resistencia (Brent & Hollomon, 2007).

Gran parte de los plaguicidas sintéticos no cumplen con los criterios de seguridad establecidos y, como consecuencia, se ha limitado impresionantemente el número de productos disponibles para el manejo eficiente de insectos, malezas y enfermedades causadas por microorganismos (Leadbeater, 2011).

Los gobiernos de los países desarrollados han implementado programas que regulan el uso de agroquímicos. En Estados Unidos de América, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés „Environmental Protection Agency“) y la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA, por sus siglas en inglés „Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act“), regulan la producción, comercio y uso de los plaguicidas, con el objetivo de minimizar los riesgos asociados con la toxicidad en humanos y la degradación ambiental (EPA, 2015). Asimismo, a partir de 1993, la Unión Europea ha evaluado a la mayoría de las sustancias activas utilizadas en los productos agrícolas destinados a la protección de cultivos en Europa. Durante este proceso, se evaluó su seguridad con respecto a la salud de los consumidores, agricultores, residentes locales y ambulantes, y su efecto al ambiente en particular sobre las aguas subterráneas y los organismos distintos al blanco de acción, como las aves, los organismos acuáticos, mamíferos e insectos.

En México, el registro de los plaguicidas es llevado a cabo por tres dependencias federales: la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), encargada del impacto al ambiente, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), enfocada en la eficacia biológica de los productos para uso agrícola y la Comisión Federal para la Protección contra el Riesgo Sanitario (COFEPRIS), encargada de los aspectos sanitarios (SENASICA, 2016a, 2016b).

El abastecimiento constante de nuevos y diversos tipos de agentes químicos y de control biológico de enfermedades, y su cuidadosa introducción, se consideran estrategias claves contra la resistencia (Brent & Hollomon, 2007). Gran parte de la investigación moderna tiene como objetivo encontrar otros medios ecológicos para controlar las enfermedades de las plantas, principalmente aquellas con importancia económica (Agrios, 2004).

### **7. Uso de productos naturales y agentes de control biológico como alternativas para la protección de cultivos**

Actualmente, los enfoques más sobresalientes para proporcionar una gama amplia de opciones para el control de enfermedades y plagas en los cultivos, son el uso de agroquímicos con baja toxicidad y con menor persistencia ambiental, y de ser posible, con modos de acción novedosos o con nuevas dianas celulares. Además, del uso de compuestos inductores de resistencia adquirida sistémica (SAR) que activen los mecanismos de defensa de las plantas, tales como la producción de pared celular gruesa y proteínas antifúngicas, o bien de empleo de agentes de control biológico o antagonistas de los microorganismos que causan enfermedades en las plantas (Sparks *et al.* 2017; Villaverde *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2016; Hollomon, 2015; Maienfisch & Stevenson, 2015; Tamm *et al.*, 2011; Brent & Hollomon, 2007; Agrios, 2004).

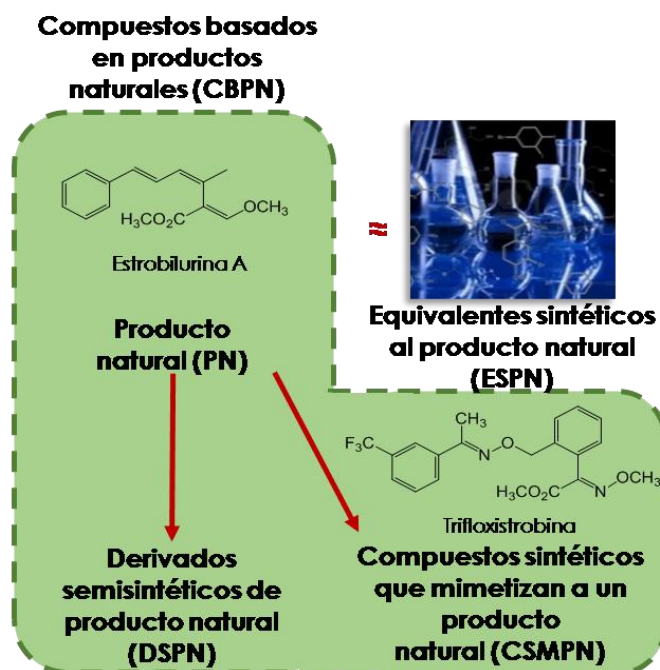
#### **7.1 Importancia de los productos naturales como fuente de compuestos novedosos útiles en agricultura**

Los productos naturales son aquellos compuestos aislados de plantas, hongos, bacterias, animales u otras fuentes naturales. Tanto los productos naturales como los organismos vivos productores de estos compuestos tienen un largo historial como agentes de

## Antecedentes

protección de cultivos, y han representado una fuente importante para el desarrollo de agroquímicos (Sparks *et al.*, 2017; Villaverde *et al.*, 2016).

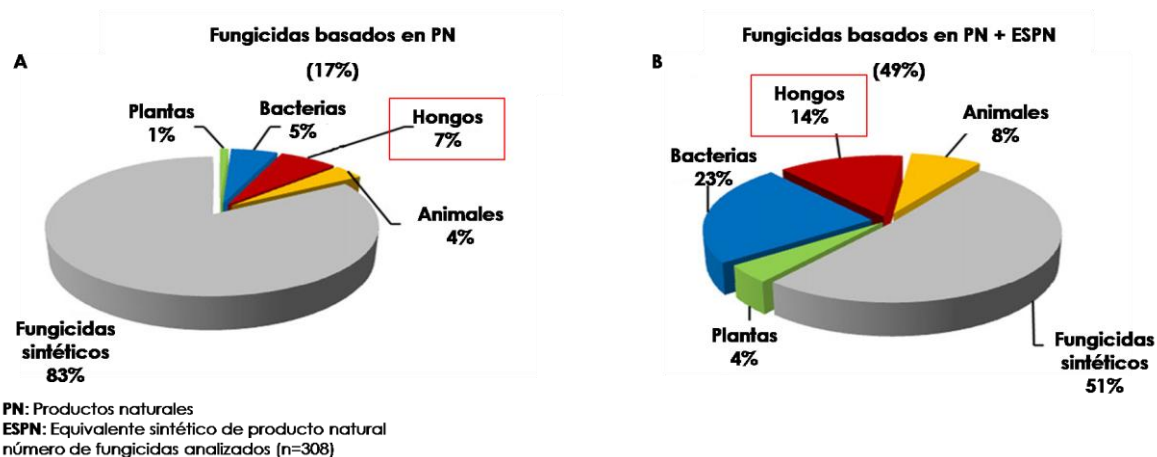
Los productos naturales (PN) pueden desarrollarse como productos *per se* para el desarrollo de bioplaguicidas (Gullino *et al.*, 2000) o como moléculas modelo para la síntesis de derivados semisintéticos (DSPN), o como inspiración para la síntesis de compuestos novedosos totalmente sintéticos que mimeticen a los productos naturales (CSMPN), con mejores características fisicoquímicas para su óptimo desempeño en el campo. En conjunto, los PN, DSPN y los CSMPN se pueden agrupar como compuestos basados en productos naturales (CBPN) (**Figura 15**). Además, existen productos sintéticos cuyo mecanismo de acción es similar al de los productos naturales (ESPN), sin embargo, su descubrimiento se realizó de manera distinta al de los productos naturales (**Cuadro 1**) (Sparks *et al.*, 2017).



**Figura 15.** Compuestos basados en productos naturales (CBPN). Los CBPN incluyen a los productos naturales *per se* (PN), a los derivados semisintéticos de producto natural (DSPN) y los compuestos sintéticos que mimetizan a un producto natural (CSMPN). Los equivalentes sintéticos de producto natural (ESPN), son compuestos sintéticos con mecanismos similar a los productos naturales pero cuyo descubrimiento se realizó de forma diferente (Modificado de Sparks *et al.*, 2017).




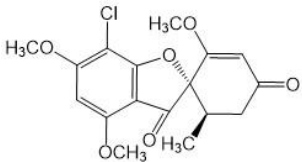
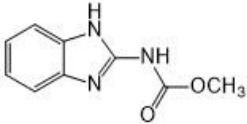

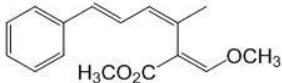
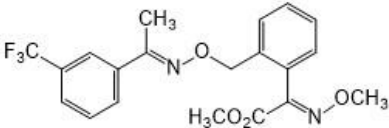

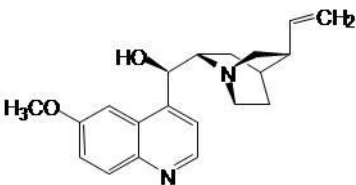
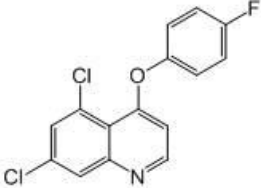

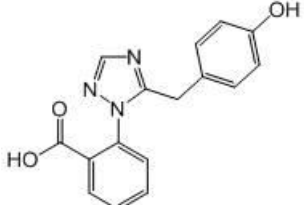
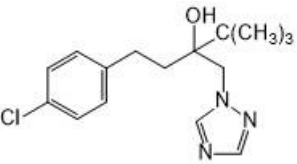
Por otra parte, el análisis realizado por Sparks y colaboradores (2017) demuestra la importancia de los compuestos basados en productos naturales en el desarrollo de fungicidas en la agricultura moderna (**Figuras 16A** y **16B**). Como parte de su análisis, resultó que de 308 fungicidas actualmente utilizados, el 17% de los fungicidas proceden de fuentes naturales (**Figura 16A**). Sin embargo, cuando se consideran los fungicidas basados en una fuente natural y los equivalentes sintéticos de productos naturales (ESPN), el impacto total de los productos naturales aumenta sustancialmente (**Figura 16B**), representando el 49% del número total de fungicidas. Además, demostró que la mayoría de los fungicidas basados en productos naturales son biosintetizados por microorganismos como bacterias y hongos, con un 23 y 14% respectivamente (Sparks *et al.*, 2017).



**Figura 16.** Fungicidas basados en productos naturales (**A**) y en productos naturales y equivalentes sintéticos de productos naturales (**B**) (Modificado de Sparks *et al.* 2017).

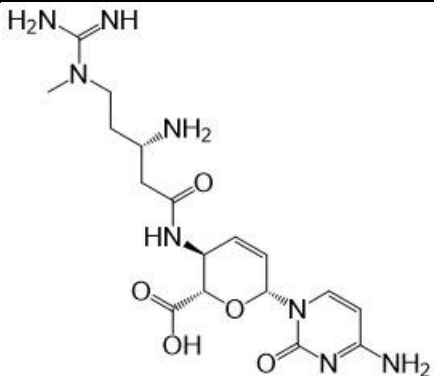
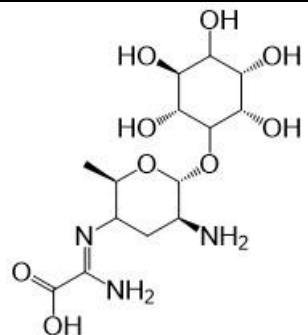
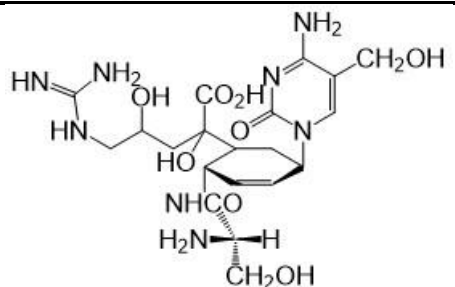
En el **Cuadro 2** se muestran algunos ejemplos de productos naturales que han encontrado una aplicación comercial como agentes de protección a cultivos. En este cuadro se muestran las estructuras químicas, el organismo del cual fueron aislados por primera vez, el mecanismo de acción y los principales organismos blanco (Copping *et al.*, 2007).

**Cuadro 1.** Ejemplos de equivalentes sintéticos de productos naturales (ESPN) empleados actualmente en la agricultura (Modificado de Sparks *et al.* 2017).

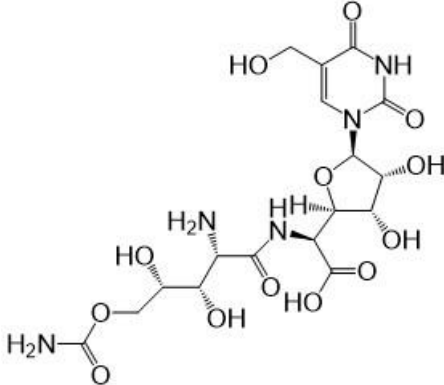
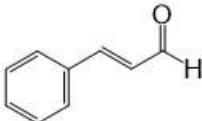
Fuente	Producto natural	Equivalente sintético	Tipo de fungicida	Blanco
 <i>Penicillium griseofulvum</i>	 Griseofulvina (12)	 Carbendazim (13)	Benzimidazoles metilcarbamatos	Ensamblaje de $\beta$ - tubulina durante la mitosis celular
 <i>Strobilurus tenacellus</i>	 Estrobilurina A (14)	 Trifloxistrobina (15)	Estrobilurinas	Complejo III: Citocromo bc1 (Sitio Q <sub>0</sub> I) en la respiración
 <i>Cinchona officinalis</i>	 Quinina (16)	 Quinoxifen (17)	Azanaftalenos	Germinación y formación de apresorio
 <i>Actinomadura spp.</i>	 Penipanoid A (18)	 Tebuconazol (19)	Triazoles	C14-desmetilasa en la síntesis de ergosterol

## Antecedentes

**Cuadro 2.** Productos naturales que tienen aplicación comercial como agentes de protección a cultivos (Copping *et al.*, 2007).

Tipo	Nombre	Estructura química	Fuente	Mecanismo de acción	Organismos blanco
Fungicida y bactericida	Blasticidina-S Bla-S® (20)		<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Inhibición de síntesis de proteínas	<i>Pyricularia oryzae</i> Cavara
Fungicidas y bactericida	Kasugamicina Kasumin® (21)		<i>Streptomyces kasugaensis</i>	Inhibición de síntesis de proteínas	<i>P. oryzae</i> <i>Cercospora</i> spp. <i>Venturia</i> spp.
Fungicida	Mildiomicina Mildiomicyn® (22)		<i>Streptoverticillium rimofaciens</i> B-98891	Inhibición de síntesis de proteínas	<i>Erysiphe</i> spp., <i>Uncinula necator</i> , <i>Podosphaera</i> spp. y <i>Sphaerotheca</i> spp.

**Cuadro 2.** Productos naturales que han encontrado una aplicación comercial como agentes de protección a cultivos (Continuación)  
(Copping *et al.*, 2007).

Tipo	Nombre	Estructura química	Fuente	Mecanismo de acción	Organismos blanco
Fungicida	Polioxina B Polybelin® (23)		<i>Streptomyces cacao</i> <i>i</i>	Inhibición de la biosíntesis de la pared celular.	<i>Sphaerotheca</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Alternaria</i> spp.
Fungicida	Cinamaldehído Vertigo® (24)		<i>Cassia tora</i> L.	Se ha sugerido que rompe la membrana celular	<i>Verticillium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Sclerotinia homeocarpa</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> var <i>subglutinans</i>

## 8. Microorganismos endófitos

A diferencia de los microorganismos patógenos de plantas, los microorganismos endófitos no causan síntomas de enfermedad. Por el contrario, algunos otorgan resistencia a patógenos en las plantas que habitan, induciendo la producción de defensas de la hospedera y/o mediante la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos. En plantas leñosas y pastos, los endófitos son capaces de producir micotoxinas que pueden beneficiar a sus hospederas, contra el ataque de herbívoros (Duringer *et al.*, 2013; Kusari *et al.*, 2012; Herre *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Deacon, 2005; Faeth, 2002).

La palabra endófito significa literalmente “dentro de la planta” (*endon*, dentro; *phyton*, planta) (Schulz & Boyle, 2005). Actualmente, el término endófito incluye a todos los microorganismos que, durante un periodo de tiempo variable de su vida, coloniza asintóticamente los tejidos internos de su hospedera. La colonización puede ocurrir en los diferentes órganos como raíces, tallos, hojas, semillas, frutos, y puede ocurrir inter o intracelularmente (Rodríguez *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006; Tan & Zou, 2001; Schulz *et al.*, 1999).

Se ha establecido que la colonización de las plantas terrestres por endófitos es ubicua, es decir, todas las plantas de la tierra están colonizadas por endófitos incluyendo aquellas que habitan en ambientes extremos. Se cree que cada una de las 300 000 especies de plantas vasculares que existen en la tierra, es hospedera de uno o más endófitos, y se estima que puede haber al menos 1 millón de especies de hongos endófitos. Además, los organismos endófitos son extremadamente abundantes y muy diversos, e incluyen a bacterias y hongos, siendo los segundos los microorganismos aislados con mayor frecuencia (Kusari *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006; Strobel *et al.*, 2004; Faeth, 2002). Los hongos aislados con mayor frecuencia son del grupo de hongos imperfectos o deuteromicetos; básicamente, producen esporas asexuales sobre diferentes cuerpos fructíferos. Además, es bastante común aislar endófitos que no producen ningún tipo de cuerpos fructíferos (*Mycelia sterilia*) (Strobel *et al.*, 2004).

### 8.1. Interacciones químico-ecológicas entre plantas y hongos

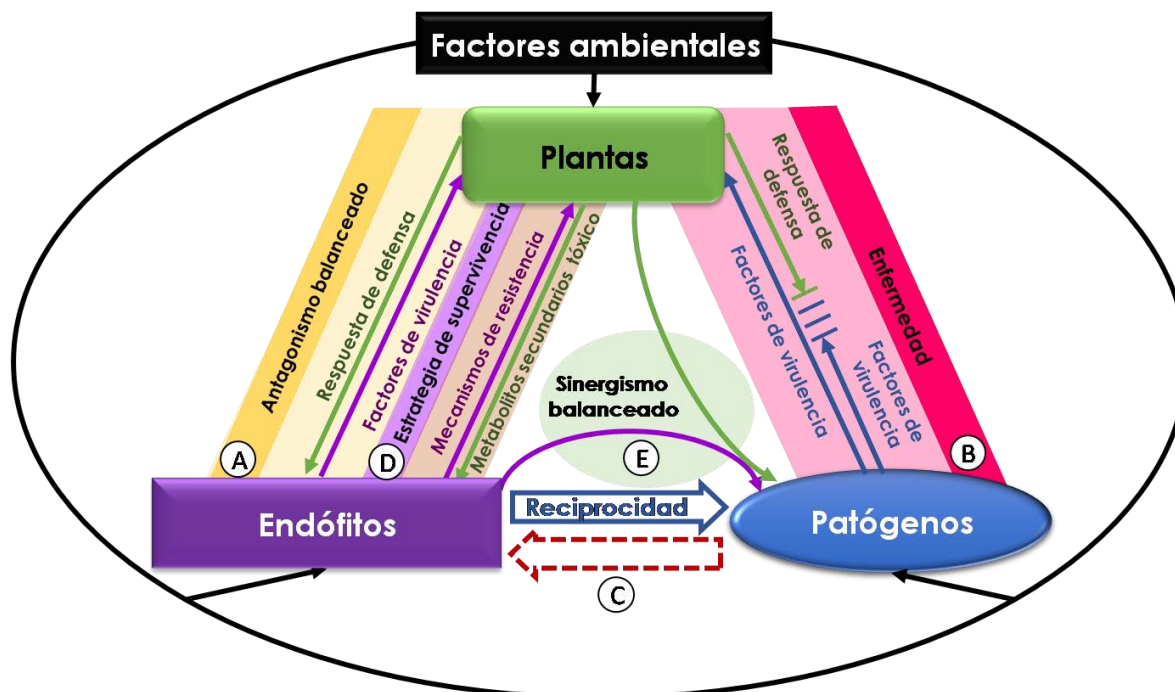
Las interacciones ecológicas entre los hongos endófitos y sus hospederas son complejas y varían del mutualismo al antagonismo, dependiendo de la especie, el estado fisiológico,

## Antecedentes

---

la química de la planta y las condiciones ambientales (Kusari *et al.*, 2012; Herre *et al.*, 2007; Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2003; Faeth, 2002).

La hipótesis del antagonismo balanceado fue propuesta inicialmente por Schultz y colaboradores (2005) para abordar cómo un endófito evita la activación de las defensas del huésped, asegura su propia resistencia antes de ser incapacitado por los metabolitos tóxicos del huésped y logra crecer dentro de su huésped sin causar manifestaciones visibles de infección o enfermedad (**Figura 17A**) (Kusari *et al.*, 2012, Schulz & Boyle, 2005). En el antagonismo balanceado, por un lado, la planta activa sus defensas físicas y químicas contra patógenos, por ejemplo engrosamiento de tejidos y la producción de fitoalexinas y fitoanticipinas respectivamente y, por otro, los endófitos producen factores de virulencia que le permiten infectar a la planta (Durringer *et al.*, 2013; Deacon, 2005; Latijnhouwers *et al.*, 2003; Faeth, 2002). De manera adicional, para asegurar su supervivencia dentro de la planta, los endófitos podrían presentar mecanismos de resistencia que les permitan soportar los metabolitos secundarios tóxicos de la planta, como la expresión de enzimas tolerantes, convirtiendo la interacción planta-endófito más compleja que el simple equilibrio entre las defensas de la planta y los factores de virulencia (**Figura 17D**) (Kusari *et al.*, 2012). Muchos de los endófitos son patógenos latentes (Zhang *et al.* 2006). Si la planta cede a los factores de virulencia del hongo, debido a factores ambientales o a su estado fisiológico, el endófito se expresará como fitopatógeno y la planta manifestará signos y síntomas de enfermedad (**Figura 17B y C**) (Kusari *et al.*, 2012).



**Figura 17.** Interpretación química-ecológica de las interacciones costo-beneficio entre plantas y hongos. Antagonismo balanceado (A), desarrollo de síntomas de enfermedad (B), reciprocidad endófito-fitopatógeno (C), estrategia de supervivencia de los endófitos (D), sinergismo balanceado (E) (Modificado de Kusari *et al.*, 2012).

Durante las complejas interacciones planta-endófito, los endófitos crecen a expensas del metabolismo de la hospedera. Sin embargo, puede ser posible que estos microorganismos le confieran a su hospedera, una ventaja adaptativa y competitiva, mediante dos tipos de efectos: indirectos o directos. Los efectos indirectos se definen como los efectos inducidos por endófitos en las defensas intrínsecas químicas o fisiológicas anti-patógenos de la planta huésped, por ejemplo, fitohormonas. Por otro lado, los efectos directos se definen como defensas anti-patógenos que son producidas directamente por los endófitos y, por tanto, son extrínsecas al huésped, como la producción de metabolitos secundarios bioactivos, que las protegen del ataque de patógenos y de herbívoros, entre otros (Figura 17E) (Kusari *et al.*, 2012; Suryanarayanan *et al.*, 2009; Herre *et al.*, 2007; Bayman, 2007; Strobel, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Tan & Zou, 2001).

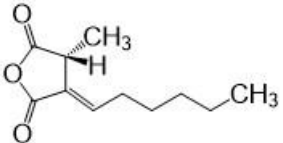
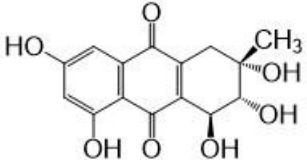
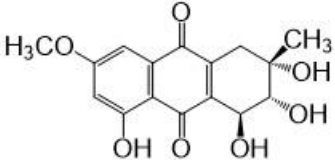
## Antecedentes

---

Las teorías anteriores ayudan a explicar el papel ecológico que representan los hongos endófitos dentro de sus plantas hospederas, y a su vez, explican la producción de metabolitos secundarios que pueden ser aislados y utilizados en un amplio espectro de actividades biológicas, tanto en la industria agroquímica como en la farmacéutica (Kusari *et al.*, 2012). En el **Cuadro 3** se presentan ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos aislados de hongos endófitos, indicando la especie fúngica, la planta hospedera, la actividad biológica y los organismos blanco evaluados.

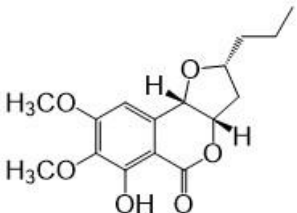
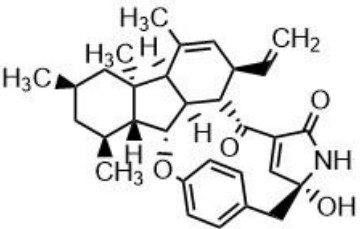


**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos aislados de hongos endófitos.

Metabolito secundario	Microorganismo productor	Planta hospedera	Actividad biológica y organismo blanco	Referencia
 <p>Xylariona A (<b>26</b>)</p>	<i>Xylaria psidii</i>	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.	<b>Citotóxico</b> sobre la línea celular de cáncer de páncreas MIA-Pa-Ca-2	Arora <i>et al.</i> , 2016
 <p>6-O-desmetil-4-deshidroxialtersolanol A (<b>27a</b>)</p>	<i>Nigrospora</i> sp. YE3033	<i>Aconitum carmichaeli</i>	<b>Antiviral</b> sobre el virus de la influenza H1N1	Zhang <i>et al.</i> , 2016
 <p>4-deshidroxialtersolanol A (<b>27b</b>)</p>				

## Antecedentes

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos aislados de hongos endófitos (Continuación).

Metabolito secundario	Microorganismo productor	Planta hospedera	Actividad biológica y organismo blanco	Referencia
 <p>Monocerina (<b>28</b>)</p>	<p><i>Exserohilum rostratum</i>, <i>Microdochium bolleyi</i></p>	<p><i>Bauhinia guianensis</i>, <i>Fagonia cretica</i></p>	<p><b>Antimicrobiano</b> sobre <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. megaterium</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Microbotryum violaceum</i>, <i>Chlorella fusca</i>.</p>	<p>Pinheiro <i>et al.</i>, 2016; Zhang <i>et al.</i>, 2008</p>
 <p>Pirrocidina A (<b>29</b>)</p>	<p><i>Acremonium zeae</i> NRRL 13540</p>	<p><i>Zea mays</i> L.</p>	<p><b>Antifúngico</b> sobre <i>A. flavus</i>, <i>F. verticilloides</i>, <i>F. graminearum</i>, <i>Nigrospora oryzae</i>, <i>Stenocarpella maydis</i>, <i>R. zeae</i>.</p>	<p>Wicklow &amp; Poling, 2008</p>

**Cuadro 3.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios bioactivos aislados de hongos endófitos (Continuación).

Metabolito secundario	Microorganismo productor	Planta hospedera	Actividad biológica y organismo blanco	Ref.
<p>Acremoxantona A (<b>30</b>)</p>	<i>Acremonium camptosporum</i> W. Gams	<i>Bursera simaruba</i>	<b>Antioomiceto</b> sobre <i>P. aphanidermatum</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. capsici</i> y <i>P. parasitica</i> . <b>Citotóxico</b> sobre las líneas celulares de cáncer de sistema nervioso central U251, adenocarcinoma prostático humano PC-3, leucemia mielógena crónica humana K562, adenocarcinoma de colon humano HCT-15, adenocarcinoma mamario humano MCF-7 y adenocarcinoma de pulmón humano SKLU.	Meléndez-González <i>et al.</i> , 2015
<p>Acremoxantona B (<b>31</b>)</p>				
<p>R = H Acremoxantona E (<b>32a</b>)</p>				
<p>R = Ac Acremoxantona C (<b>32b</b>)</p>				
<p>R = H Acremonidina B (<b>33a</b>)</p>	<i>Acremonidina A</i> ( <b>33b</b> ) R = Ac			

### 9. Métodos tradicionales en el estudio de hongos endófitos para el aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos

Actualmente, se cuenta con un gran número de publicaciones que describen diferentes métodos cultivo-dependiente para el aislamiento, purificación, conservación e identificación taxonómica de hongos endófitos (Li-Xing *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2010; Osono, 2004; Strobel, 2003; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

El paso inicial en el estudio de los hongos endófitos es la selección de las plantas hospederas (Li-Xing *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2010). Debido a que el número de especies de plantas es enorme, Yu y colaboradores (2010) reúnen diversos criterios de selección de hospederas para aumentar la posibilidad del aislamiento de endófitos productores de metabolitos secundarios bioactivos novedosos (Yu *et al.*, 2010). La colecta de las plantas debe considerar al menos uno de los siguientes criterios:

1. Plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad y que por lo tanto, pueden alojar endófitos igualmente diversos. Aquellos ecosistemas que tienen la mayor biodiversidad de plantas parecen ser los que también tienen un amplio número y diverso de microorganismos. La diversidad biológica implica diversidad química estructural debido a la constante innovación química que se requiere para sobrevivir en ecosistemas donde la competencia evolutiva para sobrevivir es más activa.
2. Plantas que habiten en situaciones ambientales únicas, especialmente aquellas con biología extraordinaria, y que posean nuevas estrategias para su supervivencia, por ejemplo, aquellas que crecen en zonas de baja temperatura o en ambientes acuáticos.
3. Plantas sin síntomas de enfermedad que crecen rodeadas de otras plantas infectadas por diversos patógenos o atacadas por herbívoros (criterio ecológico), las cuales pueden estar colonizadas por endófitos productores de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas e insecticidas.
4. Plantas que han sido explotadas por el hombre en medicina tradicional.
5. Plantas endémicas, que han habitado en extensiones de tierra por mucho tiempo.

Para el aislamiento de los hongos endófitos es necesario realizar una descontaminación superficial de los materiales biológicos colectados con agentes oxidantes diluidos, debido a que además de los microorganismos endófitos, existen microorganismos epifitos que habitan en la superficie de las plantas y microbiota contaminante. Además, debido a que la mayoría de los hongos endófitos no son fácilmente cultivables, para el aislamiento y mantenimiento de los hongos se requieren medios de cultivo, como el medio papa dextrosa agar (PDA), que brinden los nutrientes necesarios a los microorganismos fuera de su planta hospedera (Li-Xing *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006; Osono, 2004).

La mayoría de los hongos son aerobios y para su crecimiento necesitan fuentes de carbono (carbohidratos), nitrógeno (proteínas y/o sales de nitrógeno), agua, potasio, fósforo, calcio y magnesio y, en menor cantidad, de hierro, cobre, cinc y molibdeno. Cabe mencionar que los hongos pueden sintetizar las vitaminas necesarias para su crecimiento y reproducción (Maczulak, 2011; Gould, 2009; Madigan *et al.*, 2009; Maheshwari, 2005; Arx, 1981).

Para la producción de metabolitos secundarios bioactivos a partir de los hongos endófitos cultivables, se requiere realizar fermentaciones en un medio de cultivo adecuado (Wiyakrutta *et al.*, 2004). La manipulación de factores nutricionales o ambientales durante la fermentación puede promover la biosíntesis de nuevos metabolitos secundarios y/o afectar la cantidad de un determinado compuesto, y por siguiente, su perfil metabólico (Bode *et al.*, 2012; Scherlach & Hertweck, 2008).

Finalmente, para evaluar la actividad antimicrobiana, se cuenta con varios métodos para la investigación *in vitro* de extractos y de compuestos puros como posibles agentes antimicrobianos. Entre los más importantes se encuentran los métodos de difusión en disco, la bioautografía-cromatografía en capa fina y de dilución en agar (Balouri *et al.*, 2016; Meléndez- González *et al.*, 2015).

### **10. Hongos endófitos con potencial antagónico aislados de *Mimosa affinis* y de *Sapium macrocarpum***

Los hongos endófitos que se utilizaron en la presente investigación fueron aislados de hojas sanas de la parte media de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum*. Ambas plantas fueron colectadas bajo un criterio ecológico en una zona de alta diversidad, la Reserva de

## Antecedentes

---

la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH), en septiembre de 2010 (Sánchez-Fernández, 2016).


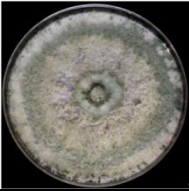
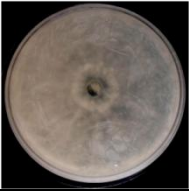







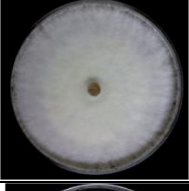

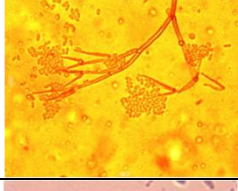

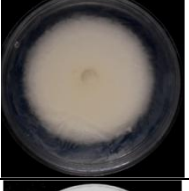
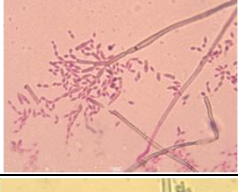
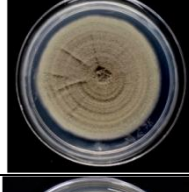
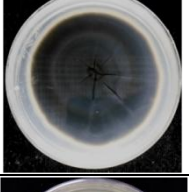

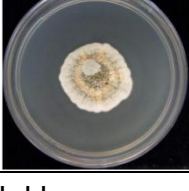

Las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum* son especies nativas de la REBIOSH. Por un lado, *M. affinis* se caracteriza por ser una planta pequeña y anual, de la cual se desconocen antecedentes etnobotánicos (Wang *et al.*, 1999; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM). Por otro lado, *S. macrocarpum*, conocida popularmente como árbol de leche de fruto grande, amatillo y lechón, entre otros, es una planta que secreta látex, el cual se usa contra la picadura de alacrán, fiebre y algunos problemas de la piel como verrugas. Cabe mencionar, que los estudios químicos, de actividad biológica y estudios previos sobre los hongos endófitos de ambas plantas son escasos (Macías-Rubalcava *et al.*; 2017; Roque-Flores, 2017; García-Méndez, *et al.* 2016; Sánchez-Fernández, 2016; Villanueva-Silva, 2014; Ruiz-Terán *et al.*, 2008; Silvestre-Castañeda, 2008).

En proyectos previos se realizó el aislamiento y la purificación de los hongos endófitos cultivables y con potencial antagónico de las especies vegetales seleccionadas. Se obtuvieron siete hongos endófitos puros de *M. affinis* y 14 endófitos de *S. macrocarpum*. Además, se llevó a cabo la descripción detallada de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos aislados. Asimismo, se determinó la tasa de crecimiento de los microorganismos y se realizaron bioensayos de antagonismo directo entre los hongos endófitos de la misma hospedera con tasa de crecimiento similar, con el fin de establecer cuantitativamente su potencial antagónico. Los bioensayos de antagonismo demostraron que los hongos endófitos SME1, SME2, SME6, SME9 y SME13 aislados de *S. macrocarpum*, así como los endófitos MAE4 y MAE7 aislados de *M. affinis* inhiben significativamente el crecimiento de sus competidores, constituyendo candidatos potenciales para su estudio como fuente de metabolitos secundarios con posible actividad antifúngica sobre microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura (Villanueva-Silva, 2014). Esta información, sirvió como punto de partida para continuar la investigación sobre el potencial antifúngico y antioomiceto de los metabolitos secundarios biosintetizados por los 21 hongos endófitos aislados de *M. affinis* y *S. macrocarpum*.

En el **Cuadro 4** se muestran los siete hongos endófitos aislados de *M. affinis* y en el **Cuadro 5** se presentan los 14 endófitos de *S. macrocarpum*. En ambos cuadros se indican las claves asignadas a cada aislamiento de acuerdo a su tasa de crecimiento, su

posible género y fotografías de cultivos en cajas de Petri con medio PDA, así como micrografías del micelio obtenidas mediante microscopía óptica a partir de microcultivos.






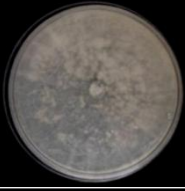
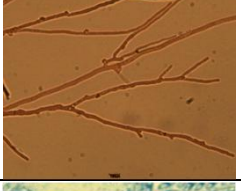

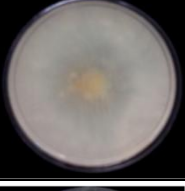


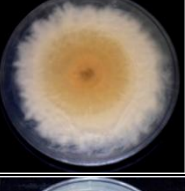
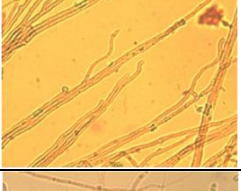
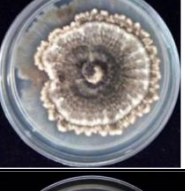



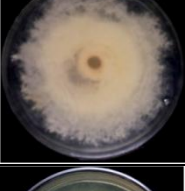
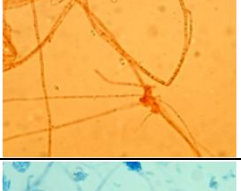
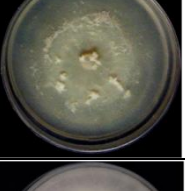
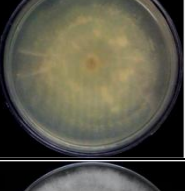
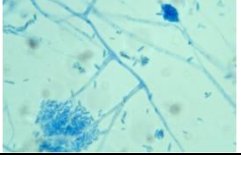


**Cuadro 4.** Hongos endófitos aislados de la planta *M. affinis*.

Clave	Genero	Características microscópicas	Características macroscópicas	
MAE1	<i>Trichoderma</i>			
MAE2	S.I.			
MAE3	<i>Fusarium</i>			
MAE4	S.I.			
MAE5	S.I.			
MAE6	<i>Cladosporium</i>			
MAE7	<i>Aspergillus</i>			

S.I. No se ha identificado el género o la especie del hongo.

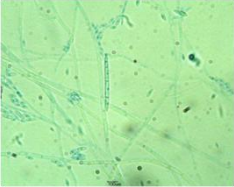
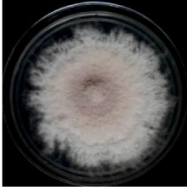

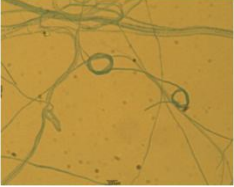

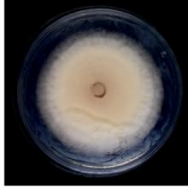


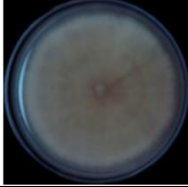




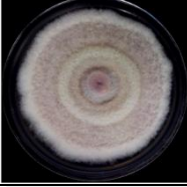


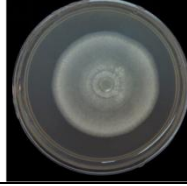
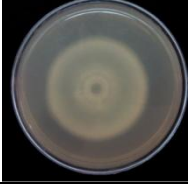
## Antecedentes

**Cuadro 5.** Hongos endófitos aislados de la planta *S. macrocarpum*.

Clave	Genero	Características microscópicas	Características macroscópicas	
SME1	S.I.			
SME2	<i>Trichoderma</i>			
SME3	S.I.			
SME4	<i>Fusarium</i>			
SME5	<i>Xylaria</i>			
SME6	<i>Fusarium</i>			
SME7	<i>Fusarium</i>			
SME8	S.I.			



**Cuadro 5.** Hongos endófitos aislados de la planta *S. macrocarpum* (Continuación).

Clave	Género	Características microscópicas	Características macroscópicas	
SME9	<i>Fusarium</i>			
SME10	<i>Xylaria</i>			
SME11	S.I.			
SME12	S.I.			
SME13	<i>Fusarium</i>			
SME14	S.I.			

S.I. No se ha identificado el género o la especie del hongo.

---

## V. Hipótesis

Las plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad pueden estar colonizadas por hongos endófitos diversos que producen metabolitos secundarios que les confieren protección al ataque de microorganismos fitopatógenos, entre otros factores bióticos. En consecuencia, el estudio químico biodirigido de los hongos endófitos cultivables *in vitro* de *M. affinis* y *S. macrocarpum*, dos plantas colectadas en una zona de alta biodiversidad, permitirá el aislamiento, purificación y caracterización estructural de compuestos orgánicos con actividad antifúngica y antioomiceto con potencial uso como bioplaguicidas contra microorganismos fitopatógenos.

---

## VI. Objetivos

### 1. Objetivo general

Poner en evidencia el potencial antifúngico y antioomiceto de los metabolitos secundarios biosintetizados por los hongos endófitos cultivables *in vitro* de las especies *M. affinis* y *S. macrocarpum*, y aislar y caracterizar compuestos orgánicos producidos por uno de los hongos más antagónicos, con el fin de evidenciar compuestos orgánicos de origen natural que conduzcan al desarrollo de nuevos plaguicidas alternativos, sobre hongos y oomicetos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura.

### 2. Objetivos particulares

- I. Obtener cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos cultivables *in vitro* de *M. affinis* y *S. macrocarpum*, en caldo papa dextrosa bajo condiciones de incubación estáticas, y preparar los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio empleando sucesivos proceso de reparto y maceración, respectivamente.
- II. Determinar la actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos que causan daño en la agricultura *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*, empleando el método de dilución en agar.
- III. Determinar la mejor condición de cultivo de uno de los hongos endófitos con el mayor potencial antifúngico y/o antioomiceto, para obtener extractos fúngicos en cantidad apropiada para su estudio químico.
- IV. Cultivar a mayor escala el hongo endófito seleccionado en la mejor condición de cultivo, y obtener los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio.
- V. Realizar un estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio bioactivos, y aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios, responsables de la actividad biológica, utilizando técnicas cromatográficas convencionales y el seguimiento de la actividad biológica con el método de dilución en agar.

## Objetivos

---

- VI. Evaluar el efecto de los compuestos puros sobre el desarrollo del micelio, la morfología de las hifas, la integridad de la membrana celular y la tasa de respiración de los microorganismos fitopatógenos de prueba, y determinar la concentración inhibitoria media del efecto de los compuestos orgánicos sobre el crecimiento radial y la tasa de respiración de los microorganismos fitopatógenos.
  
- VII. Caracterizar los metabolitos secundarios activos utilizando técnicas espectroscópicas, espectrométricas o de difracción de rayos X.

---

## VII. Desarrollo experimental

### 1. Hongos endófitos de *M. affinis* y *S. macrocarpum*

Los hongos endófitos se aislaron a partir de hojas sanas de la parte media de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum*, recolectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, REBIOSH, ubicada en el municipio de Quilamula en el estado de Morelos, México (18°30'4.1'' N, 98°51'52'' W, y 18°32'12.2'' N, 99°02'05'' W; 1080–1230m sobre el nivel del mar), en septiembre de 2010. El aislamiento y purificación de los hongos endófitos se realizó como se describe en García-Méndez, 2016 y Sánchez-Fernández, 2016. Para esta investigación se utilizaron siete hongos endófitos puros aislados de *M. affinis* y 14 aislados de *S. macrocarpum* con potencial antagónico (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016, Villanueva-Silva, 2014).

### 2. Medios para el cultivo de hongos endófitos

El medio caldo papa dextrosa (CPD) se preparó con 200 g de papas frescas lavadas con agua y jabón, descortezadas y cortadas en cubos pequeños. Se colocaron en un recipiente con agua destilada y se llevaron a ebullición durante 20 minutos. Posteriormente, el caldo obtenido se filtró a través de un colador. El medio CPD se preparó adicionando al caldo de papa 20 g de dextrosa y agua destilada hasta completar el volumen de 1 L.

El medio sólido papa dextrosa de agar (PDA) se preparó de la misma manera que el medio CPD y se adicionaron 10 g de agar para preparar PDA al 1% y 20 g para 2% (Leslie *et al.*, 2006; Ulloa & Hanlin, 1978; Sánchez-Fernández, 2016).

El medio arroz (MA) se preparó con 300 g de arroz grano largo Bakers & Chefs® en un matraz Erlenmeyer de 2 L. Los granos se cubrieron con agua destilada y se humedecieron durante 30 min. Transcurrido el tiempo se retiró el agua y los granos se enjuagaron dos veces con 500 mL de agua destilada. Posteriormente, se adicionaron 450 mL de agua destilada al arroz húmedo (Sánchez-Fernández; 2016; Armendáriz-Guillén 2013). Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min (Leslie *et al.*, 2006).

### 3. Cultivo de los hongos endófitos en medio líquido CPD

Para llevar a cabo los cultivos de todos los hongos endófitos en CPD, en primer lugar, se prepararon los inóculos y para ello, los microorganismos se cultivaron en cajas de Petri con medio PDA estéril, a partir de cultivos de conservación en tubo con medio PDA. En una campana de flujo laminar se tomaron muestras de micelio con un asa bacteriológica estéril y se transfirieron por picadura a las cajas con PDA fresco. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante siete días con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad artificial 12/12 h. Posteriormente, se realizaron 10 cortes de 1 cm de diámetro del micelio con un sacabocados estéril y se transfirieron a un matraz Fernbach de 3 L conteniendo 1 L de medio de cultivo CPD. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 días en condiciones estáticas con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12/1 2h (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Meléndez-González *et al.*, 2015).

### 4. Obtención de los extractos orgánicos

Al finalizar el periodo de incubación de los cultivos en CPD, se obtuvieron los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio, de cada uno de los hongos endófitos en estudio mediante maceración del micelio húmedo y por reparto del medio de cultivo.

El micelio se filtró *in vacuo* y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 1 L. A continuación, se adicionaron 500 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y el material fúngico se maceró 24 h por cinco veces. Posteriormente, se maceró cinco veces más con AcOEt.

Por otro lado, el medio de cultivo filtrado (aproximadamente 1 L) se extrajo mediante reparto en un embudo de separación de 2 L. Se realizaron cinco extracciones sucesivas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y posteriormente cinco más con AcOEt.

Los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt del micelio y medio de cultivo se concentraron en un rotavapor (45 °C). Los extractos secos se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF), y se determinó el rendimiento de extracción (García-Méndez *et al.*, 2016; Sánchez-Fernández 2016; Macías-Ruvalcaba *et al.*, 2016).

### 5. Análisis cromatográfico en CCF de los extractos orgánicos

Los extractos orgánicos de micelio y de medio de cultivo se analizaron utilizando cromatofolios de aluminio cubiertos de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 0.25 mm de espesor. Los cromatofolios se eluyeron con mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH de diferentes composición dependiendo de la complejidad de la mezcla. Los agentes cromogénicos utilizados fueron solución de ácido sulfúrico al 10%, seguido de calentamiento del cromatofolio a 100 °C, y/o cámara con yodo sublimado. Los perfiles químicos de los extractos de medio de cultivo obtenidos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt y los obtenidos a partir del micelio de cada uno de los hongos endófitos se compararon y se unieron aquellos que presentaron mayor similitud (García-Méndez *et al.*, 2016; Sánchez-Fernández, 2016; Gibbons, 2012; Walton, 1978).

### 6. Evaluación del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos

El potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos de cada uno de los hongos endófitos se determinó cuantificando su efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos utilizando el método de dilución en agar (Meléndez-González *et al.*, 2015). El bioensayo se realizó bajo un diseño al azar con cuatro réplicas por tratamiento. Se emplearon dos hongos: *A. alternata* y *F. oxysporum* y dos oomicetos: *P. capsici* y *P. aphanidermatum*.

Los extractos orgánicos secos se disolvieron en CH<sub>3</sub>OH y se adicionaron al medio fundido PDA al 2%. En seguida, la mezcla se diluyó con agua destilada estéril y se mezcló perfectamente hasta obtener PDA al 1% con extracto fúngico a una concentración de 250 ppm y una concentración máxima de CH<sub>3</sub>OH de 0.3% (v/v). El medio de cultivo fluido se distribuyó en cajas de Petri estériles de 50 mm de diámetro y se gelificaron en campana de flujo laminar.

De manera adicional, se prepararon cajas de Petri con PDA diluido sin tratamiento, PDA-CH<sub>3</sub>OH 0.3% (v/v) y PDA con los controles positivos Ridomil 4E® (Metalaxil-M, éster metílico de N-(2,6-dimetilfenil)-N-(metoxiacetil)-D-alanina, 45.28% en peso) y Prozicar 50® (Carbendazim, metil 2-benzimidazolcarbamato, 50% en peso), a 250 ppm.

## Desarrollo experimental

---

Las cajas de Petri con los distintos tratamientos se inocularon en el centro con un corte de 5 mm de diámetro, hecho con un sacabocados estéril, sobre el micelio de los microorganismos fitopatógenos de prueba previamente incubados por 7 días en medio PDA. Los bioensayos se realizaron dos veces bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

Las cajas de Petri se incubaron de acuerdo a la tasa de crecimiento del microorganismo fitopatógeno, a 28 °C y con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12/12 h. Durante el bioensayo se registraron dos mediciones perpendiculares del diámetro del micelio de cada una de las repeticiones en dos tiempos de incubación. En el **Cuadro 6** se muestran los tiempos de medición de cada fitopatógeno.

**Cuadro 6.** Días de medición del crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba.

Microorganismo	Primera medición (días)	Segunda medición (días)
<i>P. aphanidermatum</i>	1	2
<i>P. capsici</i>	2	4
<i>A. alternata</i>	2	4
<i>F. oxysporum</i>	2	4

El porcentaje de inhibición de cada tratamiento se calculó con el diámetro promedio de cada repetición, comparando el valor promedio del diámetro de los cultivos sin tratamiento como se indica a continuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{A - B}{A} * 100$$

En donde **A** es el promedio del diámetro de las cuatro repeticiones de los cultivos sin tratamiento y **B** es el promedio de los diámetro perpendiculares de los cultivos con



tratamiento de cada replica. Los porcentajes de inhibición de las cuatro repeticiones de cada microorganismo de prueba se promediaron y analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un nivel de confianza del 95% y una prueba de contrastes de Tukey, utilizando el software GraphPad Prisma versión 5.0 (Meléndez-González *et al.*, 2015).

### 7. Selección de las mejores condiciones de cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 con potencial antifúngico y antioomiceto

El hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 fue seleccionado por ser uno de los microorganismos con mayor potencial antifúngico y antioomiceto. *Fusarium* sp. aislamiento SME13 se cultivó en dos diferentes medios de cultivo bajo diferentes condiciones de incubación. En el **Cuadro 7** se presentan las condiciones de cultivo empleadas.

**Cuadro 7.** Condiciones de cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13.

Medio de cultivo	Temperatura	rpm	Tiempo de incubación (días)
CPD	Ambiente	0	30
	28 °C	0	30
	28 °C	150	15
MA	28 °C	0	30

Los extractos orgánicos derivados del cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 en medio CPD se obtuvieron como se describe en el inciso **4**.

Por otra parte, los extractos orgánicos del hongo *Fusarium* sp. aislamiento SME13 cultivado en arroz se obtuvieron de la siguiente manera: el medio de cultivo (los granos de arroz cubiertos del micelio del hongo) se maceró con 500 mL de hexano durante 24 h por

## Desarrollo experimental

---

cinco veces. Posteriormente, el material fúngico se extrajo cinco veces más con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , seguido de cinco extracciones con AcOEt.

Los extractos orgánicos se concentraron en un rotavapor, y se determinó el rendimiento de extracción. Los extractos secos se analizaron por CCF y se reunieron los extractos con perfiles metabólicos similares.

A continuación, se estableció cuantitativamente el efecto antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos obtenidos a partir de las diferentes condiciones de incubación como se señaló en el inciso 6 (Sánchez-Fernández, 2016; Armendáriz-Guillén, 2013).

### **8. Cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 a mayor escala empleando la mejor condición de crecimiento**

El hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 se cultivó en 15 matraces Fernbach de 3 L conteniendo 1.2 L de medio CPD. Los cultivos se incubaron durante 30 días a temperatura ambiente con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12/12 h. Una vez terminado el periodo de incubación se obtuvieron los extractos de medio de cultivo y del micelio de los 15 matraces de cultivo, como se señaló anteriormente, y se reunieron en dos extractos totales: extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt de medio de cultivo y extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt de micelio.

### **9. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto total de medio de cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13**

El extracto total  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt del medio de cultivo (2.9 g) del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CC). El extracto se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se adsorbió en 5 g de sílica gel G-60 Merck malla 70-230. El extracto adsorbido se colocó en una columna cromatográfica con sílica gel. Se eluyó con un gradiente de AcOEt-MeOH (100:0 a 0:100). Se utilizaron 200 g de sílica gel, obteniéndose 104 fracciones de 50 mL, todas monitoreadas por CCF. Las fracciones que presentaron características cromatográficas similares se reunieron para generar seis grupos de fracciones primarias. En el **Cuadro 8** se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

**Cuadro 8.** Fraccionamiento primario del extracto de medio de cultivo CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 cultivado en medio CPD.

Fracción primaria	Fracciones	Sistema de elución	Proporción	Peso (mg)
1	1	AcOEt	100	17.3
2	2	AcOEt	100	56.8
3*	3-4	AcOEt	100	238.7
4*	5-8	AcOEt:CH <sub>3</sub> OH	1:1	41.95
5*	9-88	AcOEt-CH <sub>3</sub> OH	1:1	907.0
6*	89-104	CH <sub>3</sub> OH	100	194.2

\* Fracciones activas sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos blanco

### 9.1. Obtención de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34)

A partir de la fracción primaria activa F5 de medio de cultivo precipitó un sólido incoloro cristalino. El sólido se retiró de las aguas madres y se realizaron lavados consecutivos con hexano, hexano-AcOEt (8:2) y AcOEt. Posteriormente, se realizó una recrystalización simple con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El análisis por CCF fase normal y fase reversa (CCF-C<sub>18</sub>) demostró que se trataba de una mezcla constituida por dos compuestos mayoritarios (**9** y **34**).

El aislamiento y purificación de los componentes mayoritarios presentes en la fracción primaria F5 se realizó mediante CCF-C<sub>18</sub> preparativa utilizando como sistema de elución CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (3:7 x 3). Se obtuvieron 84.5 mg del compuesto **9** y 42.5 mg del compuesto **34**.

De manera adicional, de la fracción primaria activa F4 se obtuvieron 50.8 mg y 19.8 mg adicionales de los ácidos **9** y **34**, respectivamente, mediante sucesivas CCF-C<sub>18</sub> preparativas empleando el sistema de elución descrito anteriormente. En total se obtuvieron 135.3 mg del compuesto **9** y 62.3 mg del compuesto **34**.

### 10. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto total de micelio del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13

#### 10.1. Obtención de la 6,11-dihidroxi-3,8-dimetoxi-1-metil-benzo[b]xanton-7,10,12-triona (**35**)o bikaverina

A partir del extracto total de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt del micelio del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 precipitó espontáneamente un sólido amorfo de color rojo intenso. El sólido se filtró y se lavó exhaustivamente con hexano, hexano-AcOEt (8:2) y AcOEt, obteniéndose 11.9 mg del compuesto **35**.

Las aguas madres del extracto total del micelio del endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 y los lavados orgánicos del compuesto **35** se unieron (7.0 g) y se adsorbieron en sílica gel. El extracto adsorbido se colocó en una columna cromatográfica con 250 g de sílica gel. Se eluyó con un gradiente de hexano-AcOEt (100:0 a 0:100), AcOEt (100), AcOEt-CH<sub>3</sub>OH (100:0 a 1:1) y CH<sub>3</sub>OH: AcOH (99.5:0.5). Se obtuvieron 114 fracciones de 50 mL. Las fracciones que presentaron características cromatográficas similares se unieron para generar siete grupos de fracciones primarias. En el **Cuadro 9** se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

**Cuadro 9.** Fraccionamiento primario del extracto de micelio CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 cultivado en medio CPD.

Fracción primaria	Fracciones	Sistema de elución	Proporción	Peso (mg)
1*	1-4	Hexano	100	4730.7
2*	5-29	Hexano	1:1	1243.3
3*	30-36	AcOEt	100	121.2
4*	37-47	AcOEt	100	77.5
5*	48-67	AcOEt-CH <sub>3</sub> OH	1:1	231.1
6*	68-70	CH <sub>3</sub> OH: AcOH	99.5:0.5	94.1
7*	71-114	CH <sub>3</sub> OH: AcOH	99.5:0.5	76.3

\* Fracciones activas sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos

De manera adicional, de la fracción primaria activa F5 de micelio se obtuvieron 4.1 mg. En total se obtuvieron 16.0 mg del compuesto **35**.

### 11. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **9**, **34** y **35**

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H) y de carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C) se realizaron en un equipo **Bruker Avance III 400** a una frecuencia de 400 y 125 MHz respectivamente. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C obtenidos a una frecuencia de 700MHz se realizaron en el equipo **Bruker Avance III HD 700** con una criosonda **TCI 700 H-C/N-D**. Los espectros se generaron con CDCl<sub>3</sub>. Los espectros de masas se obtuvieron en la modalidad de impacto electrónico (IE) en un espectrómetro de masas **Jeol SX102A**. Los espectros de infrarrojo se (IR) se obtuvieron usando un espectrofotómetro **Bruker Tensor 27**.

### 12. Determinación de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba

La concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre el crecimiento radial de los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum*, y de los oomicetos fitopatógenos *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, se determinó a través de una curva de concentración vs respuesta utilizando el método de dilución en agar, empleando mínimo cinco diferentes concentraciones de prueba (**Cuadros 10 y 11**) y siguiendo la metodología descrita en el inciso **6**, con única diferencia de que en esta ocasión se usaron cajas de Petri de 35 mm. Además, se utilizaron los fungicidas comerciales Captán 50® (Captán, *N*-triclorometiltio-ciclohex-4-en-1,2-dicarboximida, 50% en peso) y Consist Max BAYER® (tebuconazol: (*R,S*)-1-*p*-clorofenil-4,4-dimetil-3- (1*H*-1, 2, 4-triazol-1-ilmetil)-pentan-3-ol y trifloxistrobina: acetato de metil-(2*Z*)-2-metoxiimino-2-[2-[[*E*]-1-(3-(trifluorometil)fenil]etilideneamino]oximetil]fenilo, 22.63% en peso de cada uno de los principios activos) como controles positivos.

Los porcentajes de inhibición de los diferentes tratamientos se obtuvieron registrando de nueva cuenta los diámetros promedio de crecimiento y comparando con su respectivo control de disolvente, sin la presencia de los compuestos de prueba (controles negativos). Las  $CI_{50}$  y los análisis estadísticos se calcularon con el software GraphPad Prisma versión 5.0 (Meléndez-González *et al.*, 2015).

**Cuadro 10.** Concentraciones empleadas de los ácidos fusárico (**9**), 9,10-deshidrofusárico (**34**) y del control positivo Captán 50® para la obtención de los valores de  $Cl_{50}$  sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba.

Tratamiento	Concentraciones				Disolvente
	Oomicetos		Hongos		
	ppm	$\mu M$	ppm	$\mu M$	
Ácido fusárico ( <b>9</b> )	2.5	13.9	50	279.0	H <sub>2</sub> O
	5.0	27.9	100	558.0	
	10	55.8	150	837.0	
	15	83.7	200	1116.0	
	20	111.6	250	1394.9	
	25	139.5			
Ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )	2.5	14.1	50	282.2	CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O
	5	28.2	100	564.3	
	10	56.4	150	846.5	
	15	84.6	200	1128.6	
	20	112.9	250	1410.8	
	25	141.1			
Captán 50®	2.5	8.3	10	33.3	H <sub>2</sub> O
	5.0	16.6	20	66.5	
	10	33.3	30	99.8	
	15	49.9	40	133.1	
	20	66.5	50	166.3	
	25	83.2			

**Cuadro 11.** Concentraciones empleadas del control positivo Consist Max® para la obtención de los valores de  $CI_{50}$  sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba.

Concentraciones Consist Max®								
<i>P. capsici</i>			<i>P. aphanidermatum</i>			Hongos		
ppm	Tebuconazol $\mu\text{M}$	Trifloxistrobina $\mu\text{M}$	ppm	Tebuconazol $\mu\text{M}$	Trifloxistrobina $\mu\text{M}$	ppm	Tebuconazol $\mu\text{M}$	Trifloxistrobina $\mu\text{M}$
10	32.5	24.5	2.5	8.1	6.1	$1 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$
20	65.0	49.0	5	16.2	12.2	$1 \times 10^{-2}$	$3 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$
30	97.5	73.5	15	48.7	36.7	$1 \times 10^{-1}$	$3 \times 10^{-1}$	$2 \times 10^{-1}$
40	129.9	97.9	20	65.0	49.0	1.0	3.2	2.4
50	162.4	122.4	25	81.2	61.2	10	32.5	24.5



### 13. Determinación del mecanismo de acción de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34), sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura

#### 13.1. Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre las características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos fitopatógenos de prueba

El efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre las características macroscópicas y microscópicas de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, se evaluó mediante la observación detallada de su crecimiento miceliar en presencia de las diferentes concentraciones ensayadas para la obtención de los valores de  $CI_{50}$ .

El efecto de los ácidos 9 y 34 sobre las características macroscópicas de los fitopatógenos se evaluó cualitativamente a través de la observación de los cultivos en caja de Petri en medio PDA, con ayuda de un microscopio estereoscópico **Motic® TYPE102M**, y mediante el registro fotográfico con una cámara acoplada **Euromex CMEX 5.0**. Se registró el cambio en el color y textura del micelio y la forma de las colonias de los microorganismos fitopatógenos con respecto a los cultivos control (Pitt & Hocking, 2009).

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las características microscópicas de los microorganismos, se realizaron microcultivos en presencia de las mismas concentraciones utilizadas para la curva de concentración vs respuesta (**Cuadros 10 y 11**). Los microcultivos se prepararon a partir de una de las cajas de Petri de 35 mm conteniendo 2 mL de PDA con el tratamiento. Una vez que las disoluciones gelificaron bajo una campana de flujo laminar, se realizaron cortes de 1 cm<sup>2</sup> utilizando una espátula de acero inoxidable, en condiciones de esterilidad. Se transfirieron dos segmentos de medio de cultivo a los extremos de un portaobjetos soportado con un triángulo de vidrio en una caja de Petri de 10 mm, previamente esterilizados. Posteriormente, los segmentos de medio de cultivo se inocularon por picadura con un asa bacteriológica estéril con uno de los microorganismos fitopatógenos de prueba, en dos de los lados del segmento de medio de cultivo. Los segmentos inoculados se cubrieron con un portaobjeto estéril, y se adicionaron 2 mL de agua destilada estéril en el interior de la caja y se sellaron con plástico adherente. Los microcultivos se incubaron a 28 °C con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12/12 h, en una incubadora **Thermoscientific®**.

## Desarrollo experimental

---

Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron preparaciones en fresco por duplicado con los colorantes rojo congo y azul de lactofenol. Las preparaciones se tiñeron durante 2 minutos y se cubrieron con un cubreobjetos para su observación microscópica (Ulloa & Hanlin, 1978, Villanueva-Silva, 2014). Las preparaciones se observaron a 40x y fotografiaron utilizando un microscopio compuesto **Motic® BA410** acoplado a una cámara **Euromex CMEX 5.0**. Se registraron los cambios en las características de las hifas como son grosor, presencia o ausencia de septos y pigmento, la presencia de organelos como núcleos y vacuolas, y estructuras de reproducción, comparándolas con las preparaciones de los microcultivos control.

### 13.2. Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la permeabilidad de la membrana celular y sobre la respiración

#### 13.2.1. Obtención de las disoluciones de prueba

Las disoluciones acuosas de los compuestos puros se prepararon a diferentes concentraciones, utilizando como disolventes agua ultra pura (Milli-Q) (**Direct Q 3 UV MilliPore®**) y CH<sub>3</sub>OH grado HPLC (J.T.Baker®) con una concentración máxima final de 0.1% (v/v); como controles negativos se utilizaron agua Milli-Q y una disolución acuosa de CH<sub>3</sub>OH a la máxima concentración empleada para preparar las disoluciones, y como controles positivos se prepararon suspensiones acuosas a diferentes concentraciones del agroquímico comercial Consist Max BAYER®. En el **Cuadro 12** se muestran las concentraciones en ppm y µM de los diferentes tratamientos utilizadas en los bioensayos de permeabilidad de membrana celular y en el **Cuadro 13** las concentraciones utilizadas en los bioensayos de respiración.

**Cuadro 12.** Concentraciones de los ácidos fusárico (**9**), 9,10-deshidrofusárico (**34**) y del control positivo para los bioensayos de permeabilidad de la membrana celular.

Tratamiento	Concentraciones				Disolvente
	Oomicetos		Hongos		
	ppm	µM	ppm	µM	
Ácido fusárico ( <b>9</b> )	15	83.7	250	1394.9	CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O
	20	111.6			
	25	139.5			
Ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )	15	84.6	250	1410.8	CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O
	20	112.9			
	25	141.1			
Consist Max®	50	162.4 <sup>a</sup> 122.4 <sup>b</sup>	10	32.5 <sup>a</sup> 24.5 <sup>b</sup>	
<sup>a</sup> tebuconazol	100	324.9 <sup>a</sup> 244.9 <sup>b</sup>	100	324.9 <sup>a</sup> 244.9 <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> O
<sup>b</sup> trifloxistrobina	150	487.3 <sup>a</sup> 367.3 <sup>b</sup>	250	812.2 <sup>a</sup> 612.2 <sup>b</sup>	

**Cuadro 13.** Concentraciones de los ácidos fusárico (**9**), 9,10-deshidrofusárico (**34**) y del control positivo para los bioensayos de respiración.

Tratamiento	Concentraciones				Disolvente
	Oomicetos		Hongos		
	ppm	µM	ppm	µM	
Ácido fusárico ( <b>9</b> )	15	83.7	75	418.5	H <sub>2</sub> O
	20	111.6	125	697.5	
	25	139.5	250	1394.9	
Ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )	15	84.6	75	423.2	CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O
	20	112.9	125	705.4	
	25	141.1	250	1410.8	
Consist Max®	30	97.5 <sup>a</sup> 73.5 <sup>b</sup>	0.1	0.3 <sup>a</sup> 0.2 <sup>b</sup>	
<sup>a</sup> tebuconazol	40	129.9 <sup>a</sup> 97.9 <sup>b</sup>	1.0	3.2 <sup>a</sup> 2.4 <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> O
<sup>b</sup> trifloxistrobina	50	487.3 <sup>a</sup> 367.3 <sup>b</sup>	10	32.5 <sup>a</sup> 24.5 <sup>b</sup>	

### 13.2.2. Obtención del micelio húmedo de los cuatro microorganismos fitopatógenos

El micelio de cada microorganismo fitopatógeno de prueba se obtuvo a partir de cultivos en medio CPD. Los cultivos se obtuvieron de un cultivo de siete días en caja de Petri con medio de cultivo PDA, del cual se cortaron 5 discos de 5 mm de diámetro del micelio de cada fitopatógeno con un sacabocado estéril. Los discos se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo CPD y se incubaron durante cuatro a cinco días, dependiendo del fitopatógeno, a 28°C en un agitador orbital a 150 rpm. Una vez concluido el periodo de incubación, los cultivos se filtraron *in vacuo* y el micelio se lavó dos veces con 20 mL de agua Milli-Q para eliminar cualquier electrolito del medio de cultivo o liberado durante la manipulación del micelio. El micelio húmedo fresco se utilizó inmediatamente después para los bioensayos de permeabilidad celular y respiración (Peng *et al.*, 2012).

### 13.2.3. Efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos fitopatógenos de prueba

El efecto de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**), aislados del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13, sobre la permeabilidad de la membrana celular de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, se determinó mediante el método de fuga de electrolitos (Duan *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2010). El bioensayo se realizó bajo un diseño completamente al azar por cuadruplicado con dos repeticiones y cuatro tiempos de medición, utilizando una concentración de prueba de 250 ppm para los hongos verdaderos, y de 15, 20 y 25 ppm para los oomicetos. El control positivo, el agroquímico comercial Consist Max BAYER®, se evaluó en un rango de concentraciones de 10 a 250 ppm.

En una cubeta de vidrio de 17 mL de capacidad se adicionaron 5 mL de la disolución de prueba o control (positivo y negativo), y se midió la conductividad eléctrica de la disolución con un celda de conductividad **Orion 013005MD** conectada a un conductímetro **ThermoScientific OrionStar A212™**. Inmediatamente después, se adicionaron 40 mg de micelio húmedo fresco del microorganismo fitopatógeno de prueba y se realizó una segunda medición de conductividad. Los tubos se incubaron a 28 °C y 150 rpm y se realizaron mediciones de la conductividad a los tiempos 1, 2, 4 y 6 h de incubación. Al

finalizar la determinación, los tubos se transfirieron a un baño de agua a 90 °C y se calentaron durante 10 min. A continuación, las muestras se enfriaron en un baño de agua a temperatura ambiente y se realizó la medición de la conductividad total de las muestras.

La fuga de electrolitos se expresó como conductividad relativa y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Conductividad relativa} = \frac{C_i - C_0}{C_T - C_0} \times 100$$

En donde  $C_0$  representa la conductividad de la disolución sin micelio,  $C_i$  la conductividad obtenida a los diferentes tiempos y  $C_T$  la conductividad total (Peng *et al.*, 2012). Todas las mediciones se realizaron a  $23 \pm 1$  °C. El análisis estadístico de los resultados a cada tiempo se realizó con la prueba ANOVA de una vía, con un valor de confianza de 95% y una prueba de contrastes de Tukey, utilizando el software GraphPad Prisma versión 5.0.

### 13.2.4. Efecto sobre la respiración de los microorganismos fitopatógenos de prueba

El efecto cuantitativo de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre la respiración del micelio de los cuatro fitopatógenos de prueba, se realizó mediante la inhibición de la tasa de consumo de oxígeno (Yang *et al.*, 2010). El bioensayo se realizó bajo un diseño completamente al azar con cuatro réplicas por tratamiento con dos repeticiones y tres tiempos de medición, utilizando tres concentraciones de prueba en el intervalo de 75 a 250 ppm para los hongos verdaderos y de 15 a 25 ppm para los oomicetos. El control positivo Consist Max BAYER® se evaluó en un rango de concentraciones de 0.1 a 50 ppm.

En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm se adicionaron 40 mg de micelio húmedo fresco del microorganismo fitopatógeno de prueba y 500 µL de la disolución del compuesto de prueba o disolución control (positivo y negativo). Los tubos se incubaron a 28 °C y 150 rpm durante 2, 4 y 6 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se transfirieron a una cubeta de vidrio de 15 mL de capacidad y se adicionaron 3.5 mL de agua destilada a las muestras. Inmediatamente después, se determinó el consumo de oxígeno (%O<sub>2</sub> disuelto en agua) a  $27.5 \pm 0.5$  °C durante tres minutos, utilizando un **electrodo Clark** acoplado a un monitor de oxígeno biológico **YSI 5300A®**. Los valores de concentración de oxígeno

## Desarrollo experimental

---

disuelto (%O<sub>2</sub>) se graficaron en función del tiempo en una hoja de cálculo Excel®, y la tasa de consumo de oxígeno (TC<sub>O<sub>2</sub></sub>) se obtuvo a partir de la pendiente negativa de la recta. La inhibición de la tasa de consumo de oxígeno (I<sub>TC</sub>) se calculó con la siguiente ecuación:

$$I_{TC} = \left( \frac{TC_0 - TC_1}{TC_0} \right) * 100$$

En donde TC<sub>0</sub> y TC<sub>1</sub> son la tasa de consumo de oxígeno de las muestras control y de los diferentes tratamientos, respectivamente (Yang *et al.*, 2010). El cálculo de las CI<sub>50</sub> de la respiración, así como el análisis estadístico de los resultados a cada tiempo se llevó a cabo mediante la prueba ANOVA de una vía con un valor de confianza de 95% y una prueba de contrastes de Tukey, utilizando el software GraphPad Prisma versión 5.0.

---

## VIII. Resultados y discusión

La presente investigación se realizó con el propósito de evidenciar la actividad biológica de los metabolitos secundarios biosintetizados por los hongos endófitos cultivables *in vitro* de las especies *M. affinis* y *S. macrocarpum*, y de aislar metabolitos secundarios con potencial antifúngico y/o antioomiceto de alguno de los 21 hongos endófitos en estudio: siete hongos endófitos puros aislados de *M. affinis* y 14 aislados de *S. macrocarpum*, que poseen un elevado potencial antagonico sobre microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura.

Los resultados obtenidos se dividieron en seis secciones: (1) Obtención de cultivos en pequeña escala. (2) Evaluación del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica. (3) Selección y determinación de la mejor condición de cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13. (4) Cultivo a mayor escala del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 en la mejor condición, y estudio químico biodirigido de sus extractos orgánicos bioactivos. (5) Aislamiento, purificación y caracterización estructural de los compuestos responsables de la actividad biológica. (6) Determinación de las concentraciones inhibitorias medias (CI<sub>50</sub>) de dos de los ácidos fusárico y 9,10-deshidrofusárico, y exploración de su mecanismo de acción sobre el crecimiento micelial y la morfología de las hifas, la integridad de la membrana celular y la tasa de respiración de los microorganismos fitopatógenos blanco.

### 1. Cultivo en pequeña escala de los hongos endófitos cultivables *in vitro* de las especies *M. affinis* y *S. macrocarpum*

El cultivo en pequeña escala de los 21 hongos endófitos en estudio, se realizó empleando 1 L de medio CPD, e incubando a los microorganismos bajo condiciones estáticas durante 30 días a temperatura ambiente y fotoperiodos luz fluorescente-oscuridad 12/12h. En estudios previos se demostró que las condiciones estáticas favorecen la producción de metabolitos secundarios activos, y que el medio de cultivo CPD, permite su producción en cantidades apropiadas para su extracción (Sánchez-Ortíz, 2016; Meléndez-González *et al.*, 2015; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013;). El tiempo de incubación fue suficiente para que el desarrollo micelial de los endófitos cubriera la superficie del medio de cultivo, generando suficiente biomasa productora de metabolitos secundarios.

## Resultados y discusión

En los **Cuadros 14** y **15** se presentan los rendimientos de los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo y micelio de los cultivos de los hongos endófitos aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum*, respectivamente. La mayoría de los extractos generados a partir del micelio de los endófitos de *M. affinis* mostraron rendimientos superiores a 250 mg/L. En general, los extractos del medio de cultivo tuvieron rendimientos mayores a 100 mg/L. Los hongos MAE4 y MAE5 exhibieron los mayores rendimientos (**Cuadro 14**). Cabe destacar que los extractos de medio de cultivo y de micelio del hongo endófito MAE5 presentaron rendimientos superiores a 2.4 g/L.

**Cuadro 14.** Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos aislados de *M. affinis*, derivados de cultivos en pequeña escala.

Aislamiento	Medio de cultivo (mg/L)	Micelio (mg/L)
MAE1	130.8	260.0
MAE2	133.8	77.8
MAE3	122.5	63.5
MAE4	700.9	25.3
MAE5	2475.6	3038.5
MAE6	16.7	879.7
MAE7	127.5	647.6

En general, los extractos orgánicos derivados del micelio y medio de cultivo de los hongos endófitos aislados de *S. macrocarpum*, mostraron rendimientos superiores a 100.0 y 145.0 mg/L. Los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo de los hongos SME5, SME10 y SME13 tuvieron los mayores rendimientos (**Cuadro 15**). Con respecto a los extractos orgánicos del micelio, los endófitos SME4, SME8 y SME9 mostraron los rendimientos más altos (**Cuadro 15**).



**Cuadro 15.** Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos aislados de *S. macrocarpum*, derivados de cultivos en pequeña escala.

Aislamiento	Medio de cultivo (mg/L)	Micelio (mg/L)	Aislamiento	Medio de cultivo (mg/L)	Micelio (mg/L)
SME1	87.5	95.5	SME8	212.8	1946.3
SME2	229.2	60.99	SME9	215.6	1784.7
SME3	6.1	338.9	SME10	521.1	307.4
SME4	74.9	895.9	SME11	128.1	105.9
SME5	804.6	290.3	SME12	109.2	171
SME6	146.1	71.1	SME13	500.1	398.8
SME7	70.1	135.5	SME14	182.1	89.6

El perfil cromatográfico de los extractos del micelio y medio de cultivo de los hongos endófitos en estudio fue comparado mediante cromatografía en capa fina (CCF), lo que permitió, con excepción de los extractos fúngicos derivados de los hongos SME5 y SME12 que resultaron diferentes, reunir los extractos del medio de cultivo obtenidos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt, al mostrar perfiles cromatográficos similares. De la misma forma, los extractos orgánicos del micelio obtenidos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt mostraron perfiles cromatográficos similares, reuniéndose. Por otra parte, los perfiles cromatográficos de los extractos del micelio y medio de cultivo derivados de los hongos MAE6 y SME3 resultaron similares y, en consecuencia, se unieron en un extracto total. En total se obtuvieron 43 extractos fúngicos de los 21 hongos endófitos en estudio cultivados en CPD. El rendimiento obtenido de los 43 extractos fue suficiente para su análisis por CCF y para realizar su evaluación biológica sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura.

## Resultados y discusión

### 2. Evaluación del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura

El potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos obtenidos del medio de cultivo y del micelio de los hongos endófitos de *M. affinis* y *S. macrocarpum*, se estableció cuantitativamente mediante la evaluación de su efecto a la concentración de 250 ppm, sobre el crecimiento radial de cuatro microorganismos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica: los oomicetos *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*, y los hongos verdaderos; *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Para los oomicetos se empleó como control positivo el antioomiceto comercial Ridomil 4E® (Metalaxil-M) y para los hongos verdaderos el fungicida Prozicar 50® (Carbendazim), ambos a la concentración de 250 ppm.

En las **Figuras 18 y 19** se presentan los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento radial de los oomicetos y hongos fitopatógenos de prueba, respectivamente. En las gráficas, se señalan los porcentajes de inhibición que corresponden a la actividad antifúngica y/o antioomiceto baja (1-24%), moderada (25-50%) y alta (51-100%). Estos valores fueron asignados de manera arbitraria tomando el promedio de la actividad biológica demostrada por la evaluación biológica de 36 extractos fúngicos derivados del cultivo en pequeña escala de 75 hongos endófitos aislados de 11 diferentes plantas recolectadas en la REBIOSH (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

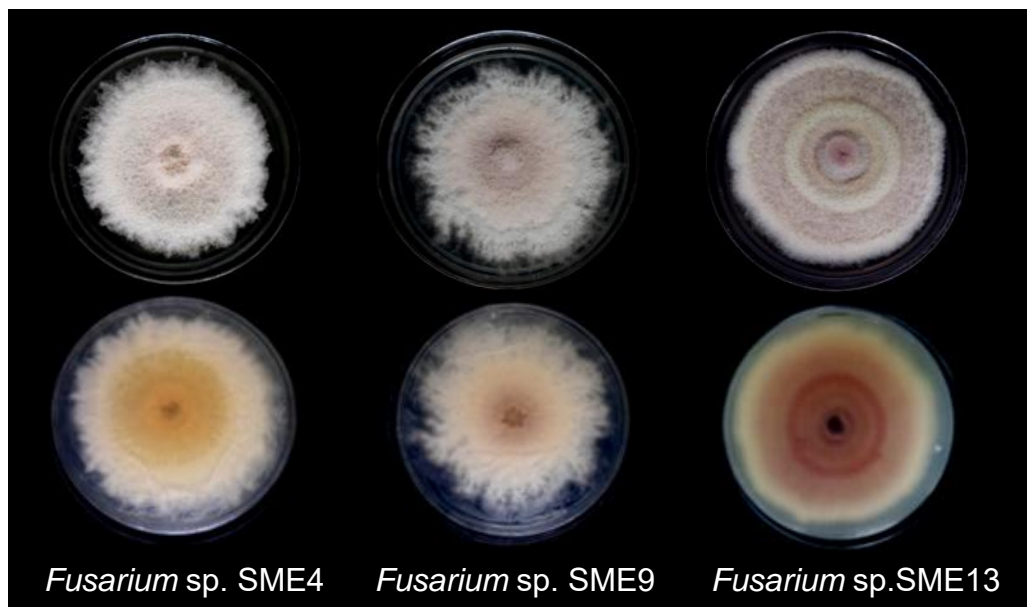
En general, los extractos orgánicos evaluados provocaron una inhibición significativa del crecimiento de los oomicetos fitopatógenos y, en particular, sobre *P. capsici*. La mayoría de los extractos de medio de cultivo presentaron actividad antioomiceto alta (**Figura 18**). Cabe destacar a los extractos orgánicos de los endófitos MAE3, SME4, SME7, SME9, SME10 y SME13, que inhibieron en un 100% el crecimiento de *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, siendo comparable su efecto al provocado por el antioomiceto comercial Ridomil 4E®.

Por otro lado, la mayoría de los extractos fúngicos presentaron actividad biológica baja y moderada sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *A. alternata* y *F. oxysporum*. Sin embargo, los extractos del medio de cultivo de los endófitos MAE1, SME4, SME9 y SME13 mostraron actividad alta sobre *A. alternata*, y los extractos de los hongos MAE2, MAE3, MAE5, MAE7, SME2, SME4, SME6, SME7 y SME10, actividad biológica moderada. En particular, el extracto del medio de cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento

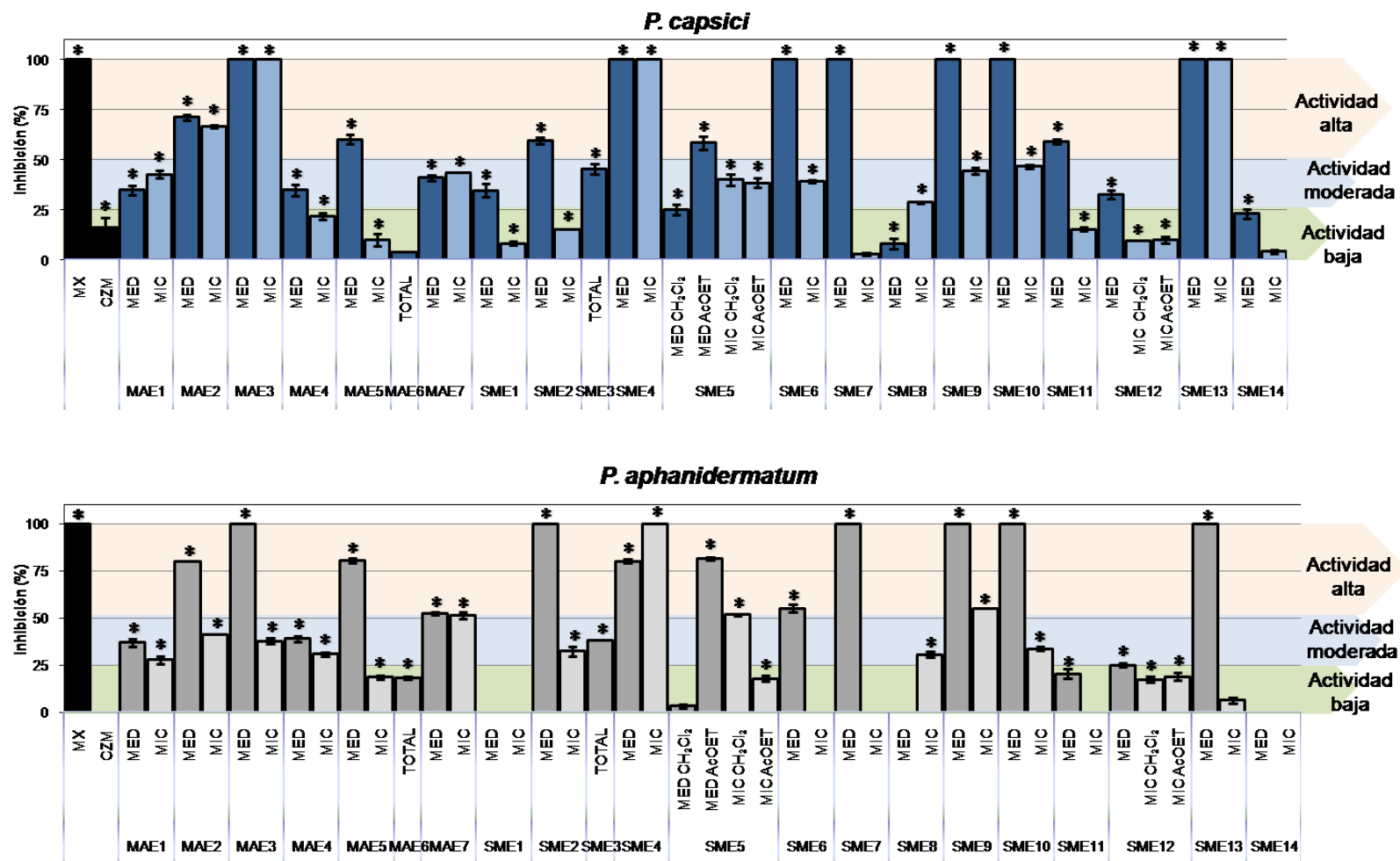
SME13 inhibió en un 100% el crecimiento del hongo fitopatógeno *A. alternata*, mostrando un efecto superior al control positivo el fungicida comercial Prozicar 50® que inhibió en un 18% el crecimiento del fitopatógeno. Finalmente, los extractos de los endófitos MAE2, MAE3, MAE5, SME1, SME2, SME4 y SME11 presentaron actividad moderada sobre *F. oxysporum*.

Los hongos endófitos SME4, SME9 y SME13 aislados de *S. macrocarpum* mostraron el mayor potencial antifúngico y antioomiceto, inhibiendo con porcentajes significativos altos el crecimiento de al menos tres de los microorganismos fitopatógenos de prueba (**Figura 20**).

Los tres hongos con mayor potencial antioomiceto y antifúngico pertenecen al género *Fusarium*, de acuerdo con sus características macroscópicas y microscópicas (**Cuadro 5, Antecedentes**), el cual incluye numerosas especies endófitas, epífitas y fitopatógenas en prácticamente todas las familias de plantas. Además, se ha reportado que estos microorganismos producen micotoxinas y metabolitos secundarios bioactivos (Leslie *et al.*,2006).

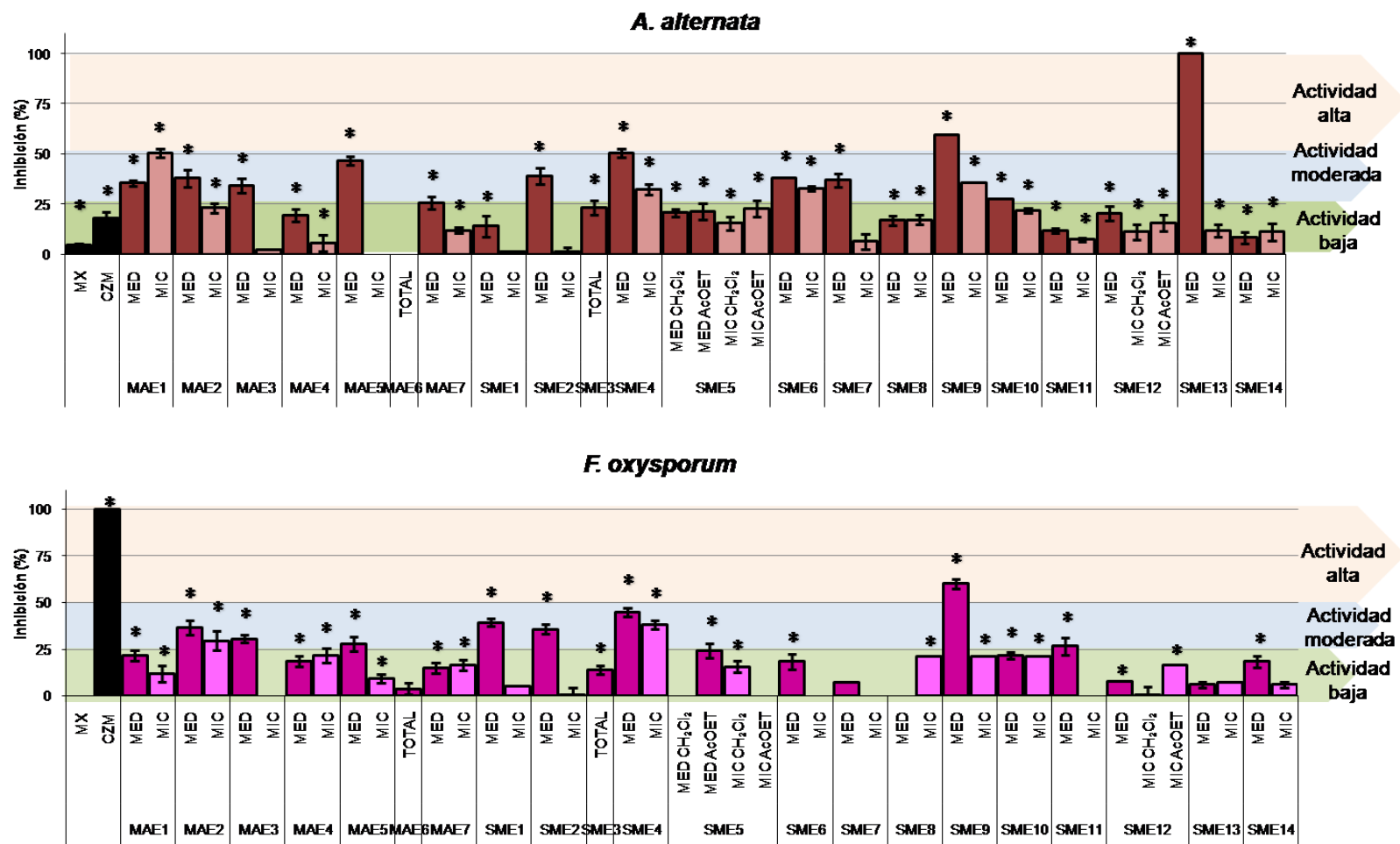


**Figura 20.** Hongos endófitos aislados de *S. macrocarpum* con el mayor potencial antioomiceto y antifúngico.



**Figura 18.** Actividad antiomoceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum* sobre el crecimiento de *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, evaluados a 250 ppm. Las barras oscuras representan los extractos obtenidos del medio de cultivo y las claras los extractos obtenidos del micelio. (\*) Resultados estadísticamente significativos con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Controles positivos Ridomil 4E® (MX) y Prozicar 50® (CZM), evaluados a la concentración de 250 ppm.

## Resultados y discusión



**Figura 19.** Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum* sobre el crecimiento de *A. alternata* y *F. oxysporum*, evaluados a 250 ppm. Las barras oscuras representan los extractos obtenidos del medio de cultivo y las claras los extractos obtenidos del micelio. (\*) Resultados estadísticamente significativos con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Controles positivo Ridomil 4E® (MX) y Prozaricar 50® (CZM) evaluados a la concentración de 250 ppm.

## Resultados y discusión

---

### 3. Selección y determinación de la mejor condición de cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13

El hongo endófito *Fusarium* sp. SME13 aislado de las hojas de *S. macrocarpum* fue uno de los hongos que mostró mayor potencial antioomiceto y antifúngico, ya que el extracto del medio de cultivo inhibió en un 100% el crecimiento de los oomicetos, *P. aphanidermatum* y *P. capsici*, y del hongo *A. alternata*, a la concentración de 250 ppm. Por su parte, el extracto del micelio también inhibió en un 100% el crecimiento de *P. capsici*, siendo los efectos antimicrobianos, en todos los casos iguales o superiores a los provocados por los controles positivos Ridomil 4E® y Prozarcar 50®, ambos evaluados a la concentración de 250 ppm (**Figuras 18 y 19**).

Tomando en cuenta la actividad biológica demostrada por los extractos fúngicos del hongo *Fusarium* sp. SME13 y, con el fin de incrementar la producción de metabolitos secundarios bioactivos, el hongo se cultivó de nueva cuenta en pequeña escala en medio CPD y arroz en diferentes condiciones de incubación.

En los cultivos fúngicos, la calidad y cantidad de medio de crecimiento, la luz, la temperatura y el material del recipiente contenedor, son de especial importancia (Bode *et al.*, 2012; Scherlach & Hertweck, 2008). El medio de cultivo CPD se considera semisintético por contener sustancias naturales (caldo de papa) y elementos sintéticos definidos (2% de dextrosa), y es útil para el crecimiento de la mayoría de hongos cultivables. Los cultivos sin agitación o estacionarios de hongos aerobios tienen crecimiento casi exclusivamente superficial (siempre que el inóculo no se hunda). Los cultivos en agitación permiten la aireación del medio líquido y la uniformidad de los nutrientes (French & Hebert, 1980). Por otro lado, el medio arroz es natural por consistir únicamente de material vegetal (semillas de arroz). Actualmente, las fermentaciones en medios sólidos han sido relevantes para la producción de metabolitos primarios útiles en industria alimentaria, enzimas y metabolitos secundarios bioactivos (Barrios-González & Tarragó-Castellanos, 2015).

En la **Figura 21A y B** se comparan los rendimientos de los extractos fúngicos derivados de las diferentes condiciones de incubación del endófito *Fusarium* sp. SME13. El cultivo del hongo en medio CPD incubado bajo condiciones estáticas, y a temperatura ambiente fue el que favoreció la mayor producción de metabolitos secundarios, obteniéndose los mayores rendimientos para los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio. Por otra parte, cuando el endófito se cultivó en medio CPD y se incubó estáticamente a temperatura

controlada de 28 °C, el rendimiento de los extractos del medio de cultivo y micelio disminuyó en un 75% y 44%, respectivamente. Del mismo modo, cuando el hongo se cultivó en medio CPD y se incubó bajo condiciones de agitación a 150 rpm y 28 °C, el rendimiento del extracto de medio de cultivo disminuyó 73% con respecto al cultivo en CPD en condiciones estáticas y a temperatura ambiente. Sin embargo, el rendimiento del extracto del micelio aumentó un 7%.

Los perfiles químicos de los extractos orgánicos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y de AcOEt del medio de cultivo y los de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y de AcOEt del micelio derivados del cultivo bajo diferentes condiciones del hongo *Fusarium* sp. SME13, fueron analizados por CCF, observándose que eran similares por lo que ambos extractos se reunieron. Por otro lado, el análisis mediante CCF demostró que únicamente los perfiles cromatográficos de los extractos de medio de cultivo y micelio, originados del cultivo en condiciones de agitación fueron similares por lo que se reunieron en un extracto total, para su posterior evaluación biológica.

Los extractos fúngicos derivados del cultivo del endófito *Fusarium* sp. SME13 en medio arroz se obtuvieron con hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt, reuniéndose los dos últimos por su similitud cromatográfica en CCF. El rendimiento del extracto hexánico fue menor comparado al del extracto orgánico de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt.

A continuación, y con el objetivo de determinar la mejor condición de cultivo del endófito seleccionado, con base en el rendimiento de los extractos fúngicos y en la actividad biológica, se determinó cuantitativamente el efecto de los extractos orgánicos sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba.

En la **Figura 21C** se presenta el efecto inhibitorio comparativo de los extractos de *Fusarium* sp. SME13, cultivado bajo diferentes condiciones, sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba. Los extractos derivados del medio de cultivo en medio CPD en condiciones de incubación estáticas empleando las dos temperaturas de prueba, inhibieron en un 100% el crecimiento de los oomicetos *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, y del hongo *A. alternata*. Por su parte, los extractos obtenidos del micelio inhibieron en un 100% el crecimiento del oomiceto *P. capsici*. Cabe señalar que la actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos obtenidos a partir de los cultivos estáticos en medio CPD a 28 °C, fue mayor comparada con la provocada por extractos orgánicos del cultivo a temperatura ambiente en CPD. Sin embargo, se eligió esta última condición de

## Resultados y discusión

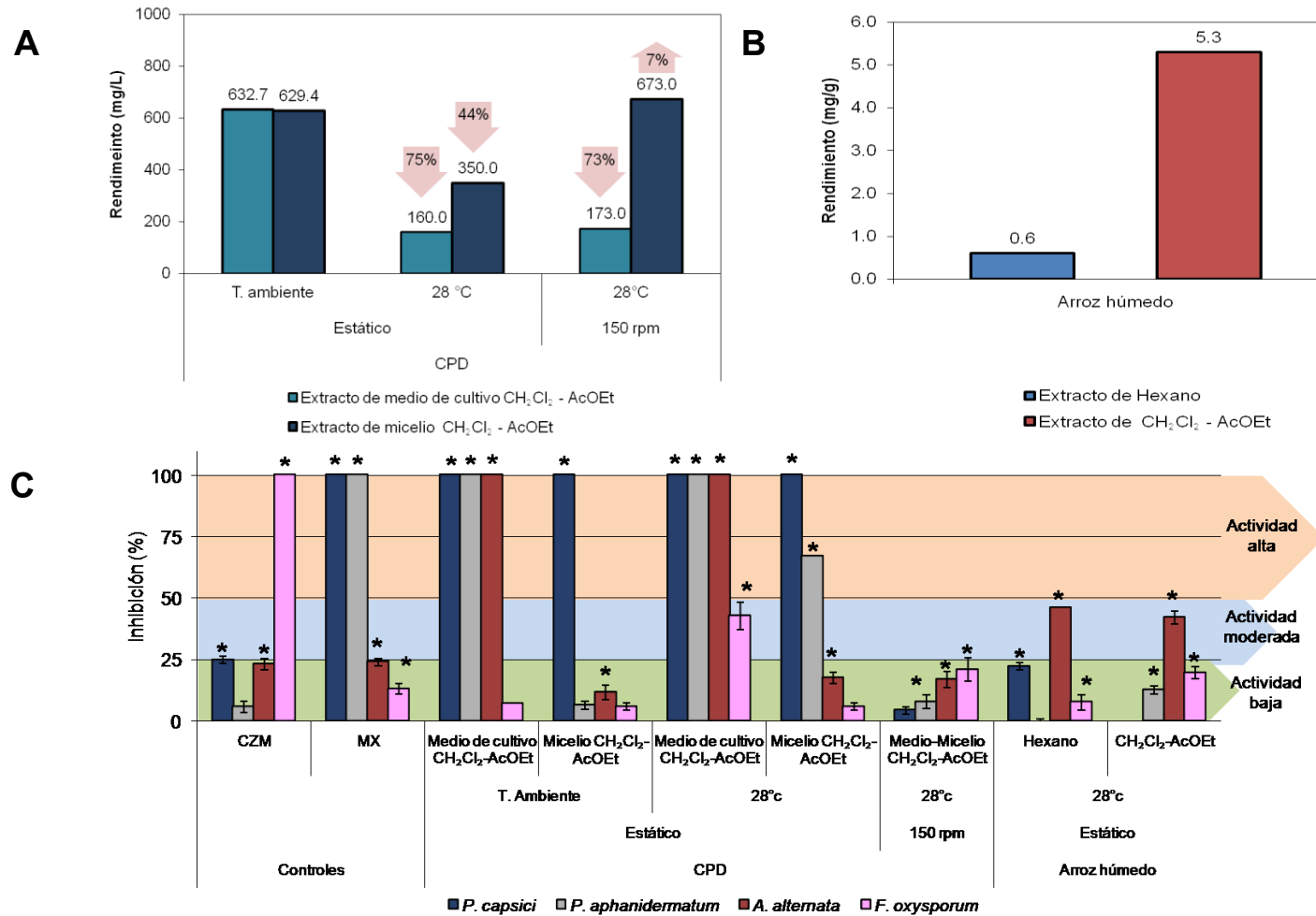
---

crecimiento como la mejor forma de cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. SME13 debido al mayor rendimiento de sus extractos orgánicos.

Por último, en general la actividad biológica de los extractos orgánicos (hexano y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt) derivados del cultivo en medio arroz, mostraron porcentajes significativos con valores dentro de la actividad moderada y baja. El hongo *A. alternata*, fue el microorganismo más afectado inhibiendo su crecimiento en más de 40%.



## Resultados y discusión



**Figura 21.** (A y B) Comparación de los rendimientos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de los cultivos del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 bajo diferentes condiciones (C). Actividad antifúngica y antioomiceto de los diferentes extractos orgánicos, evaluados a la concentración de 250 ppm. (\*) Resultados estadísticamente significativos con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Controles positivo Prozicar 50® (CZM) y Ridomil 4E® (MX), evaluados a la concentración de 250 ppm.

## Resultados y discusión

---

### 4. Cultivo a mayor escala del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13 y estudio químico biodirigido de sus extractos orgánicos

Una vez seleccionada la mejor condición para el cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13, se llevó a cabo su cultivo a mayor escala, con el fin de aislar los metabolitos secundarios responsables de las actividades antioomiceto y antifúngica, mediante un fraccionamiento químico biodirigido de los extractos de medio de cultivo y micelio.

El cultivo en mediana escala del hongo *Fusarium* sp. SME13 se realizó en un solo lote, empleando 15 matraces Fernbach de 3 L conteniendo 1.2 L de medio CPD. El microorganismo se incubó bajo condiciones estáticas durante 30 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos luz fluorescente-oscuridad 12/12h. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se obtuvieron los extractos orgánicos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt, siguiendo el procedimiento de extracción utilizado para el cultivo en CPD en pequeña escala. Paralelamente, con el objetivo de confirmar que los perfiles químicos generados de los extractos de mediana escala correspondieran a los obtenidos a partir de los cultivos en pequeña escala, se realizó el análisis cromatográfico de los extractos en CCF.

La extracción del cultivo en lote del hongo endófito *Fusarium* sp. SME13 permitió la obtención de 2.9 g de extracto total CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt de medio de cultivo y 7.2 g de extracto total CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt de micelio.

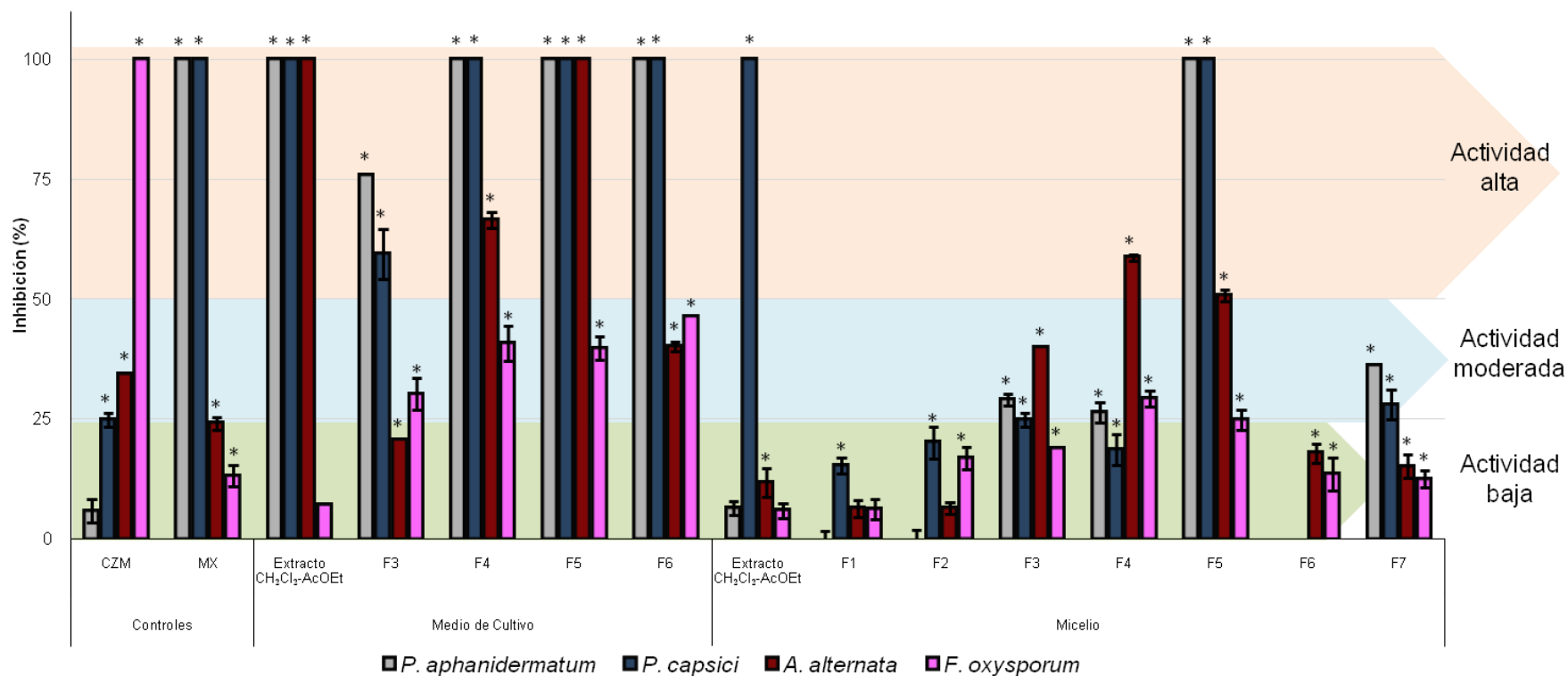
El fraccionamiento químico primario del extracto de medio de cultivo y micelio se realizó mediante cromatografía en columna abierta con diferentes mezclas de elución de polaridad creciente. El fraccionamiento primario permitió la obtención de 6 y 7 fracciones de medio de cultivo y micelio, respectivamente (**Cuadro 8 y 9, Desarrollo experimental**). La abundancia de las fracciones primarias F3 a F6 de medio de cultivo, y F1 a F7 de micelio, fue suficiente para su evaluación biológica y su posterior fraccionamiento secundario. La actividad biológica de las fracciones primarias obtenidas se determinó cuantitativamente sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba.

En la **Figura 22** se muestra la actividad antioomiceto y antifúngica de las fracciones primarias evaluadas a 250 ppm. Las fracciones F4 a F6 derivadas del extracto del medio de cultivo y la fracción F5 derivada del extracto del micelio presentaron actividad antioomiceto alta sobre *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, inhibiendo en un 100% su crecimiento, efecto comparable al del control positivo Ridomil 4E® (250 ppm). Por otro lado, las fracciones F5 de

## Resultados y discusión

---

medio de cultivo y F4 de micelio mostraron la mayor actividad sobre el hongo fitopatógeno *A. alternata*, afectando su crecimiento en un 100% y 58.6%, respectivamente. En ambos casos el efecto antifúngico fue superior al producido por el control positivo Prozicar 50® (250 ppm). Las fracciones primarias evaluadas presentaron actividad antimicrobiana moderada y baja sobre *F. oxysporum* inhibiendo su crecimiento entre 12.4% y 46.3%, siendo superior a la actividad baja generada por el extracto crudo total del medio de cultivo y del micelio (6.9 y 5.8%, respectivamente).

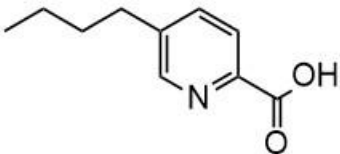
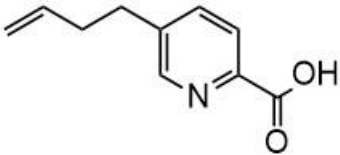
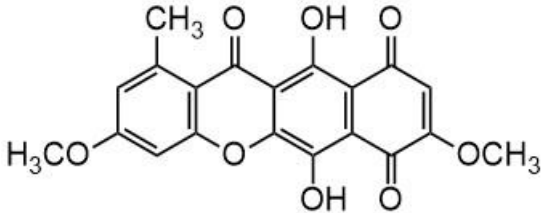


**Figura 22.** Actividades antifúngica y antioomiceto de las fracciones primarias obtenidas del medio de cultivo y micelio del hongo *Fusarium* sp. aislamiento SME13 cultivado en medio CPD, bajo condiciones de incubación estáticas. Los bioensayos se realizaron a una concentración de 250 ppm. (\*) Resultados estadísticamente significativos con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Controles positivo Ridomil 4E® (MX) y Prozacar 50® (CZM), evaluados a la concentración de 250 ppm.

**5. Aislamiento, purificación y caracterización estructural de los compuestos responsables de la actividad biológica**

El estudio químico biodirigido de los extractos del medio de cultivo y micelio del hongo endófito *Fusarium* sp. SME13, permitió el aislamiento de tres metabolitos secundarios: los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) y la bikaverina (**35**). En el **Cuadro 16** se muestran las estructuras de los tres metabolitos secundarios, su rendimiento y las fracciones o extractos activos de los cuales fueron aislados.

**Cuadro 16.** Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13.

Metabolito secundario	Rendimiento (mg/L)	Extracto / Fracción
 Ácido fusárico ( <b>9</b> )	7.37	F4 y F5 Medio de cultivo
 Ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )	2.63	F4 y F5 Medio de cultivo
 Bikaverina ( <b>35</b> )	0.89	Extracto de micelio y fracción F5 Micelio

**5.1 Caracterización de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34)**

El compuesto **9** se obtuvo como un sólido blanco cristalino. El espectro de masas (**Espectro 1**) presenta un ion molecular  $[M^{+}]$  en una relación m/z de 179. De acuerdo con la regla del nitrógeno, la molécula tiene un número impar de átomos de nitrógeno

## Resultados y discusión

---

(McMurry, 2012; Harris, 2012), lo que permite establecer la fórmula molecular  $C_{10}H_{13}NO_2$ . El espectro en el IR (**Espectro 2**) presentó bandas de absorción débiles en  $\nu_{\max}$  3079 y 3057  $cm^{-1}$ , indicando la presencia de enlaces C-H insaturados, bandas de absorción media en  $\nu_{\max}$  2956, 2923 y 2858  $cm^{-1}$ , indicando la presencia de enlaces C-H saturado y una banda de absorción intensa y bien definida en  $\nu_{\max}$  1698  $cm^{-1}$ , indicando la presencia de un grupo carbonilo.

En el espectro de RMN  $^{13}C$  (**Espectro 3**) se observan diez señales, que se encuentran en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. Los experimentos DEPT 90 y 135 (**Espectros 4 y 5**, respectivamente) permiten establecer el tipo de cada uno de los carbonos, asignándolos a un carbonilo en  $\delta_C$  164.75 (C-11), dos carbonos cuaternarios en  $\delta_C$  144.36 (C-2) y 143.28 (C-5), tres metinos en  $\delta_C$  148.10 (C-6), 138.16 (C-4) y 123.84 (C-3), tres metilenos en  $\delta_C$  32.94 (C-7), 32.80 (C-8) y 22.22 (C-9) y un metilo en  $\delta_C$  13.77 (C-10).

En el espectro de RMN  $^1H$  (**Espectro 6**) se observan siete señales. A campo bajo se aprecian tres señales de hidrógenos aromáticos en  $\delta_H$  en 8.53 (H- 6), 8.16 (H-3) y 7.75 (H-4), que integran cada una para un hidrógeno y que muestran correlación con los carbonos C-6, C-3 y C-4 en el espectro HSQC, respectivamente (**Espectro 7**). A campo alto, se observaron tres señales de hidrógenos de metileno en  $\delta_H$  2.73 ( $CH_2$ -7), 1.65 ( $CH_2$ -8) y 1.38 ( $CH_2$ -9), que integran para dos hidrógenos cada una y que muestran correlación con los carbonos C-7, C-8 y C-9 en el espectro HSQC. Finalmente, se observó una señal de metilo en  $\delta_H$  0.94 ( $CH_3$ -10), que integra para tres hidrógenos y correlaciona con el carbono C-10 en el espectro HSQC.

Por otro lado, el compuesto **34** se obtuvo como un sólido blanco amorfo. El espectro de masas (**Espectro 8**) presenta un ion molecular  $[M^{+\bullet}]$  en una relación m/z de 177, dos unidades menor al presentado por el espectro del compuesto **9**, lo que permite establecer la fórmula molecular  $C_{10}H_{11}NO_2$ . El espectro en IR (**Espectro 9**) presentó bandas de absorción similares a las generadas por el compuesto **19**. Asimismo, en el espectro de RMN  $^{13}C$  (**Espectro 10**) del compuesto **34** se observan diez señales bien definidas y que están en armonía con la fórmula molecular establecida. De estas señales, ocho presentan desplazamientos químicos similares a los presentes en el espectro de RMN  $^{13}C$  del compuesto **9** y que corresponden a los carbonos C-11 ( $\delta_C$  164.43), C-6 ( $\delta_C$  148.29), C-2 ( $\delta_C$  144.25), C-5 ( $\delta_C$  142.22), C-4 ( $\delta_C$  138.21), C-3 ( $\delta_C$  123.56), C-8 ( $\delta_C$  34.61), C-7 ( $\delta_C$  32.40). Las señales de los carbonos C-9 en  $\delta_C$  22.22 y C-10 en  $\delta_C$  13.77 presentes en el

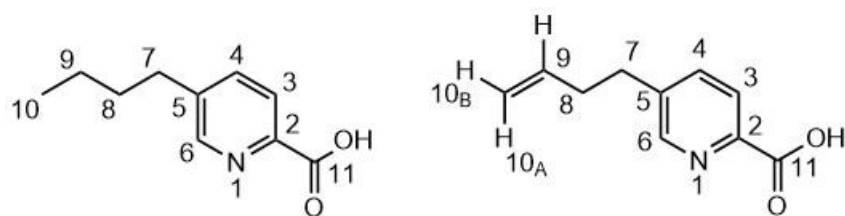
espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **9**, se desplazan a la región de los carbonos  $\text{sp}^2$  de dobles enlaces C-C, en  $\delta_{\text{C}}$  136.30 y 116.40, respectivamente, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **34**. Siguiendo el mismo orden, estas señales corresponden a un metino y un metileno conforme a los espectros DEPT 90 y 135 (**Espectros 11 y 12**). Por otra parte, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 13**) se observan ocho señales. A campo bajo, se aprecian tres señales de hidrógenos aromáticos similares a las del espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **9** en  $\delta_{\text{H}}$  en 8.48 (H-6), 8.15 (H-3) y 7.75 (H-4) que integran cada una para un hidrógeno. Sin embargo, las señales de los hidrógenos H-9 en  $\delta_{\text{H}}$  1.38 y H-10 en  $\delta_{\text{H}}$  0.94, presentes en el espectro del compuesto **9** y que integran para dos hidrógeno cada una, se desplazan a la región de los hidrógenos vinílicos en  $\delta_{\text{H}}$  5.8 (H-9) y 5.05 (H-10<sub>A</sub>) y 5.01 (H-10<sub>B</sub>), integrando cada una para un hidrógeno. Finalmente, a campo alto, se observan dos señales de hidrógenos de metileno en  $\delta_{\text{H}}$  2.84 (CH<sub>2</sub>-7) y 2.43 (CH<sub>2</sub>-8) que integran para dos hidrógenos cada una.

En el **Cuadro 17** se reúnen los datos espectroscópicos de los compuestos **9** y **34**. Con base en el análisis espectroscópico y espectrométrico anterior, el metabolito secundario **9** se estableció como ácido 5-butilpiridin-2-carboxílico, conocido como ácido 5-butilpicolínico o ácido fusárico, y el compuesto **34** como ácido 5-but-3-enilpiridin-2-carboxílico o ácido 9,10-deshidrofusárico (**Figura 23**). Cabe señalar que en ambos casos los valores espectroscópicos se encuentran en armonía con los descritos previamente en la literatura (Son *et al.*, 2008; Cappaso *et al.*, 1996; Abraham & Hensenn, 1992).

## Resultados y discusión

**Cuadro 17.** Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  a 100MHz y 400 MHz, respectivamente, de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) en  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  en ppm).

Posición	ácido fusárico ( <b>9</b> )		ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ Mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ Mult., $J$ (Hz)
2	144.36	-	144.25	-
3	123.84	8.16 (d, 1H) $J = 7.5$	123.56	8.15 (d, 1H) $J = 7.4$
4	138.16	7.75 (d, 1H) $J = 7.6$	138.21	7.75 (d, 1H) $J = 7.8$
5	143.28	-	142.22	-
6	148.10	8.53 (s, 1H)	148.29	8.48 (s, 1H)
7	32.94	2.73 (t, 2H) $J = 7.8$	32.40	2.84 (t, 2H) $J = 7.6$
8	32.80	1.65 (q, 2H) $J = 7.6$	34.61	2.43 (q, 2H)
9	22.22	1.38 (h, 2H) $J = 7.3$	136.30	5.80 (ddt, 1H) $J_{8,9} = 6.6$ , $J_{9,10A} = 19.2$ , $J_{9,10B} = 9.7$
10	13.77	0.94 (t, 3H) $J = 7.3$	116.40	A 5.05 (m, 1H) B 5.01 (m, 1H)
11	164.75	-	164.43	-



**Figura 23.** Estructura de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**).



### 5.2. Caracterización de la 6,11-dihidroxi-3,8-dimetoxi-1-metil-benzo[b]xanton-7,10,12-triona (**35**) o bikaverina

El compuesto **35** se obtuvo como un sólido amorfo de color rojo con baja solubilidad en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{AcOEt}$ , insoluble en hexano y  $\text{CH}_3\text{OH}$ . El espectro de masas (**Espectro 15**) presenta un ion molecular  $[\text{M}^{+\bullet}]$  en una relación  $m/z$  de 382, lo que permite establecer la fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_8$ . El espectro en el IR (**Espectro 16**) muestra bandas de absorción débiles en  $\nu_{\text{max}}$  3069 y  $3010\text{ cm}^{-1}$ , indicando la presencia de enlaces C-H insaturados, y en  $\nu_{\text{max}}$  2989 y  $2928\text{ cm}^{-1}$ , indicando la presencia de enlaces C-H saturado, y bandas de absorción poco definidas en  $\nu_{\text{max}}$  1643, 1601 y  $1579\text{ cm}^{-1}$ , indicando la presencia de grupos carbonilo.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 17**) se observan 20 señales asignables a la molécula. El experimento HSQC editado (**Espectros 18**) permite establecer el tipo de cada uno de los carbonos, asignándolos a tres carbonilos en  $\delta_{\text{C}}$  180.62 (C-7), 184.54 (C-10) y 176.62 (C-12), seis carbonos aromáticos base de oxígeno en  $\delta_{\text{C}}$  167.71 (C-6), 164.49 (C-3), 159.07 (C-8), 158.51 (C-4a) y 158.18 (C-5a), 152.30 (C-11), cinco carbonos cuaternarios en  $\delta_{\text{C}}$  144.26 (C-1), 117.40 (C-6a), 115.78 (C-12a), 112.46 (C-11a) y 106.22 (C-10a), dos metoxilos en  $\delta_{\text{C}}$  56.92 ( $\text{OCH}_3$ -3) y 56.11 ( $\text{OCH}_3$ -8), tres metinos aromáticos en  $\delta_{\text{C}}$  117.94 (C-2), 112.55 (C-9) y 98.92 (C-4), y un metilo sobre anillo aromático en  $\delta_{\text{C}}$  29.86 ( $\text{CH}_3$ -1).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 19**) se observan ocho señales simples. A campo bajo se aprecian dos señales para grupos hidroxilo quelatados en  $\delta_{\text{H}}$  14.31 (OH-6) y 12.79 (OH-11), en la región de los hidrógenos aromáticos se observan tres señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.93 (H-4), 6.80 (H-2) y 6.35 (H-9), que integran para un hidrógeno cada una. También, se observan dos señales en  $\delta_{\text{H}}$  3.96 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -3) y 3.93 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -8), que integran cada una para tres hidrógenos asignables a dos grupos metoxilos. A campo alto del espectro, se observa una señal que integra para tres hidrógenos asignable a un metilo sobre anillo aromático en  $\delta_{\text{H}}$  2.86 ( $\text{CH}_3$ -1).

Los desplazamientos químicos de los carbonos cuaternarios se asignaron y confirmaron mediante el análisis detallado del espectro de RMN de correlación heteronuclear HMBC (**Espectro 20**). Las principales correlaciones observadas corresponden al hidrógeno del grupo hidroxilo en  $\delta_{\text{H}}$  14.31 (OH-6) con los carbonos cuaternarios en  $\delta_{\text{C}}$  106.22 (OH-6/C-10a), 117.40 (OH-6/C-6a), 158.18 (OH-6/C-5a), con el carbonilo en  $\delta_{\text{C}}$  180.62 (OH-6/C-7)

## Resultados y discusión

---

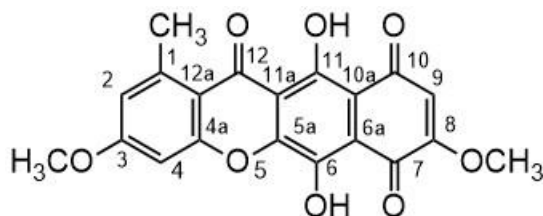
y con su carbono base en  $\delta_C$  167.71 (C-6). Por otra parte, se observaron las correlaciones del hidrógeno del grupo OH-11 en  $\delta_H$  12.79, con los carbonos cuaternarios en  $\delta_C$  112.46 (OH-11/C-11a) y  $\delta_C$  106.22 (OH-11/C-10a), con el carbonilo en  $\delta_C$  176.62 (OH-11/C-12) y con su carbono base en  $\delta_C$  152.30. En el **Cuadro 18** se reúnen los datos espectroscópicos del compuesto **35** y se indican todas las correlaciones observadas en el espectro HMBC que permitieron la asignación de los sustituyentes en el núcleo base de compuesto **35**. Los valores espectroscópicos de RMN  $^{13}C$  y RMN- $^1H$  del compuesto **35** son similares a los reportados en la literatura y obtenidos en  $CDCl_3$ - $CF_3CO_2D$  (1:1) (Wiemann *et al.*, 2009; Son *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2003; McInnes *et al.*, 1976; Kjaer *et al.*, 1971; Cornforth *et al.*, 1971). Cabe mencionar, que es la primera vez que se obtienen los datos espectroscópicos en  $CDCl_3$  a 700 MHz y que se asignan todos los desplazamientos químicos de los protones y carbonos presentes en la molécula. La estructura de la bikaverina se muestra en la **Figura 24**.

**Cuadro 18.** Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  a 175MHz y 700MHz, respectivamente, del compuesto **35** en  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  en ppm).

Posición	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ Mult.	HMBC
1	144.26	-	$\text{CH}_3$ -1
2	117.94	6.86 (s, 1H)	H-4, $\text{CH}_3$ -1
3	164.49	-	H-2, H-4, $\text{OCH}_3$ -3
4	98.92	6.93(s, 1H)	H-2, $\text{CH}_3$ -1
4a	158.51	-	H-4, $\text{CH}_3$ -1
5	-	-	-
5a	158.18	-	OH-6
6	167.71	-	OH-6
6a	117.40	-	OH-6
7	180.62	-	OH-6
8	159.07	-	H-9, $\text{OCH}_3$ -8
9	112.55	6.35 (s, 1H)	H-9
10	180.54	-	H-9
10a	106.22	-	H-9, OH-6, OH-11
11	152.30	-	OH-11
11a	112.46	-	OH-11
12	176.62	-	$\text{CH}_3$ -1, OH-6
12a	115.78	-	H-2, H-4, $\text{CH}_3$ -1
$\text{CH}_3$ -1	29.86	2.86 (s, 3H)	
$\text{OCH}_3$ -3	56.92	3.96 (s, 3H)	
$\text{OCH}_3$ -8	56.11	3.93 (s, 3H)	
OH-6	-	14.31 (s, 1H)	
OH-11	-	12.79 (s, 1H)	

## Resultados y discusión

---



**Figura 24.** Estructura de la 6,11-dihidroxi-3,8-dimetoxi-1-metil-benzo[b]xanton-7,10,12-triona (**35**), conocido como bikaverina.

### 5.3 Actividad biológica reportada de los ácidos fusárico (**9**), 9,10-deshidrofusárico (**34**) y bikaverina (**35**)

Los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**), así como la bikaverina (**35**), son metabolitos secundarios bioactivos producidos por *Fusarium* spp. (Niehaus *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 1995; D'Alton & Etherton, 1984). A continuación, se describen las actividades biológicas más importantes, reportadas en la literatura para los metabolitos secundarios aislados y para algunos de sus análogos aislados como productos naturales.

En la **Figura 25** se muestran las estructuras de algunos metabolitos secundarios análogos del ácido fusárico (**9**). Se han aislado los ésteres metílicos de los ácidos fusárico y 9,10-deshidrofusárico (**36** y **37**, respectivamente), el ácido 10,11-dihidroxifusárico (**38**), el diácido del ácido fusárico (**39**), el ácido 10-hidroxi-11-clorofusárico (**40**) y los fusaricatos novedosos A – G (**41** a **48**) (Shuai *et al.*, 2016; Niehaus *et al.*, 2014; Wang & Ng, 1999; Capasso *et al.*, 1996; Abbas *et al.*, 1995; D'Alton & Etherton, 1984). Cabe mencionar, que se ha propuesto la biosíntesis del ácido fusárico (**9**) y se ha reportado su síntesis a partir de 5-bromo-2-iodopiridina (Niehaus *et al.*, 2014; Song & Yee, 2001).

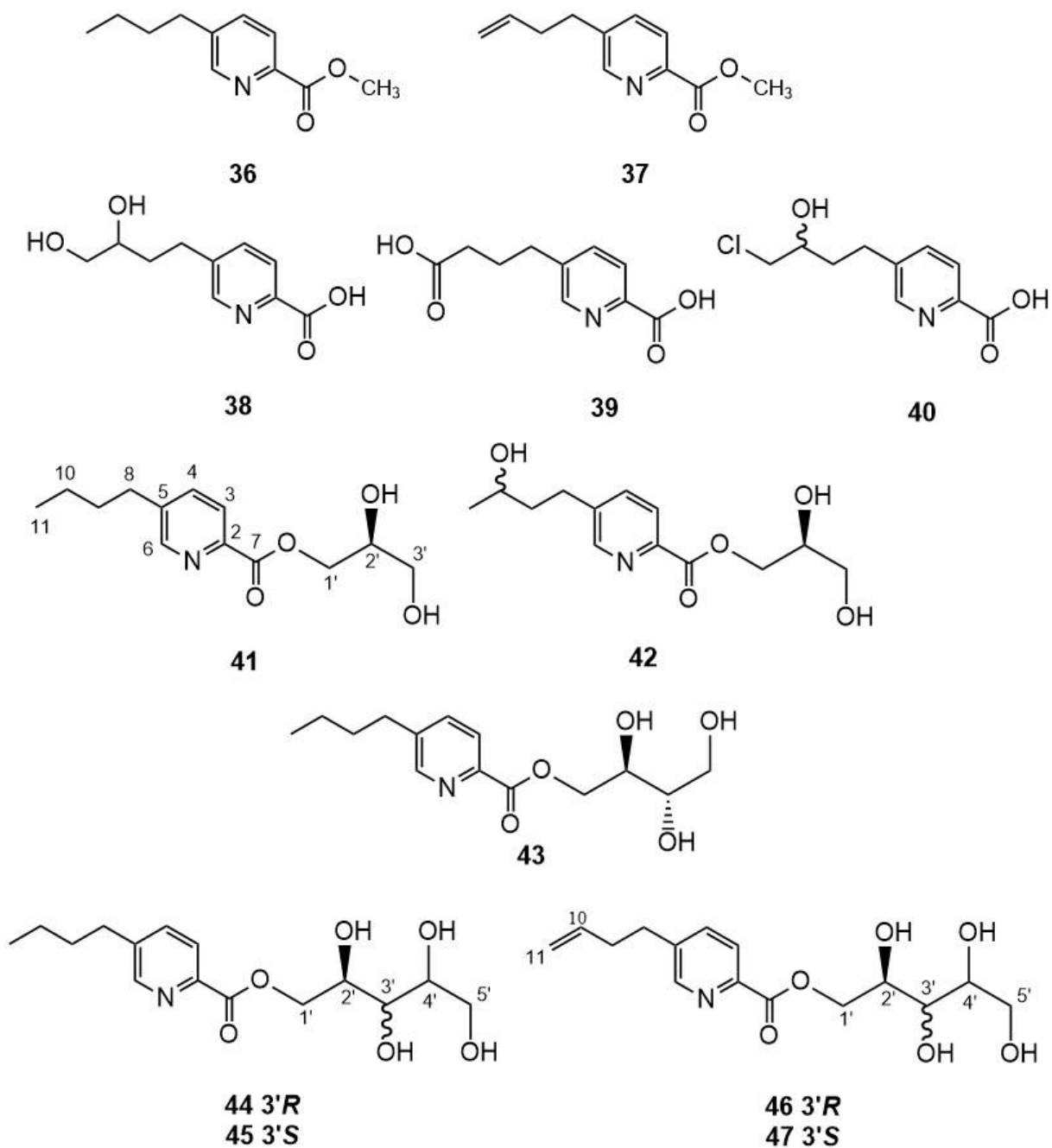
Los análogos de ácido fusárico (**Figura 25**) han demostrado una fuerte actividad fitotóxica *in vitro* e *in vivo* (Liu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 1995; Capasso, 1996). Se ha descrito que el efecto fitotóxico *in vitro* del ácido fusárico (**9**) se debe a la alteración de la permeabilidad celular, a la disminución de los niveles de ATP (D'Alton & Etherton, 1984) y a la inhibición de la respiración (Wang *et al.*, 2013), entre otros.

Con base en los efectos fitotóxicos reportados, el ácido fusárico (**9**), se ha considerado como una de las principales fitotoxinas hospedero no selectivo<sup>8</sup> (no-FHS) de *Fusarium* spp. que podría actuar como un inductor de las respuestas defensa de la planta, al ataque de patógenos (Wang *et al.*, 2013; Selim & El-Gammal, 2015; Cruz-Cruz *et al.*, 2015; Agrios, 2004).

---

<sup>8</sup>no-FHS, fitotoxina hospedero no selectivo o no específico: Las fitotoxinas se definen como metabolitos secundarios de bajo peso molecular (menor de 2000 uma), producidos por microorganismos fitopatógenos, que perturban el crecimiento normal de las plantas superiores causando necrosis, clorosis, marchitamiento o una combinación de estos síntomas en hospederas susceptibles. Las no-FHS no son esenciales para que el patógeno cause enfermedad, sino que contribuyen en el desarrollo y gravedad de la enfermedad. Adicionalmente, las no-FHS pueden ser aisladas a partir de cultivos del microorganismo fitopatógeno (Cruz-Cruz *et al.*, 2015; Agrios,2004).

## Resultados y discusión



**Figura 25.** Análogos del ácido fusárico (**9**) aislados de *Fusarium* spp. Éster metílico del ácido fusárico (**36**), éster metílico del ácido 9,10-deshidrofusárico (**37**), ácido 10,11-dihidroxifusárico (**38**), análogo diácido del ácido fusárico (**39**), ácido 10-hidroxi-11-clorofusárico (**40**), fusicato A (**41**), fusicato B (**42**), fusicato C (**43**), fusicato D (**44**), fusicato E (**45**), fusicato F (**46**) y fusicato G (**47**).

Los estudios de la actividad farmacológica del ácido fusárico (**9**) y derivados del ácido picolínico han demostrado ser potentes inhibidores de la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH)<sup>9</sup> (Wang & Ng, 1999; Medvedeva *et al.*, 1979; Hidaka & Asano, 1976; Hidaka, 1971; Hidaka *et al.*, 1969). Por otro lado, el metabolito secundario **9** ha demostrado poseer actividad antitumoral contra la línea celular de cáncer de laringe HEP-2 (Ghannam *et al.*, 2014). De manera adicional, se ha reportado que los metabolitos **9** y **34** poseen actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Acidovorax kanjaci*, *Burkholderia glumae*, *Pectobacterium carotovora* ssp. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv.<sup>10</sup>*iachrymans*, los hongos *Colletotrichum coccodes* y *Rizoctonia solani* (Li-jian *et al.*, 2010, Son *et al.*, 2008).

Por otro lado, la bikaverina (**35**) se ha aislado del teleomorfo<sup>11</sup> de *F. moniliforme*, *Gibberella fujikuroi* (Balan *et al.*, 1969), es un pigmento rojo insoluble en agua y en la mayoría de disolventes orgánicos. La bikaverina (**35**) posee actividad *in vitro* anti *Leishmania brasiliensis* y el nematodo fitopatógeno *Bursaphelenchus xylophilus* (Known *et al.*, 2007; Balan *et al.*, 1969)

En 1971 Cornforth y colaboradores, reportaron que la bikaverina (**35**) es un factor de vacuolación micelial que induce cambios morfológicos, similares a los que se presentan en senescencia, en diversos tipos de hongos, incluidos *Aspergillus niger* van Tiegh (Cornforth *et al.*, 1971). En 2008, Son y colaboradores, demostraron que el ácido fusárico (**9**) y la bikaverina (**35**) obtenidos de *Fusarium oxysporum* EF119 son activos sobre fitopatógenos microbianos. Ambos metabolitos mostraron una fuerte actividad antioomiceto sobre *Phytophthora infestans*. Cabe mencionar, que se ha patentado un fungicida para tratar infecciones por *P. aphanidermatum* en plantas de tabaco cuyo principio activo es el ácido fusárico (**9**) (Katahira, 1989), y la actividad de la bikaverina (**35**) para prevenir y tratar enfermedades en plantas (Son *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007).

---

<sup>9</sup>La enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH) es una enzima relativamente inespecífica que participa en la biosíntesis de norepinefrina, catalizando la conversión de dopamina en norepinefrina y se encuentra restringida a las células que sintetizan catecolaminas. Se localiza en las vesículas sinápticas, principalmente en las formas unidas a la membrana. Sin embargo, una pequeña cantidad de la enzima es liberada en las terminaciones nerviosas adrenérgicas junto con norepinefrina (Rang *et al.*, 2008).

<sup>10</sup>pv.: abreviación de patovar, es una cepa de bacteria o grupo de cepas con características iguales o similares, que están diferenciadas a nivel infraespecífico de otras razas de la misma especie o subespecie sobre la base de patogenicidad distintiva a uno o más hospedantes en plantas (Agris, 2004).

<sup>11</sup>Teleomorfo: Estado de un hongo en el que se presentan las formas de reproducción asexual y sexual (Leslie *et al.*, 2006).

### **6. Determinación de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) y el mecanismo de acción de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34), del hongo *Fusarium* sp. aislamiento SME13, sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola**

El fraccionamiento químico biodirigido del extracto activo del medio de cultivo del hongo endófito *Fusarium* sp. SME13 cultivado en mediana escala, permitió el aislamiento de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34). Es de especial interés en el presente proyecto de investigación, explorar el modo de acción de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34), compuestos posiblemente responsables de la actividad antifúngica y antioomiceto, observada a nivel de los extractos orgánicos del medio de cultivo, del micelio y fracciones primarias derivadas del extracto del medio de cultivo, sobre los cuatro microorganismos fitopatógenos con impacto negativo en la agricultura. A continuación, y con la finalidad de aportar el mayor conocimiento posible sobre el mecanismo de acción fisiológico de ambos ácidos orgánicos, se evaluó su efecto sobre las características morfológicas macro y microscópicas del micelio de los hongos y oomicetos fitopatógenos de prueba, así como sobre funciones vitales y actividades metabólicas como son la permeabilidad de la membrana celular y la respiración, respectivamente.

Cabe mencionarse que para determinar el mecanismo de acción se utilizaron los fungicidas comerciales Consist Max® y Captán 50® como controles positivos. Consist Max® contiene en su formulación los principios activos tebuconazol y trifloxistrobina. El primero, pertenece al grupo de los triazoles, fungicidas que inhiben la enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa<sup>12</sup>, involucrada en la síntesis del ergosterol<sup>13</sup> e interfieren en la formación de la membrana celular (Kathiravan *et al.*, 2012; Leroux *et al.*, 2007). El segundo, es una estrobilurina sintética que inhibe el complejo III (citocromo bc1) fuera de la quinona (Qo), en la cadena de transporte de electrones de la respiración mitocondrial (Sparks *et al.*, 2017; Kathiravan *et al.*, 2012; Leroux *et al.*, 2007). Por otro lado, captán es un fungicida perteneciente al grupo de las ftalimidias, el cual inhibe el proceso de respiración en múltiples sitios (Sparks *et al.*, 2017; Gordon, 2010; Lukens, 1971).

---

<sup>12</sup>La enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa es una enzima de la familia de los citocromos P450 (Cyp51p) que cataliza la reacción de eliminación del grupo metilo en posición alfa del C-14 en el lanosterol (Leroux *et al.*, 2007).

<sup>13</sup>El ergosterol es uno de los componentes de la membrana citoplasmática de los hongos (Deacon, 2005).



### 6.1. Efecto de la concentración de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre el crecimiento micelial y la morfología macro y microscópica de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola

En primer lugar, se realizaron curvas de concentración vs respuesta sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba en presencia de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34), empleando el método de dilución en agar, realizando paralelamente la observación detallada de las características macroscópicas del micelio superficial de las colonias crecidas en caja de Petri, con ayuda de un microscopio estereoscópico. Además, se realizaron microcultivos en caja de Petri, inoculando a los microorganismos fitopatógenos en segmentos de medio PDA, conteniendo los metabolitos secundarios puros a las mismas concentraciones de prueba que en la curva de concentración vs respuesta.

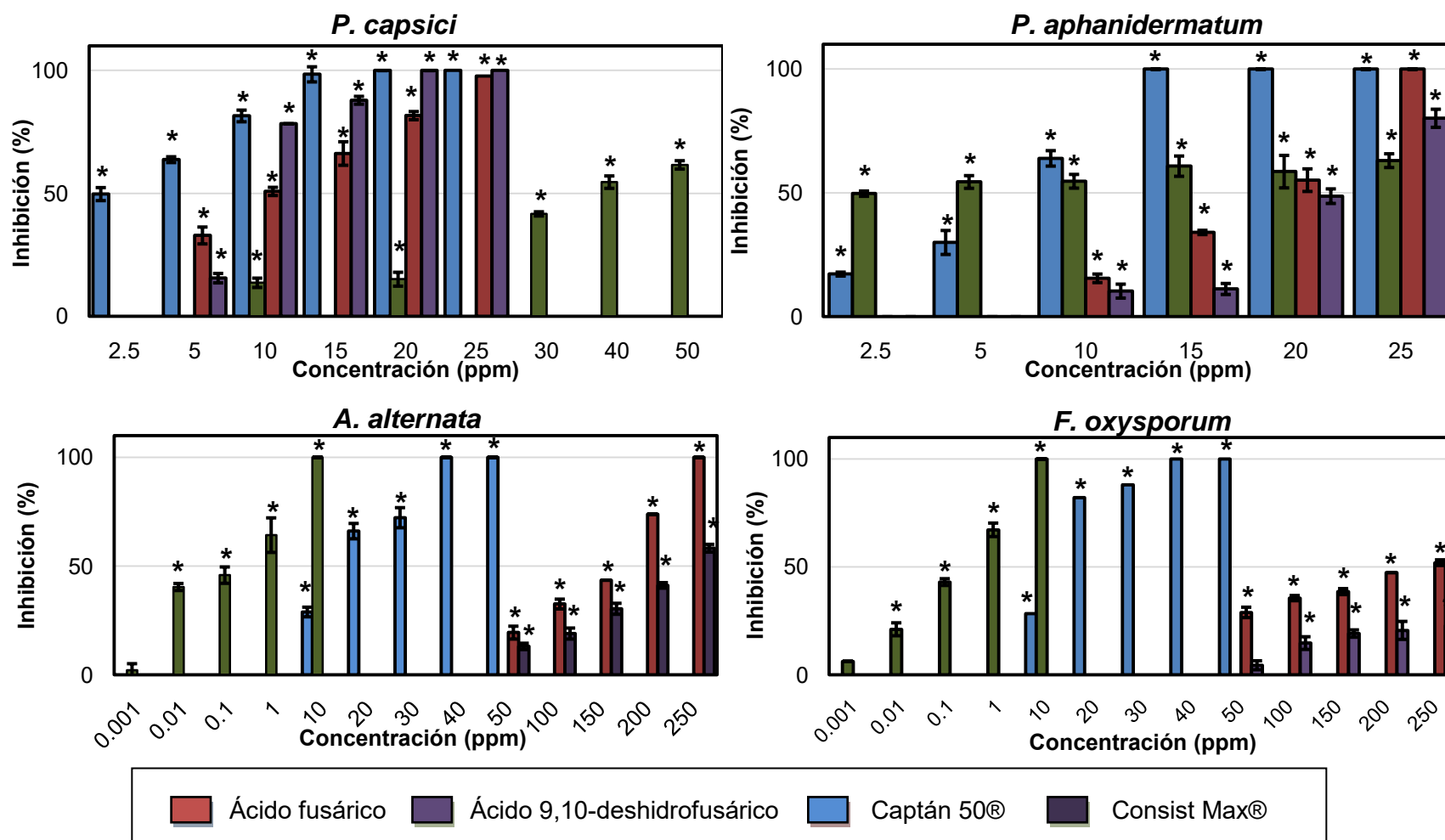
En la **Figura 26** se muestra el efecto de los ácidos 9 y 34, así como el efecto de los agroquímicos Captán 50® y Consist Max® empleados como controles positivos, sobre el crecimiento de los diferentes microorganismos de prueba, empleando como mínimo cinco diferentes concentraciones. En general, en presencia de todos los tratamientos se observó un efecto inhibitorio significativo y dependiente de la concentración. Con excepción del efecto del metabolito 34 sobre el crecimiento del oomiceto *P. capsici*, el ácido fusárico (9) posee mayor potencial antimicrobiano que el compuesto 34. Asimismo, los dos ácidos evaluados muestran un mayor efecto antioomiceto que antifúngico, inhibiendo el crecimiento de *P. capsici* y *P. aphanidermatum* en un 80% o más a la máxima concentración evaluada (25 ppm). El ácido 9 inhibió el crecimiento del hongo verdadero *A. alternata* en un 100% y el ácido 34 en un 82%, a la máxima concentración evaluada (250 ppm). *F. oxysporum* es el hongo menos afectado por los ácidos orgánicos. El compuesto 9 inhibió su crecimiento en un 52% y el compuesto 34 en un 23%, a la máxima concentración ensayada (250 ppm). Es posible que los compuestos 9 y 34, al ser metabolitos secundarios biosintetizados por especies del género *Fusarium*, no desempeñen un efecto tóxico considerable sobre el crecimiento de la especie fitopatógena *F. oxysporum* empleada en los bioensayos (Niehaus *et al.*, 2014).

En los **Cuadros 19** y **20** se presentan los valores de concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) obtenida para cada tratamiento, expresados en ppm y  $\mu M$ , respectivamente. Estos datos

## Resultados y discusión

---

confirman que los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) son más activos sobre el crecimiento de los oomicetos, obteniéndose valores de  $CI_{50}$  en un intervalo de 7.4 - 20.2 ppm (41.8 – 114  $\mu$ M). Cabe destacar que el efecto de ambos metabolitos es comparable con el efecto provocado por el agroquímico comercial Consist Max® (**Cuadro 20**).



**Figura 26.** Efecto antimicrobiano de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, y sobre los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum*. Controles positivos: Captán 50® y Consist Max®. (\*) Resultados estadísticamente significativos (P<0.05, n=4).

## Resultados y discusión

**Cuadro 19.** Concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) en ppm de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia agrícola.

Microorganismo	CI <sub>50</sub> (ppm)			
	Controles positivos		Metabolitos secundarios	
	Consist Max®	Captán 50®	Ácido fusárico ( <b>9</b> )	Ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )
<i>P. capsici</i>	36.3	2.7	8.9	7.4
<i>P. aphanidermatum</i>	2.6	6.2	17.9	20.2
<i>A. alternata</i>	0.1	15.1	116.0	230.9
<i>F. oxysporum</i>	0.2	13.1	230.7	>250

## Resultados y discusión

**Cuadro 20.** Concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) en  $\mu\text{M}$  de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre el crecimiento de cuatro microorganismos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia agrícola.

Microorganismo	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )				
	Controles positivos			Metabolitos secundarios aislados	
	Consist Max®		Captán50®	Ácido fusárico ( <b>9</b> )	Ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )
	Tebuconazol*	Trifloxistrobina*			
<i>P. capsici</i>	58.9	44.4	9.0	49.7	41.8
<i>P. aphanidermatum</i>	4.2	3.2	20.6	99.9	114.0
<i>A. alternata</i>	0.2	0.1	50.2	647.3	1303.0
<i>F. oxysporum</i>	0.3	0.2	43.6	1287.3	>1410.8

\*Valores calculados a partir de la  $CI_{50}$  de la mezcla.

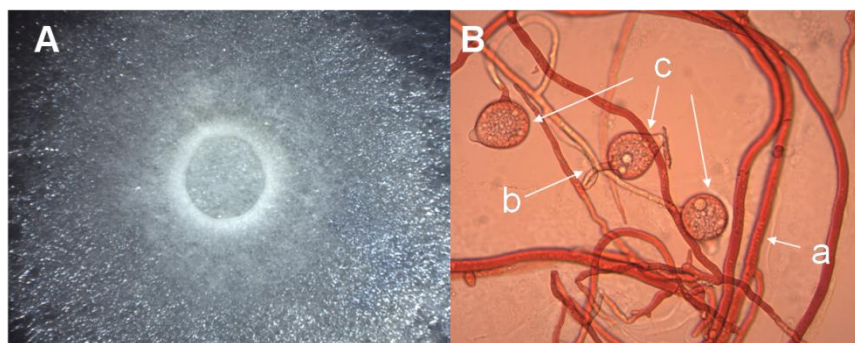
En segundo lugar y, con el objetivo de correlacionar el efecto provocado por los compuestos **9** y **34** sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos, con un posible daño en la morfología de las hifas o daño en las estructuras celulares del micelio, se realizó la observación detallada de las características macro y microscópicas de los micelios de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, en presencia de los diferentes tratamientos. El análisis cualitativo de los cambios en las características macroscópicas se realizó, a través del registro del color, aspecto, consistencia y superficie del micelio aéreo. Con respecto a las características microscópicas, se utilizaron preparaciones en fresco teñidas con los colorantes rojo congo y azul de lactofenol del micelio desarrollado en microcultivos y se registró el tipo de hifas, la presencia y forma de organelos internos, presencia de conidios y de estructuras de reproducción (Mier *et al.*, 2013). A continuación, se presentan los resultados, mostrando y discutiendo en primera instancia las características observadas en los cultivos control de crecimiento en PDA, de cada uno de los microorganismos fitopatógenos de prueba, y comparadas con las características macro y

## Resultados y discusión

microscópicas reportadas en la literatura. Esta información permitió realizar el análisis comparativo con los cultivos en medio PDA en presencia de las diferentes concentraciones de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34).

### 6.1.1. Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre las características macro y microscópicas del micelio de *P. capsici*

En la **Figura 27A** se muestra una fotografía del micelio de un cultivo de 48 h de crecimiento de *P. capsici* en caja de Petri en medio PDA, utilizado como control negativo. Los cultivos de *P. capsici* desarrollaron micelio aéreo de color blanco, de consistencia mullida<sup>14</sup> y aspecto irradiado<sup>15</sup>. En la **Figura 27B** se observa una micrografía del micelio, señalando las estructuras de reproducción producidas por el oomiceto bajo las condiciones de cultivo. Se observan hifas gruesas cenocíticas y esporangióforos que se estrechan ligeramente en la base del esporangio. En general, los esporangios son de forma ovoide. Las características macro y microscópicas presentadas por la cepa fitopatógena de *P. capsici* corresponden a las descritas por Stamps (1984).



**Figura 27.** Fotografía del micelio del cultivo control del oomiceto fitopatógeno *P. capsici* en PDA (A). Preparación en fresco del micelio teñida con rojo congo a 400 aumentos (B). Estructuras asexuales importantes del micelio de *P. capsici*: (a) hifas cenocíticas gruesas, (b) esporangióforo y (c) esporangios maduros de forma ovoides.

<sup>14</sup>Mullido: blando, esponjoso.

<sup>15</sup>Irradiado: que tiene sus diversas partes dispuestas alrededor de un punto o de un eje, como los radios de una circunferencia.

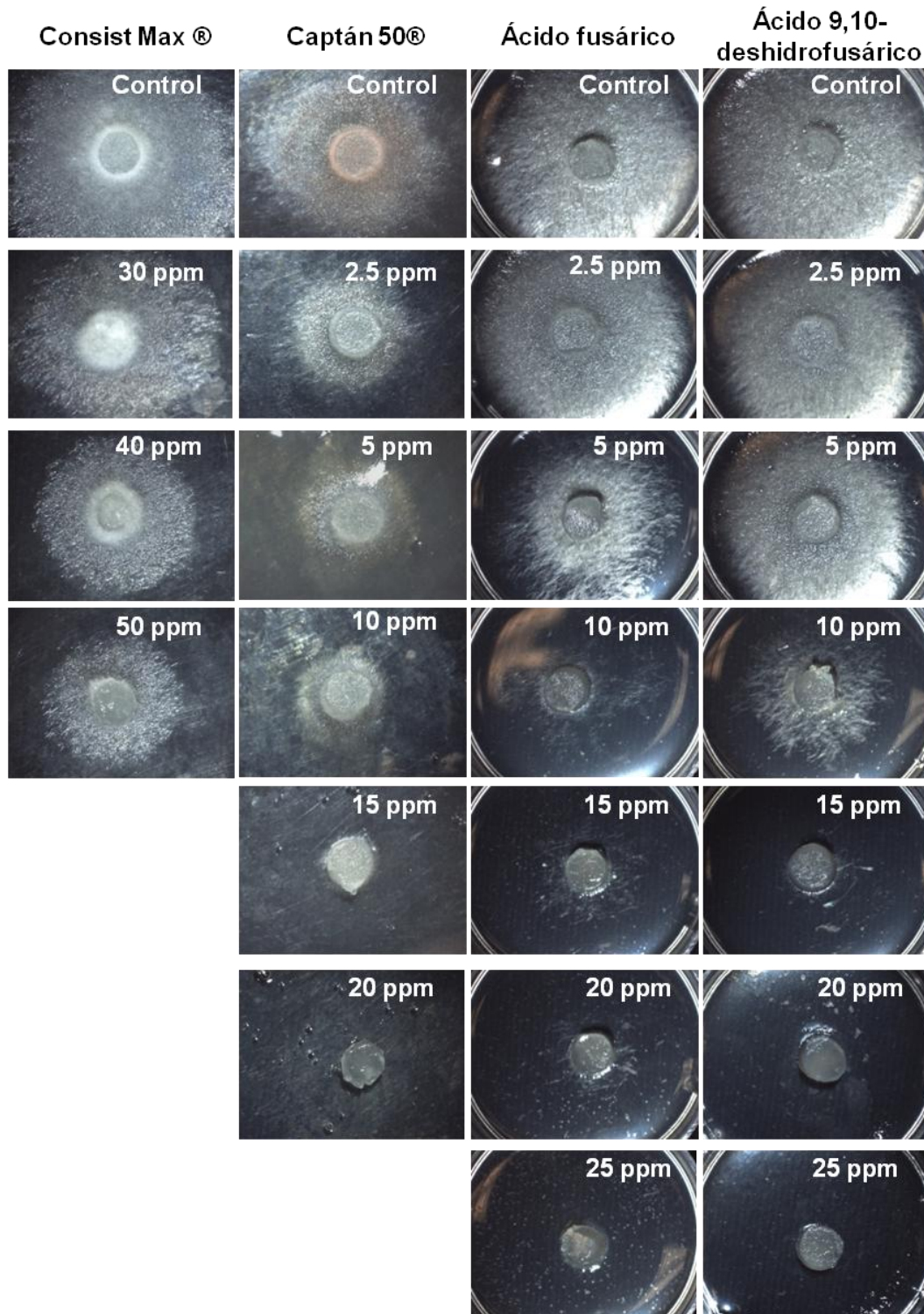
En la **Figura 28** se muestran de forma comparativa fotografías del efecto de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del oomiceto fitopatógeno *P. capsici*, en las curvas concentración vs respuesta. Como se puede apreciar en las imágenes de los cultivos en presencia de los metabolitos secundarios de prueba, el micelio presentó daño desde de la concentración más baja de prueba que fue 5 ppm. A partir de esta concentración las colonias se desarrollaron con micelio de aspecto escaso y dendriforme<sup>16</sup>, diferente al micelio desarrollado en los cultivos sin tratamiento (**Figura 27A**). El mayor daño producido sobre el micelio de *P. capsici* se observó a la máxima concentración evaluada (25 ppm).

Por otra parte, en la **Figura 29** se muestran las fotografías de las preparaciones en fresco a partir de los microcultivos. En las preparaciones obtenidas en presencia del ácido fusárico (**9**) se observó que la ramificación de las hifas disminuyó y no se observaron los esporangióforos característicos de la especie, observados en los microcultivos control. En los microcultivos en presencia del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) se observó un menor daño, es decir, la ramificación de las hifas no disminuyó drásticamente y se observaron los esporangióforos característicos de *P. capsici*. Cabe mencionarse que a partir de la concentración 10 ppm no se observó desarrollo micelial de *P. capsici* en los microcultivos.

---

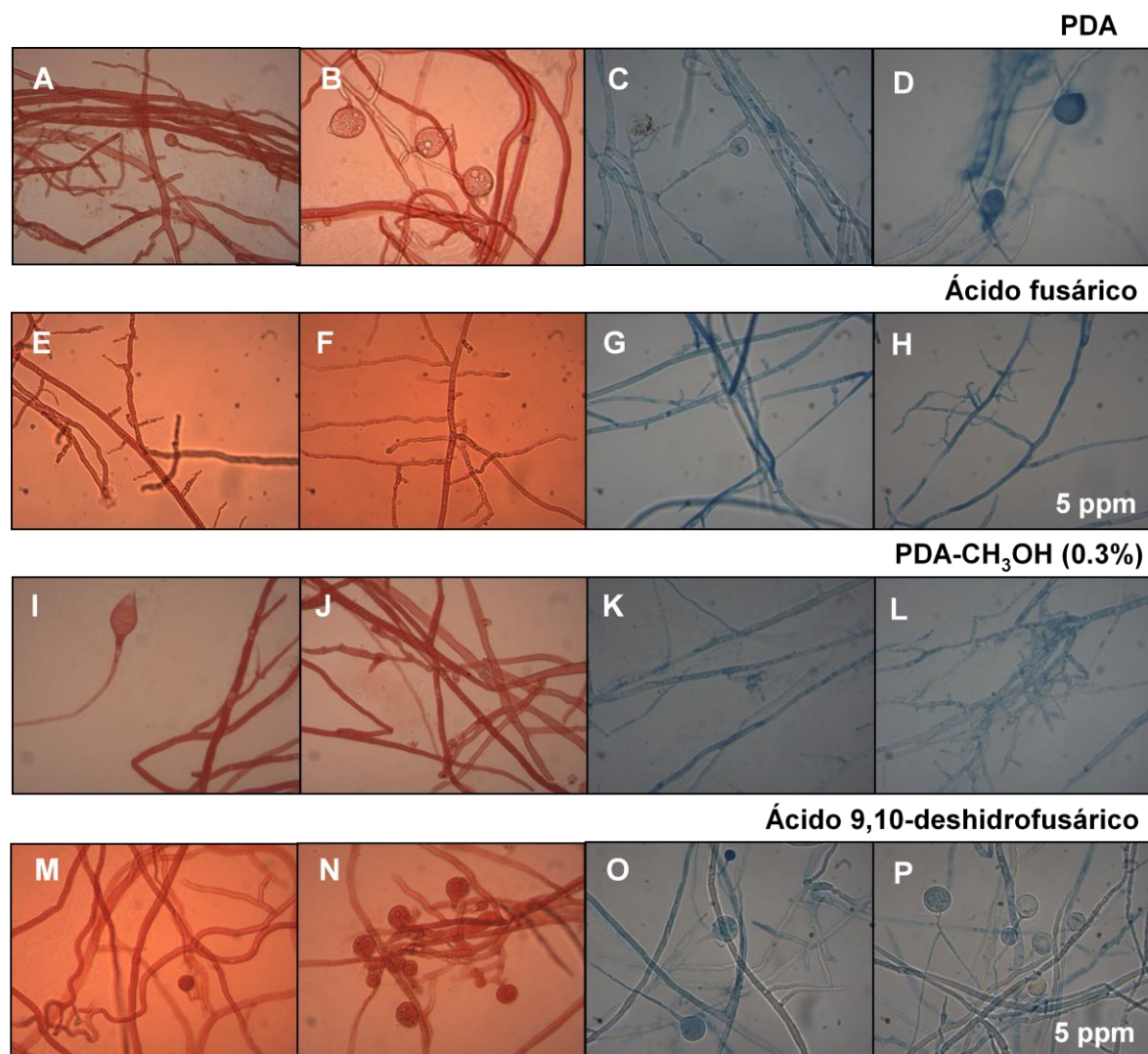
<sup>16</sup> Dendriforme: que tiene la figura de un árbol.

## Resultados y discusión



**Figura 28.** Fotografías del efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34), y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del oomiceto fitopatógeno *P. capsici*, en las curvas concentración vs respuesta.





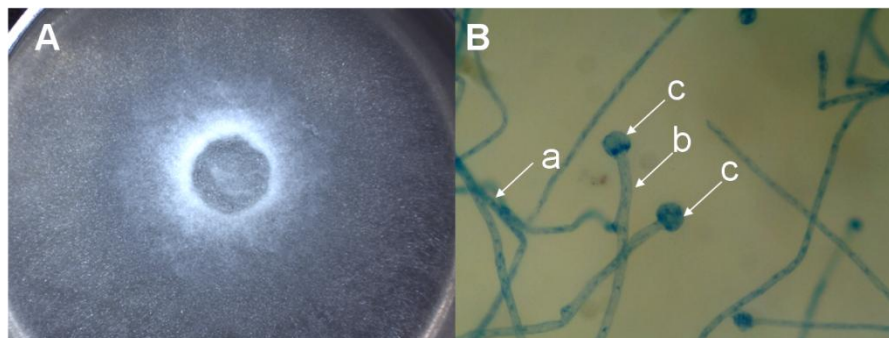
**Figura 29.** Fotografías de las preparaciones en fresco del oomiceto fitopatógeno *P. capsici* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (**A-D**), ácido fusárico (**9**) a 5 ppm (**E-H**), PDA-CH<sub>3</sub>OH al 0.3% (**I-L**), ácido 9,10-deshidrofusárico a 5ppm (**34**) (**M-P**).

### 6.1.2. Efecto de los compuestos **9** y **34** sobre las características macro y microscópicas del micelio de *P. aphanidermatum*

En la **Figura 30A** se muestra una fotografía del micelio de un cultivo de *P. aphanidermatum* de 24 h de crecimiento en caja de Petri en medio PDA, utilizado como control negativo. Los cultivos de *P. aphanidermatum* crecieron rápidamente, llenando la caja de Petri en 24 h y desarrollaron micelio aéreo de color blanco, de aspecto abundante y consistencia lanosa. En

## Resultados y discusión

la **Figura 30B** se observa una micrografía del micelio, señalando las estructuras de reproducción producidas por el oomiceto bajo las condiciones de cultivo. Se observan hifas cenocíticas y esporangios globosos terminales. Las características macro y microscópicas presentadas por la cepa fitopatógena de *P. aphanidermatum* corresponden a las descritas por Laundon & Waterston(1964) y Herrera & Ulloa (1998).

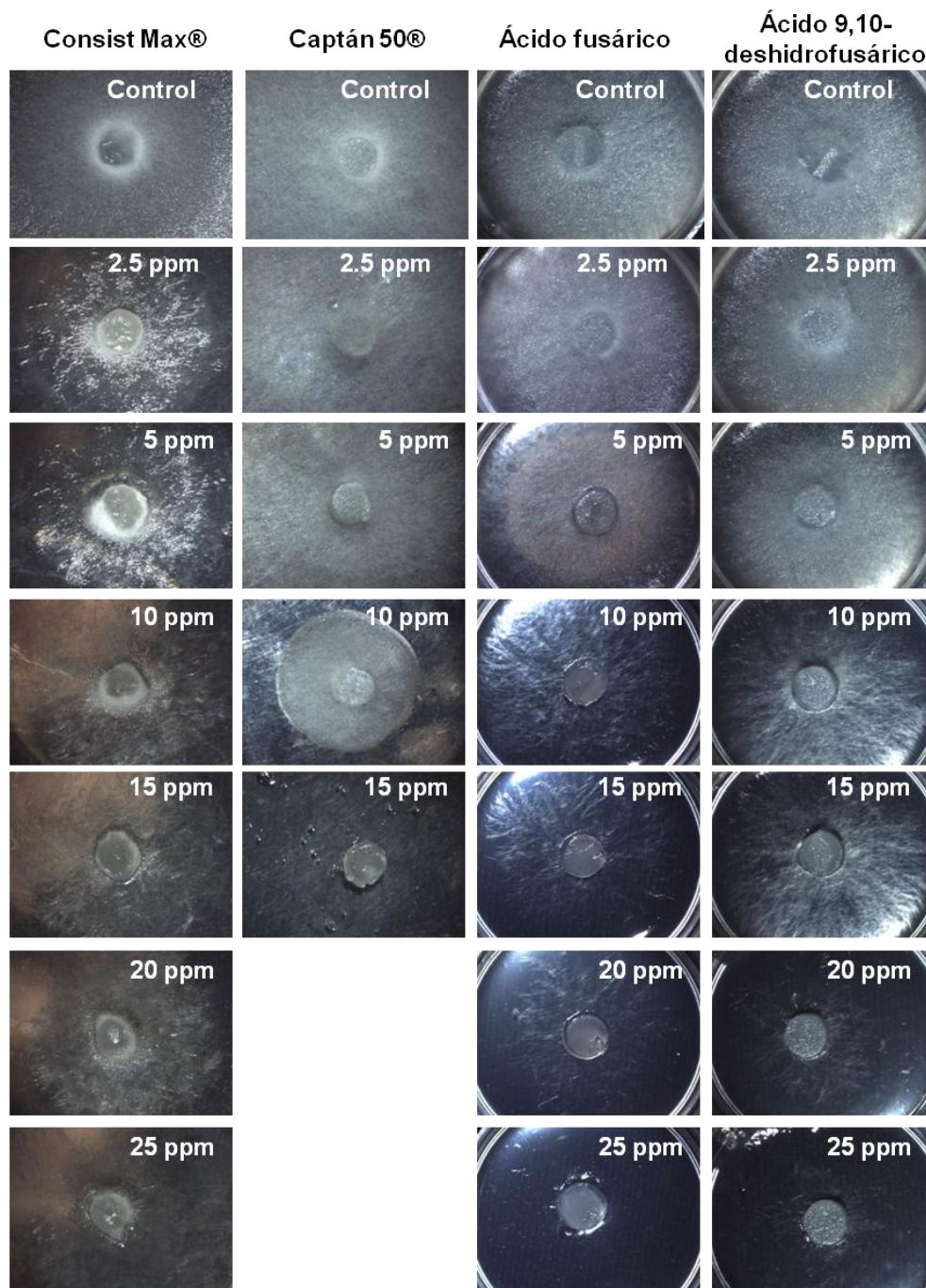


**Figura 30.** Fotografía del micelio del cultivo control del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum* en PDA (A). Preparación en fresco del micelio teñida con azul de lactofenol a 400 aumentos (B). Estructuras asexuales importantes del micelio de *P. aphanidermatum*: (a) hifas cenocíticas, (b) esporangio globoso terminal y (c) vesícula esporangial.

En la **Figura 31** se muestran de forma comparativa fotografías del efecto de los compuestos **9** y **34** y de los controles positivos (Consist Max® y Captán 50®), sobre el crecimiento del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*, en las curvas concentración vs respuesta. Como se puede apreciar, en presencia de los ácidos **9** y **34**, a partir de la concentración de 10 ppm, el micelio presentó daño, las colonias se desarrollaron con micelio escaso y aspecto dendriforme, efecto similar al generado por estos metabolitos sobre el micelio de *P. capsici*. El mayor deterioro sobre el micelio de *P. aphanidermatum* se observó a la máxima concentración evaluada (25 ppm).

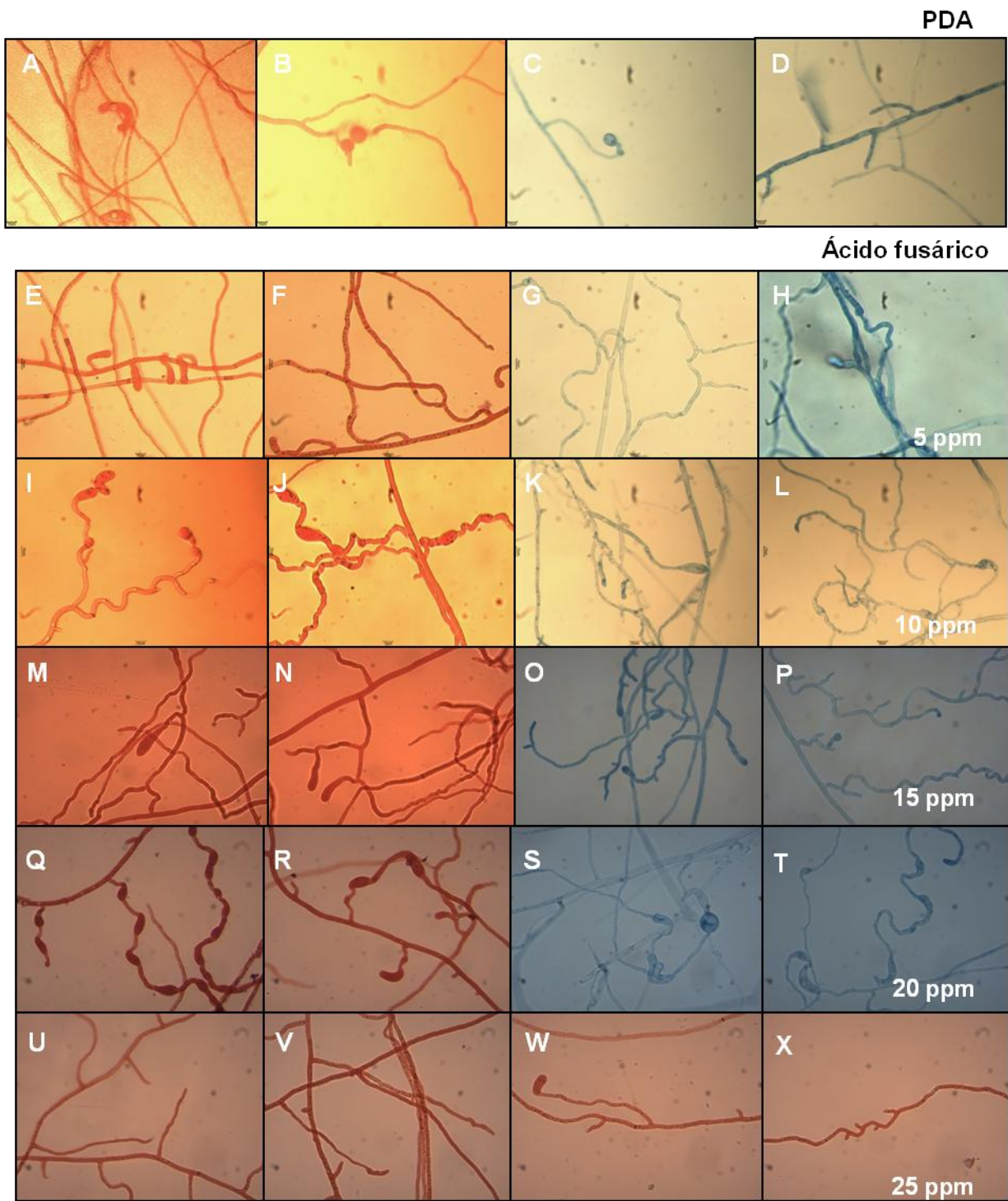
Por otra parte, en la **Figura 32** se muestran las fotografías de las preparaciones en fresco a partir de los microcultivos en presencia del ácido fusárico (**9**) y en la **Figura 33**, en presencia del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**). En las preparaciones obtenidas en presencia del compuesto **9**, se observó que a partir de la concentración de 10 ppm las hifas se extendieron de forma de zigzag y aparecieron nodulaciones intermedias en las hifas y esporangióforos

inmaduros (**Figura 34**). En los microcultivos en presencia del ácido **34** se observó un menor daño, es decir, la ramificación de las hifas no disminuyó drásticamente. Sin embargo, se observó una mayor cantidad de esporangióforos (**Figura 34**).

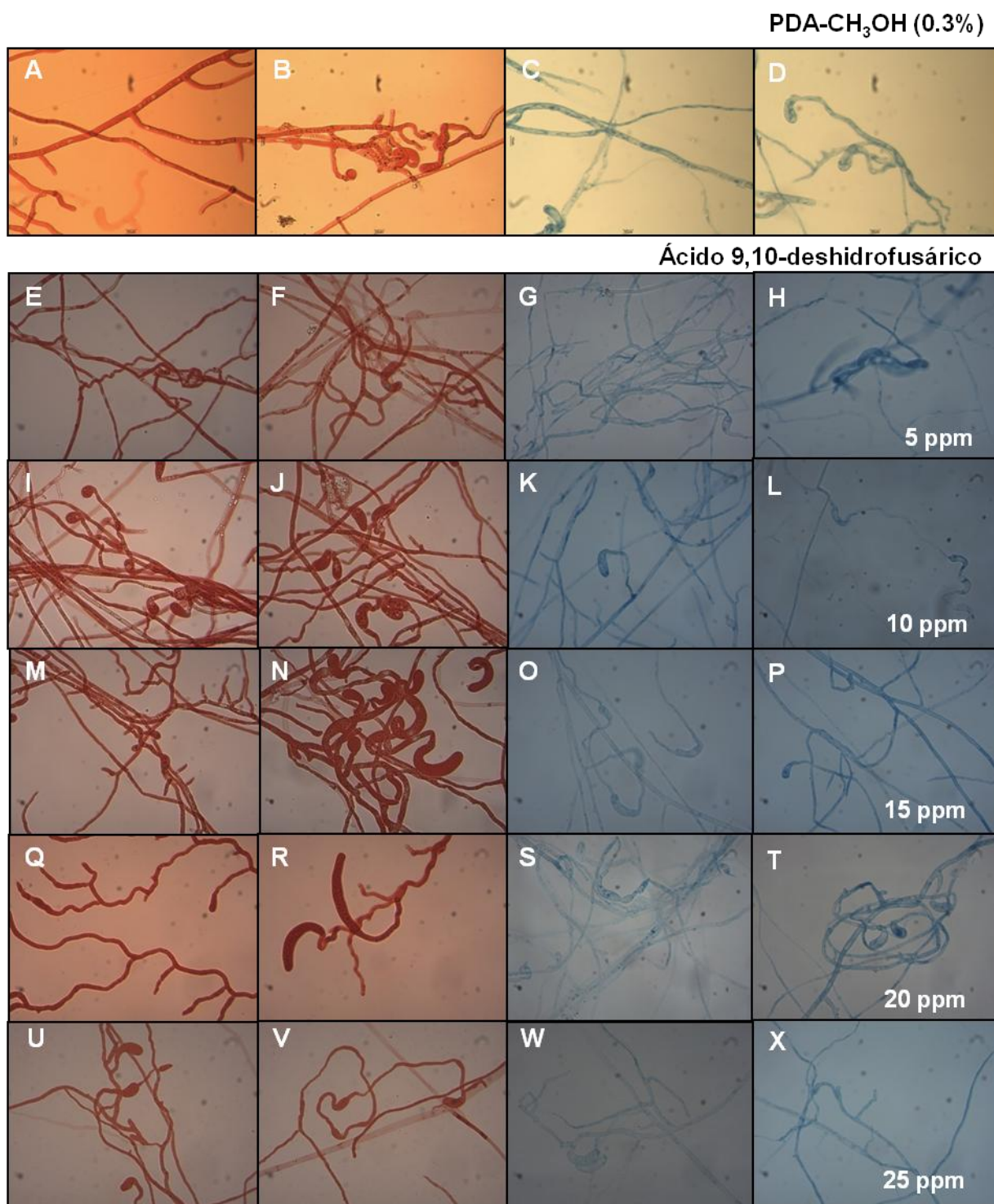


**Figura 31.** Fotografías del efecto de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*, en las curvas concentración vs respuesta.

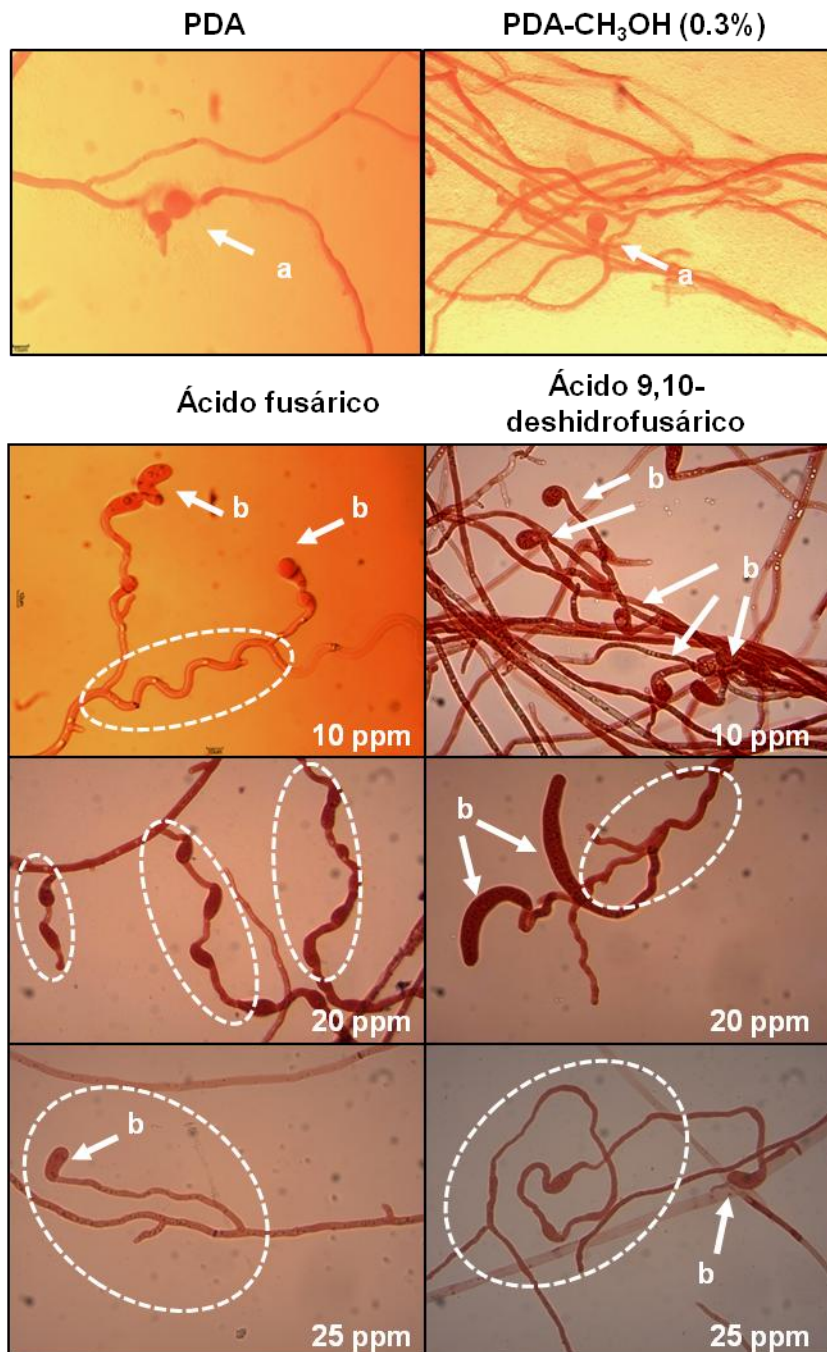
## Resultados y discusión



**Figura 32.** Fotografías de las preparaciones en fresco del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones de ácido fusárico (9). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido fusárico (9) a 5 (E-H), 10 (I-L), 15 (M-P), 20 (Q-T) y 25 ppm (U-X).



**Figura 33.** Fotografías de las preparaciones en fresco del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (**A-D**), ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) a 5 (**E-H**), 10 (**I-L**), 15 (**M-P**), 20 (**Q-T**) y 25 ppm (**U-X**).



**Figura 34.** Fotografías de las preparaciones en fresco del micelio de *P. aphanidermatum* teñidas con rojo congo a 40x obtenidas a partir de los cultivos control y en presencia del ácido fusárico (9) y del ácido 9,10-deshidrofusárico (34), ambos a 10, 20 y 25 ppm. Las regiones dañadas de las hifas están rodeadas con líneas discontinuas. (a) Esporangios maduros, (b) esporangios inmaduros.

Las observaciones macro y microscópicas realizadas, permitieron evidenciar que los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) disminuyen el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos de prueba con importancia agrícola. Asimismo, ambos compuestos alteran la morfología normal de las hifas y disminuyen la formación de esporangióforos, lo que conlleva a la disminución de la producción de estructuras de dispersión (Judelson & Blanco, 2005; Islam *et al.*, 2011; Deacon, 2006; Herrera & Ulloa, 1998). Este efecto correlaciona directamente con el deterioro de las hifas del micelio de *P. capsici* y *P. aphanidermatum* registrado en los bioensayos en caja de Petri en presencia de los ácidos **9** y **34**.

### 6.1.3. Efecto de los compuestos **9** y **34** sobre las características macro y microscópicas del micelio de *A. alternata*

El análisis cualitativo de los cambios en las características macroscópicas se realizó a través del registro del color, aspecto, consistencia y superficie del micelio aéreo.

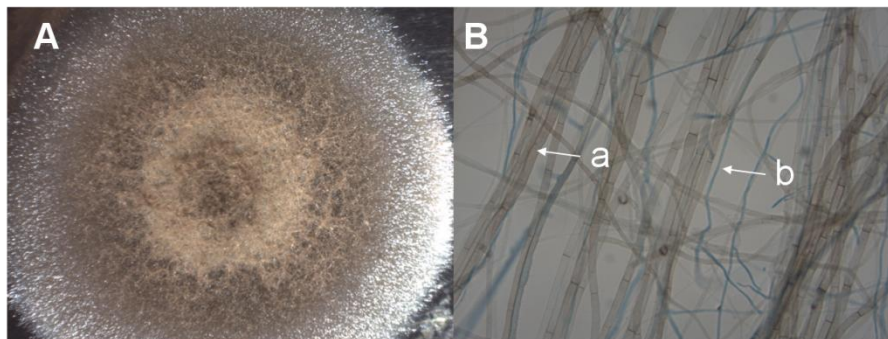
En la **Figura 35A** se muestra una fotografía del micelio de un cultivo de 48 h de crecimiento del hongo *A. alternata* en caja de Petri en medio PDA, utilizado como control negativo. Los cultivos de *A. alternata* desarrollaron micelio aéreo color café, de aspecto lanoso y consistencia rígida. En la **Figura 35B** se observa una micrografía del micelio, señalando el tipo de hifas producidas por el hongo bajo las condiciones de cultivo utilizadas. Se observan en mayor proporción hifas gruesas septadas dematiaceas<sup>17</sup> y en menor proporción hifas delgadas jóvenes no pigmentadas. Las características macro y microscópicas presentadas por la cepa fitopatógena de *A. alternata* corresponden a las descritas por Rakotonirainy (2017), Pitt & Hocking (2009) y Herrera & Ulloa (1998).

---

<sup>17</sup> Hifas dematiaceas: hifas que presentan pigmento pardusco o negro (Romero-Cabello, 2007).

## Resultados y discusión

---

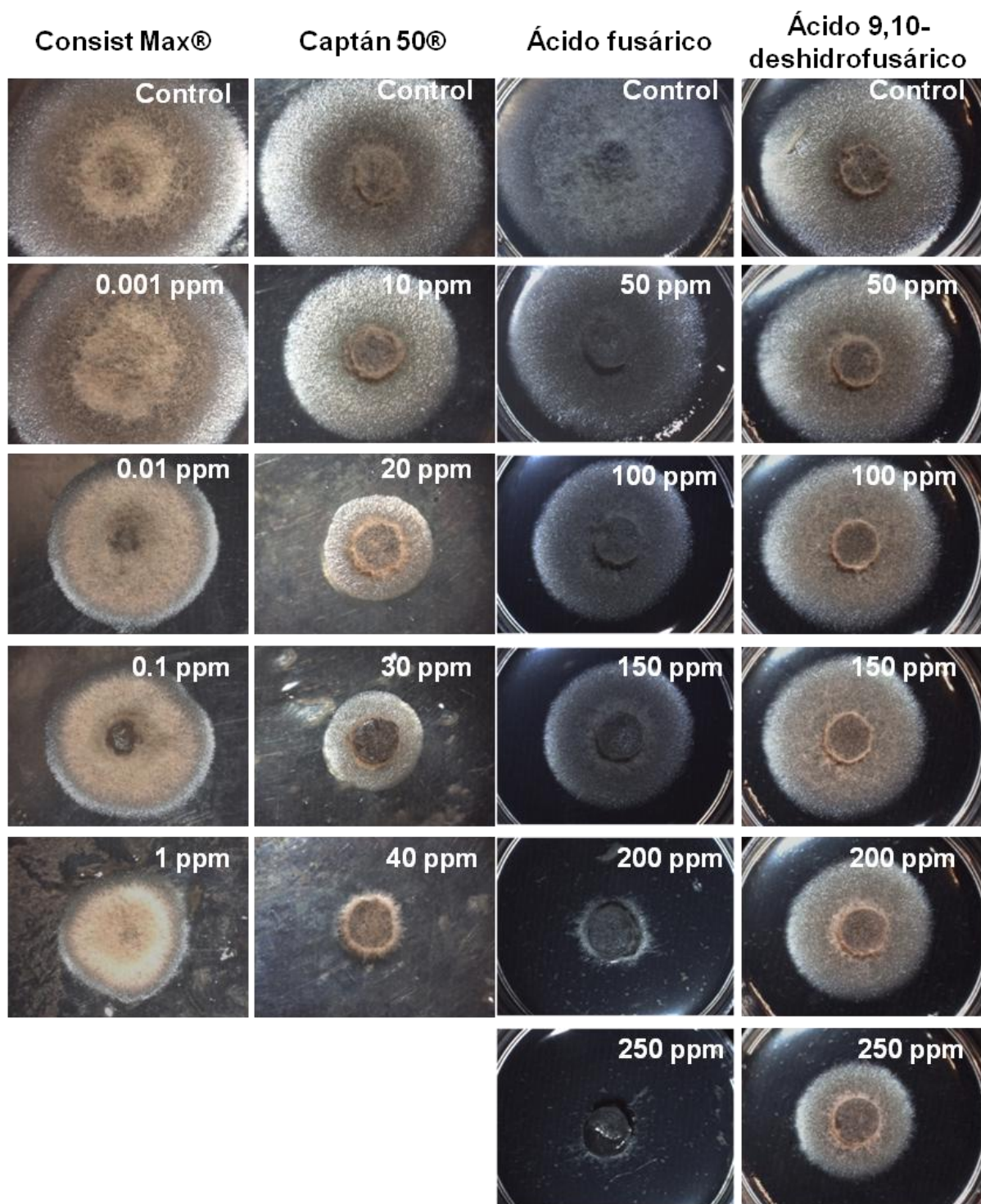


**Figura 35.** Fotografía del micelio del cultivo control del hongo fitopatógeno *A. alternata* (**A**). Preparación en fresco del micelio teñida con azul de lactofenol a 400 aumentos (**B**). Tipos de hifas presentes en *A. alternata*: (a) hifas dematiáceas septadas, (b) hifas jóvenes no pigmentadas.

En la **Figura 36** se muestran fotografías comparativas del efecto de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) y de los controles positivos (Consist Max® y Captán 50®), sobre el crecimiento de *A. alternata*, en las curvas concentración vs respuesta. En los cultivos en presencia de los metabolitos secundarios de prueba, la densidad del micelio disminuyó de forma dependiente de la concentración. El compuesto **9** a la concentración de 250 ppm inhibió completamente el crecimiento de *A. alternata*.

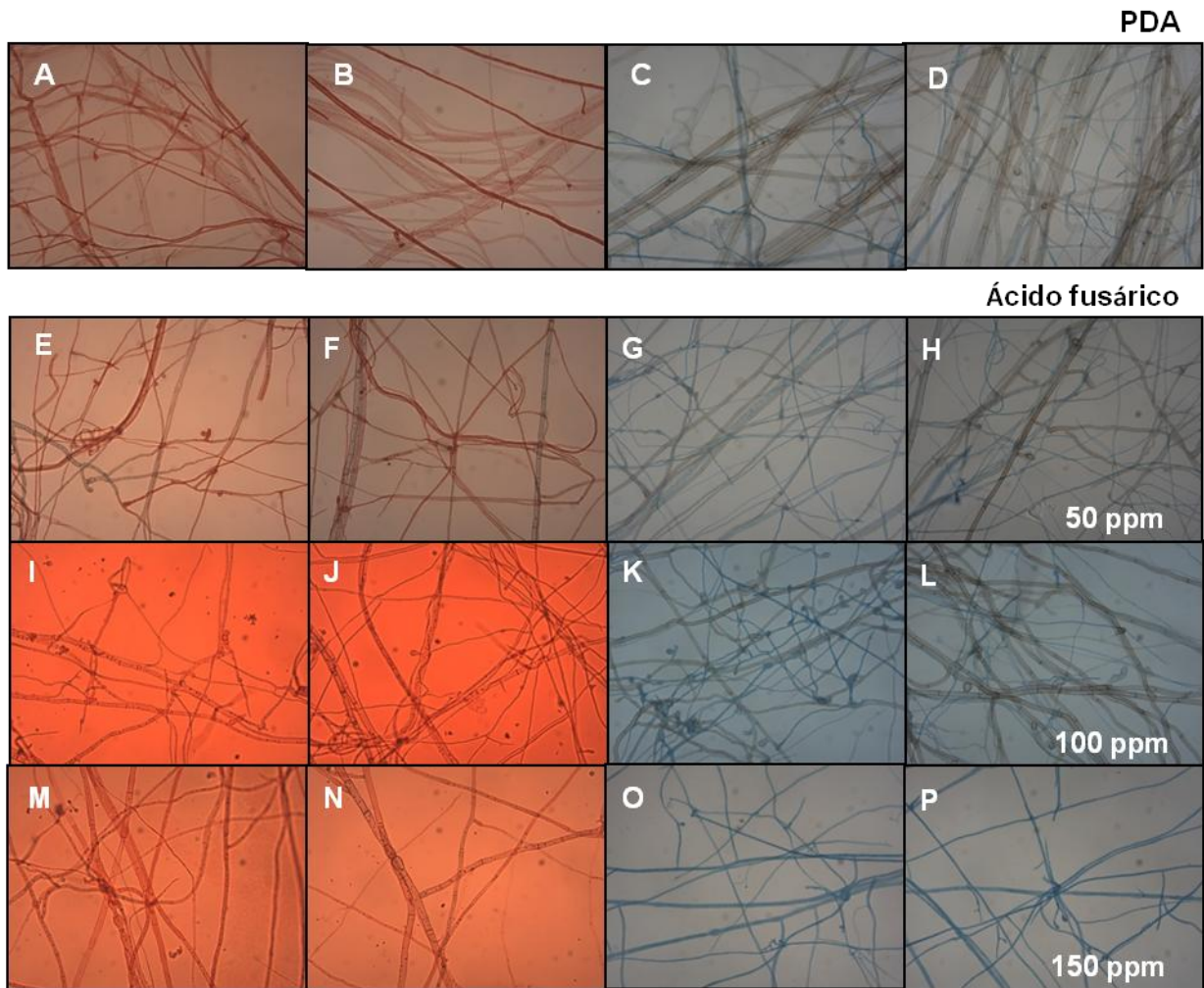
Por otra parte, en las **Figuras 37** y **38** se muestran las fotografías de las preparaciones en fresco a partir de los microcultivos, respectivamente. En las preparaciones obtenidas en presencia de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) se observó una disminución de la densidad del micelio, una menor proporción de hifas maduras dematiáceas y una mayor proporción de hifas jóvenes teñidas con los colorantes utilizados. Cabe mencionarse que en los microcultivos en presencia del compuesto **9**, a partir de la concentración de 200 ppm, no se observó desarrollo miceliar de *A. alternata*. Por otro lado, a la máxima concentración evaluada del compuesto **34** (250 ppm) no se observaron hifas dematiáceas (**Figura 36**).



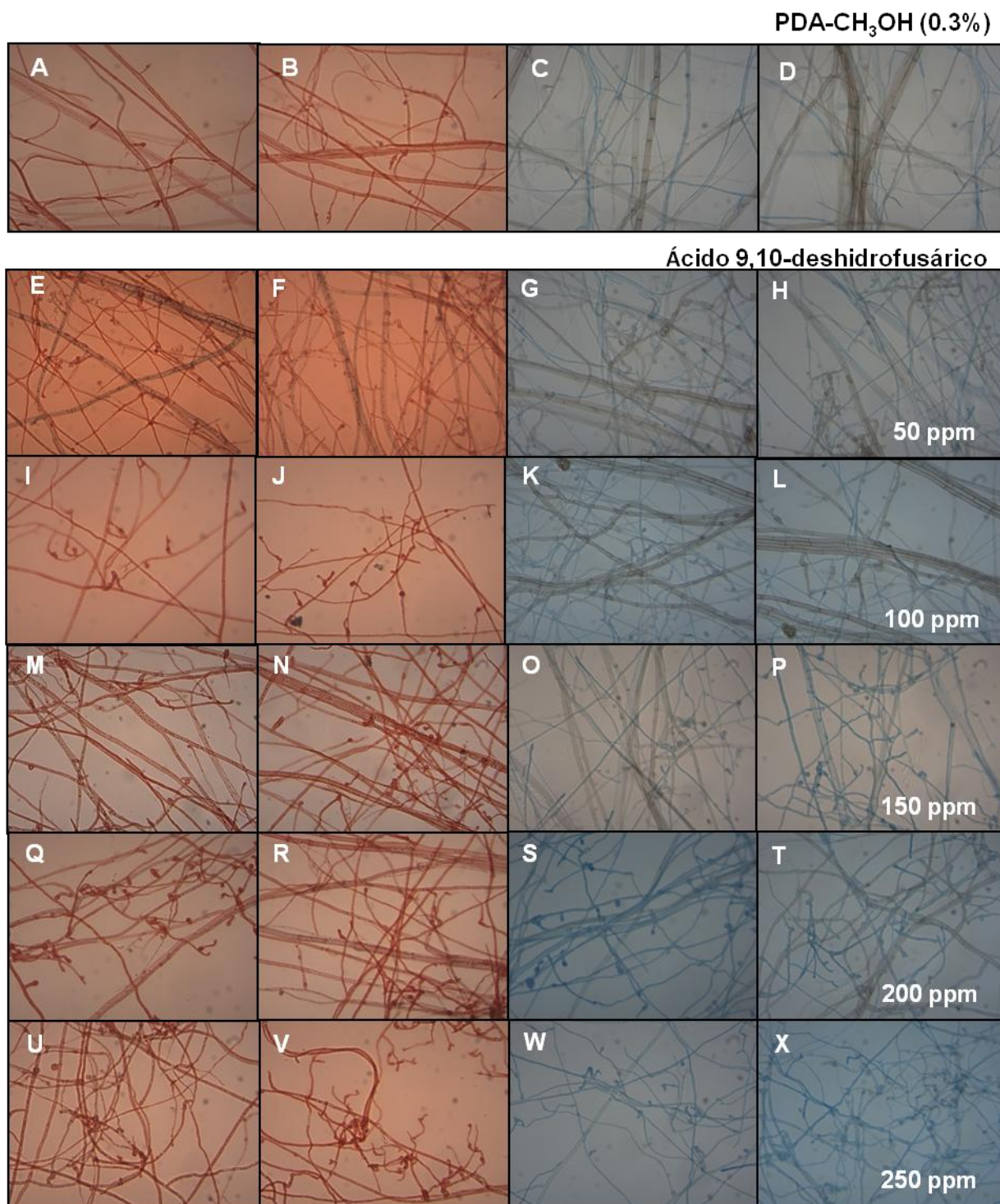


**Figura 36.** Fotografías del efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *A. alternata*, en las curvas concentración vs respuesta.

## Resultados y discusión

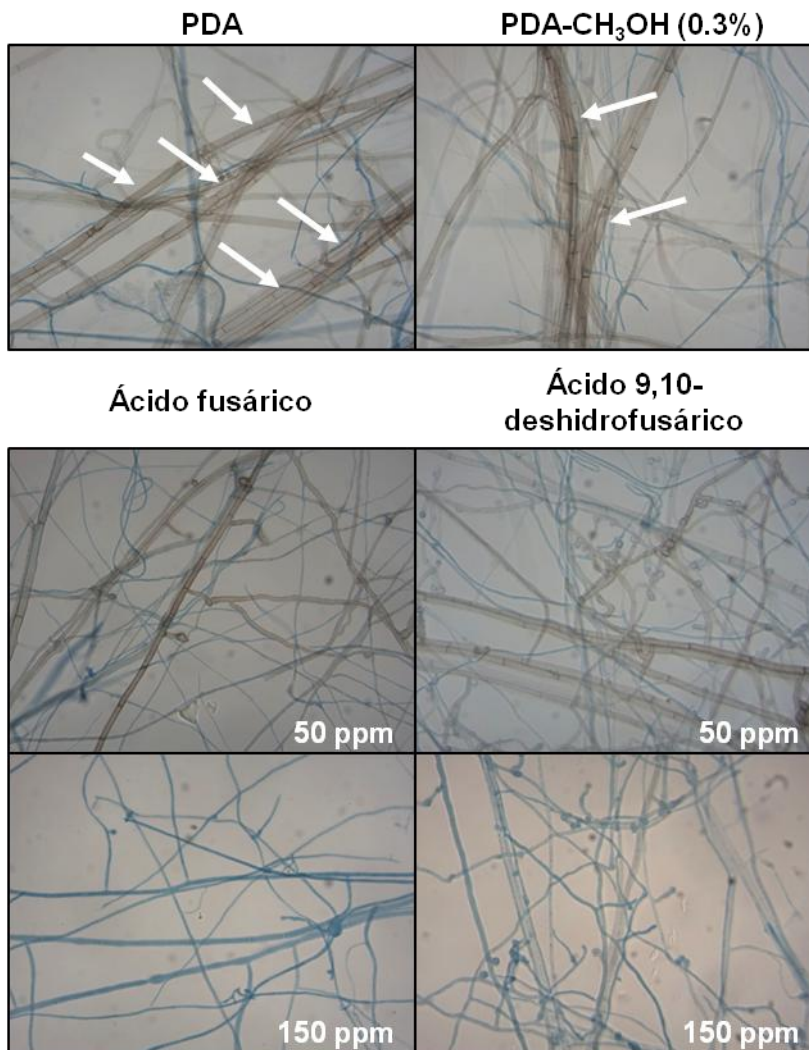


**Figura 37.** Fotografías de las preparaciones en fresco del hongo fitopatógeno *A. alternata* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido fusárico (9). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido fusárico (9) a 50 (E-H), 100 (I-L) y 150 ppm (M-P).



**Figura 38.** Fotografías de las preparaciones en fresco del hongo fitopatógeno *A. alternata* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (**A-D**), ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) a 50 (**E-H**), 100 (**I-L**), 150 (**M-P**), 200 (**Q-T**) y 250 ppm (**U-X**).

## Resultados y discusión



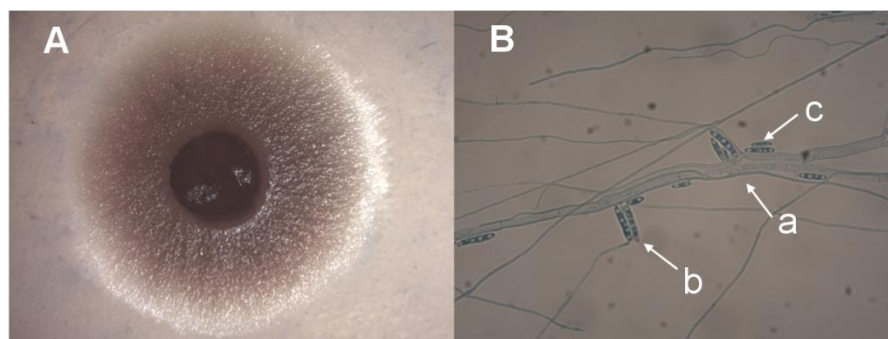
**Figura 39.** Preparaciones en fresco del micelio de *A. alternata* teñidas con azul de lactofenol a 40x obtenidas a partir de los cultivos control y en presencia de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) a 50 y 150 ppm.

Los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) evaluados en un intervalo de concentraciones de 50 a 250 ppm disminuyen la cantidad de hifas dematiáceas del micelio del hongo fitopatógeno *A. alternata*. En este sentido, las melaninas son pigmentos hidrofóbicos de alto peso molecular responsables del color oscuro característico de las hifas de *A. alternata*, y están involucradas en la protección contra muchos factores de estrés físicos y químicos, como la protección contra la radiación UV y los choques osmóticos (Corderov & Casadevall, 2017; Fujii *et al.*, 2002). Aunado a esto, la ausencia de melaninas

en hongos fitopatógenos a menudo conduce a una disminución de su virulencia (Langfelder *et al.*, 2003), es decir, la disminución de su capacidad de infección en las plantas hospederas. Por consiguiente, los compuestos **9** y **34** podrían estar involucrados en la disminución de la producción de melaninas en *A. alternata*, lo que podría generar como consecuencia, la disminución de su crecimiento y en alguna medida, de su virulencia.

### 6.1.4. Efecto de los compuestos **9** y **34** sobre las características macro y microscópicas del micelio de *F. oxysporum*

En la **Figura 40A** se muestra una fotografía del micelio de un cultivo de 48 h de crecimiento del hongo *F. oxysporum* en caja de Petri en medio PDA, utilizado como control negativo. Los cultivos de *F. oxysporum* desarrollaron micelio aéreo plano, de color morado y consistencia húmeda con zonas lanosas. En la **Figura 37B** se observa una micrografía del micelio, señalando las estructuras de reproducción producidas por el hongo bajo las condiciones de cultivo. Se observan hifas delgadas septadas y la presencia de micro y macroconidios. Las características macro y microscópicas presentadas por la cepa fitopatógena de *F. oxysporum* corresponden a las descritas por Pitt & Hocking (2009).



**Figura 40.** Fotografía del micelio del cultivo control del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (**A**). Preparación en fresco del micelio teñida con azul de lactofenol a 40x (**B**). Estructuras asexuales importantes del micelio de *F. oxysporum*: (**a**) hifas delgadas y septadas, (**b**) macroconidios y (**c**) microconidios.

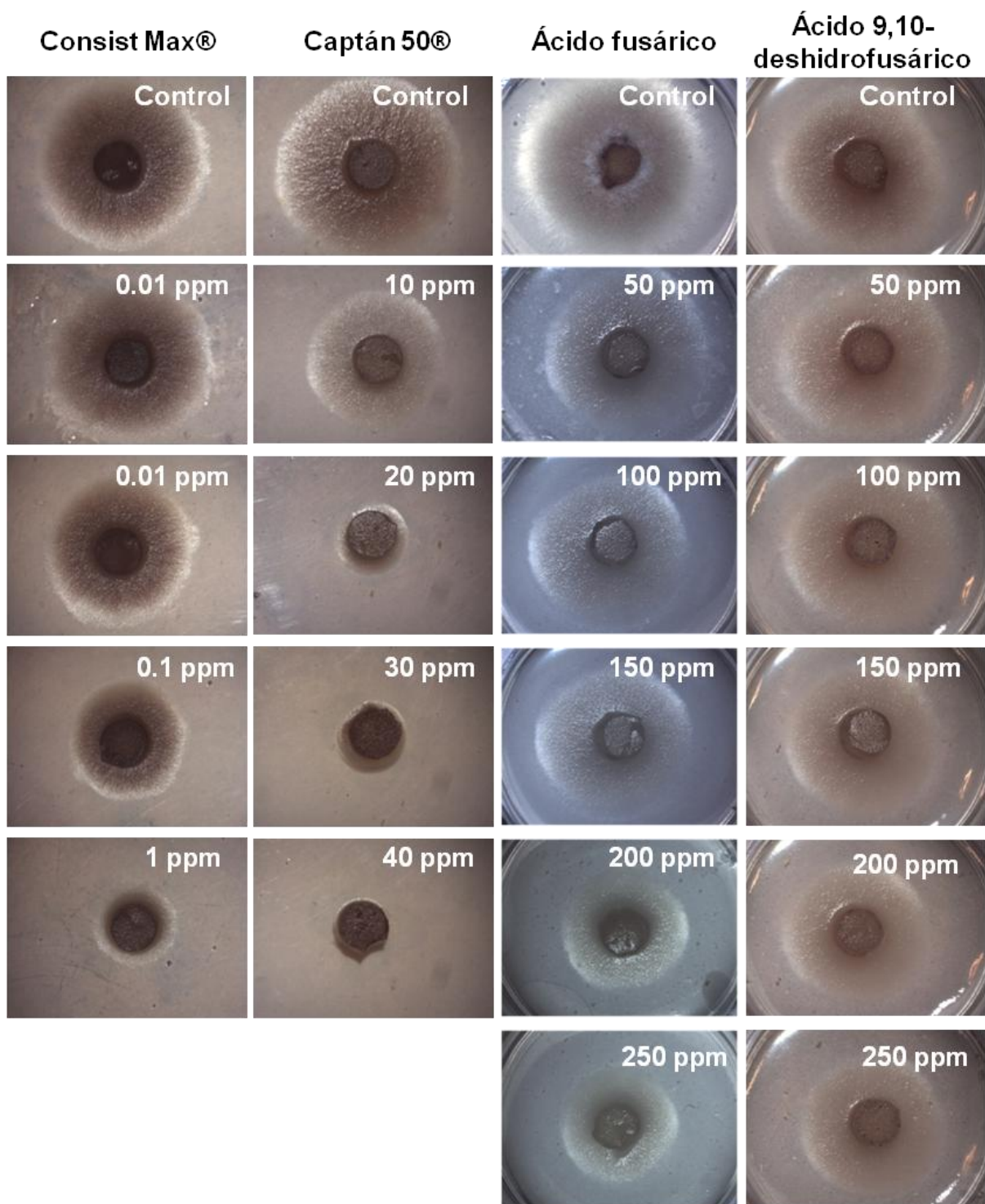
En la **Figura 41** se muestran de forma comparativa fotografías del efecto de los ácidos **9** y **34** y de los controles positivos (Consist Max® y Captán 50®), sobre el crecimiento del hongo

## Resultados y discusión

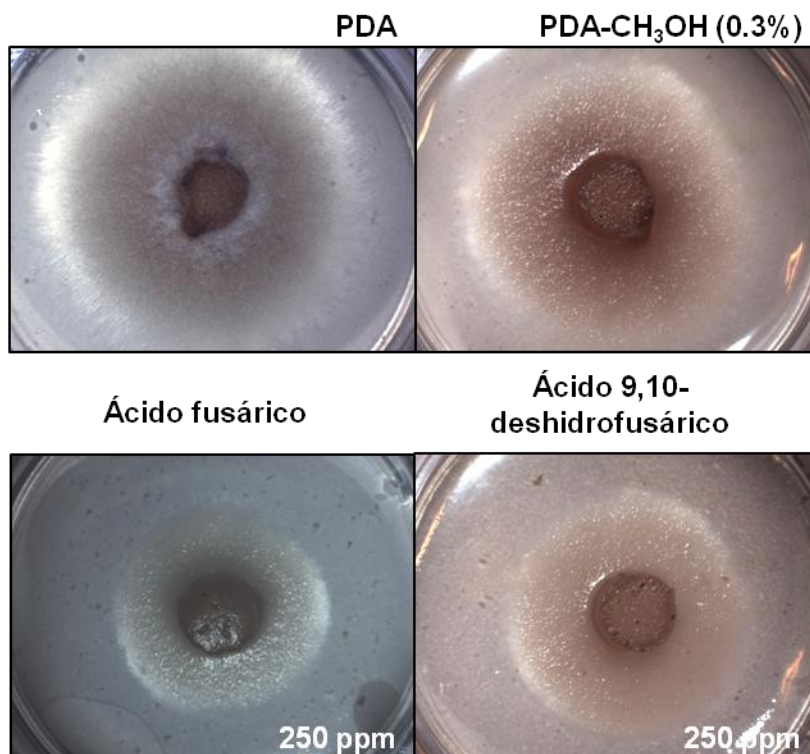
---

fitopatógeno *F. oxysporum*, en las curvas concentración vs respuesta. En presencia de los compuestos evaluados, el micelio no fue inhibido considerablemente con respecto a la concentración de los metabolitos secundarios. Sin embargo, el aumento de la concentración del ácido fusárico (**9**) provocó una disminución en la producción del pigmento morado característico de *F. oxysporum* observado en el control negativo (**Figura 42**).

Por otra parte, en las **Figuras 43** y **44** se muestran las fotografías de las preparaciones en fresco a partir de los microcultivos. En las preparaciones obtenidas en presencia de los ácidos **9** (**Figura 43**) y **34** (**Figura 44**) no se observaron cambios en la morfología de las hifas. Sin embargo, en los microcultivos de ambos compuestos a las concentraciones de 200 y 250ppm, se observó una menor densidad del micelio y un mayor número de fiálides con conidios primarios en los extremos de las hifas (**Figura 45**).

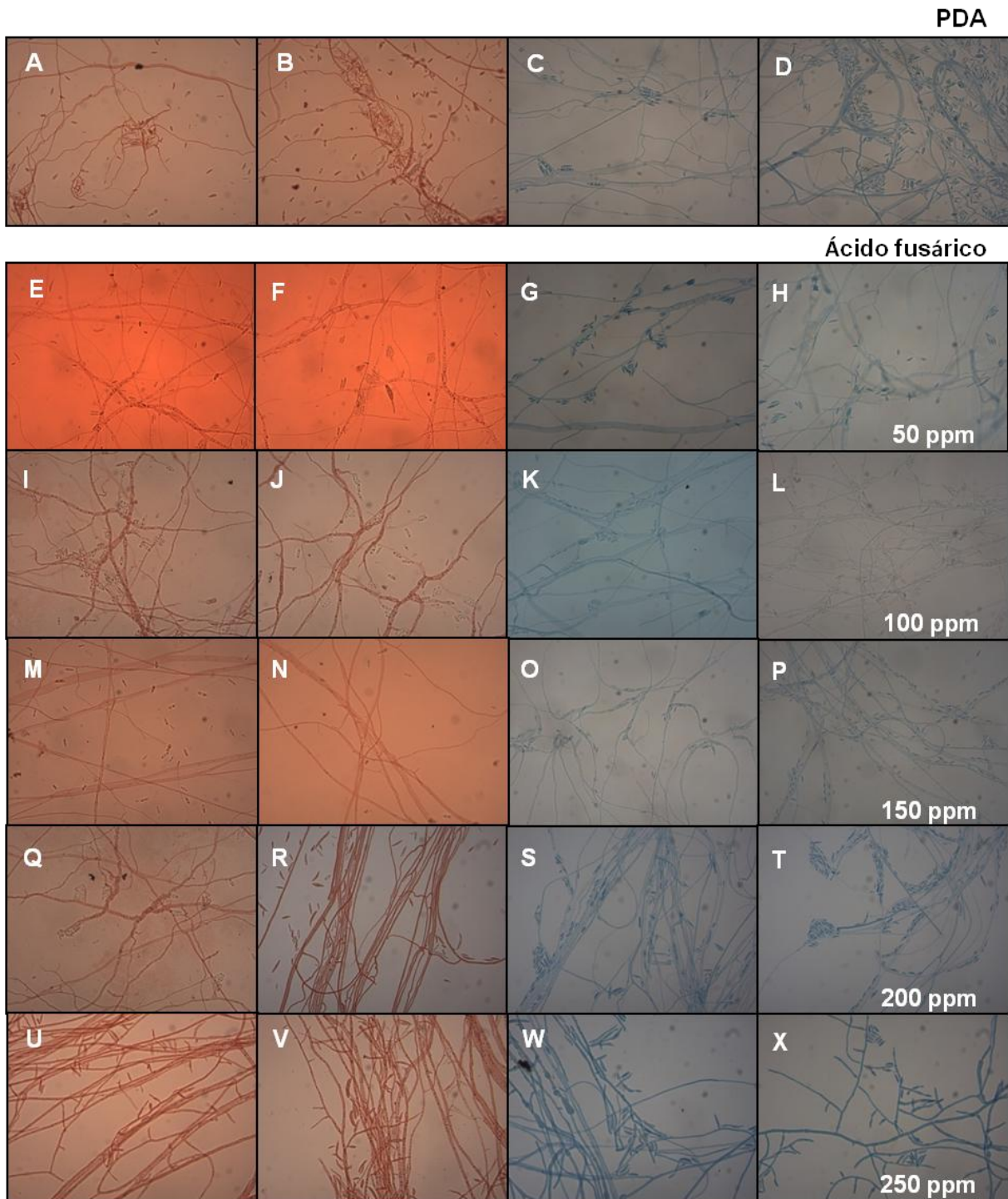


**Figura 41.** Fotografías del efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34), y de los controles positivos Consist Max® y Captán 50®, sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, en las curvas concentración vs respuesta.



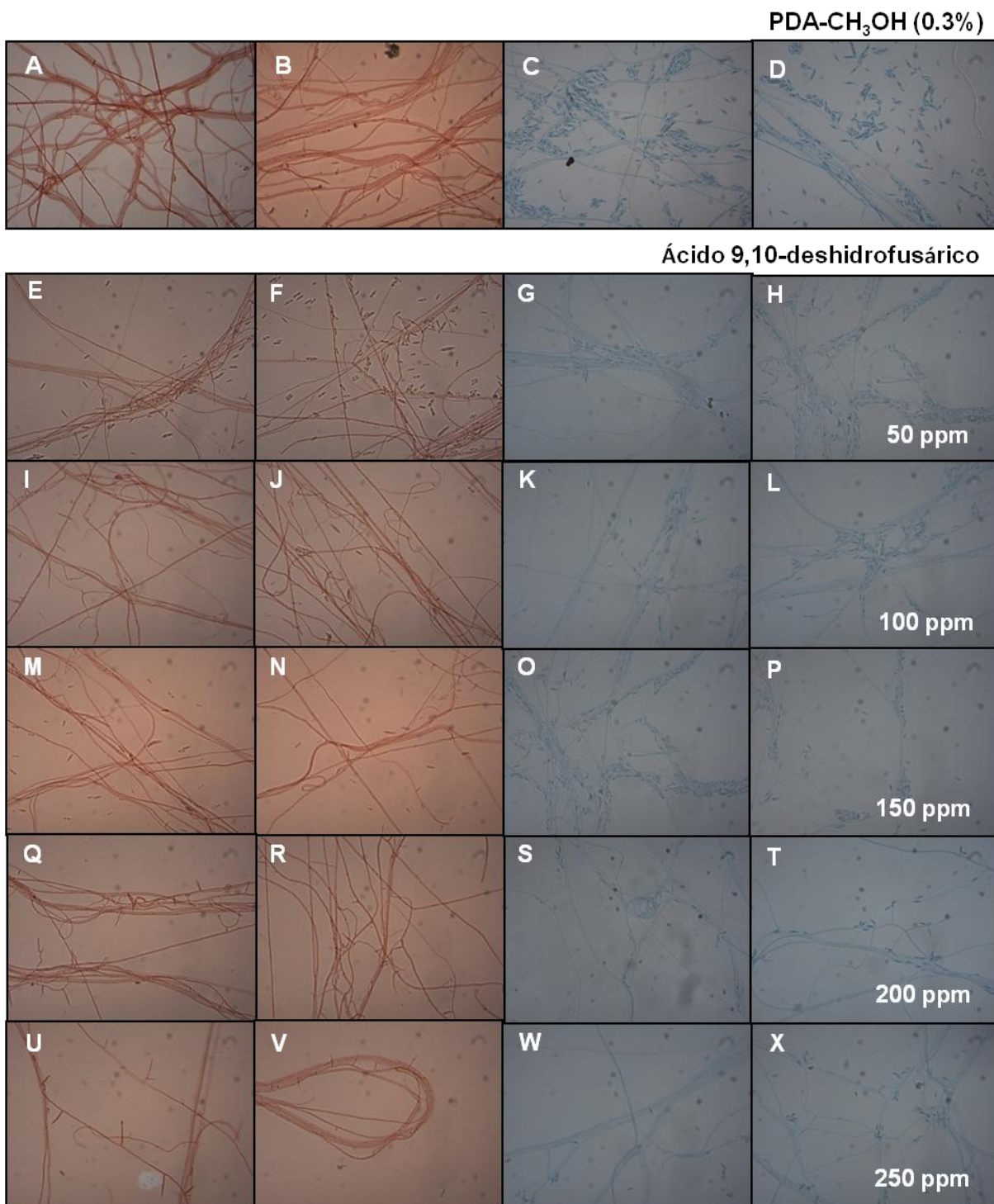
**Figura 42.** Fotografías del micelio del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (**A**) en los cultivos control y en presencia de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) a 250 ppm.



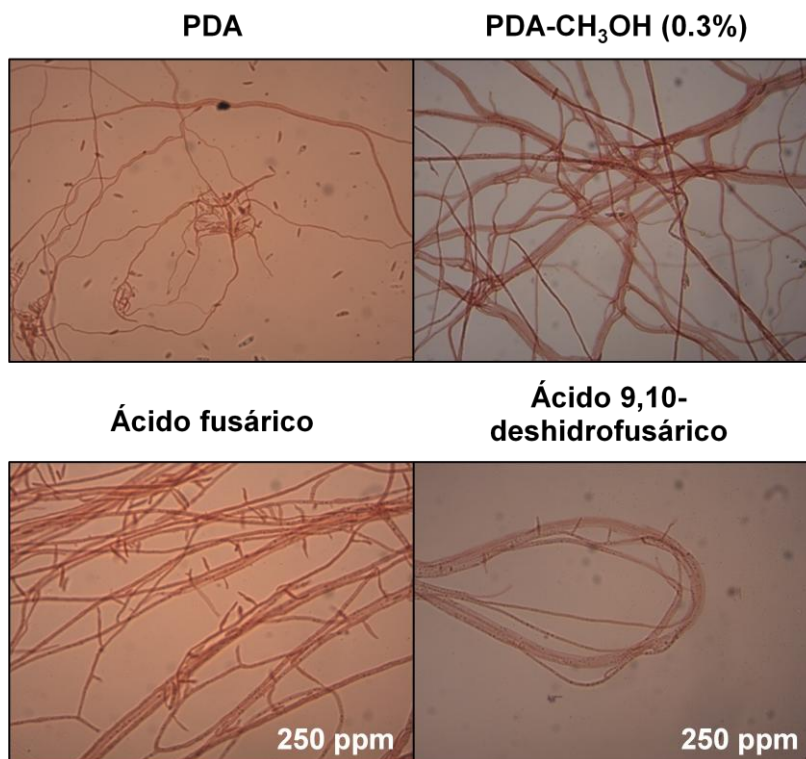


**Figura 43.** Fotografías de las preparaciones en fresco del hongo fitopatológico *F. oxysporum* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido fusárico (9). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (A-D), ácido fusárico (9) a 50 (E-H), 100 (I-L), 150 (M-P), 200 (Q-T) y 250 ppm (U-X).

## Resultados y discusión



**Figura 44.** Fotografías de las preparaciones en fresco del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* a partir de microcultivos a diferentes concentraciones del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**). Medio de cultivo PDA sin tratamiento (**A-D**), ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) a 50 (**E-H**), 100 (**I-L**), 150 (**M-P**), 200 (**Q-T**) y 250 ppm (**U-X**).



**Figura 45.** Preparaciones en fresco del micelio de *F. oxysporum* teñidas con rojo congo a 40x obtenidas a partir de los cultivos control y en presencia del ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**), ambos a 250 ppm.

De nueva cuenta, la disminución de la densidad del micelio, observada en las preparaciones microscópicas de los hongos verdaderos *A. alternata* y *F. oxysporum*, correlaciona directamente con la inhibición sobre el crecimiento radial, generado por la presencia de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**), en los bioensayos en caja de Petri.

## **6.2. Efecto de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura**

El efecto cuantitativo de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre la permeabilidad de la membrana celular de los hongos y oomicetos fitopatógenos con

## Resultados y discusión

---

importancia en agricultura, se evaluó midiendo la conductividad eléctrica relativa generada por la liberación de electrolitos del micelio, expuesto a tres diferentes concentraciones de los compuestos de prueba, durante 2, 4 y 6 h de incubación.

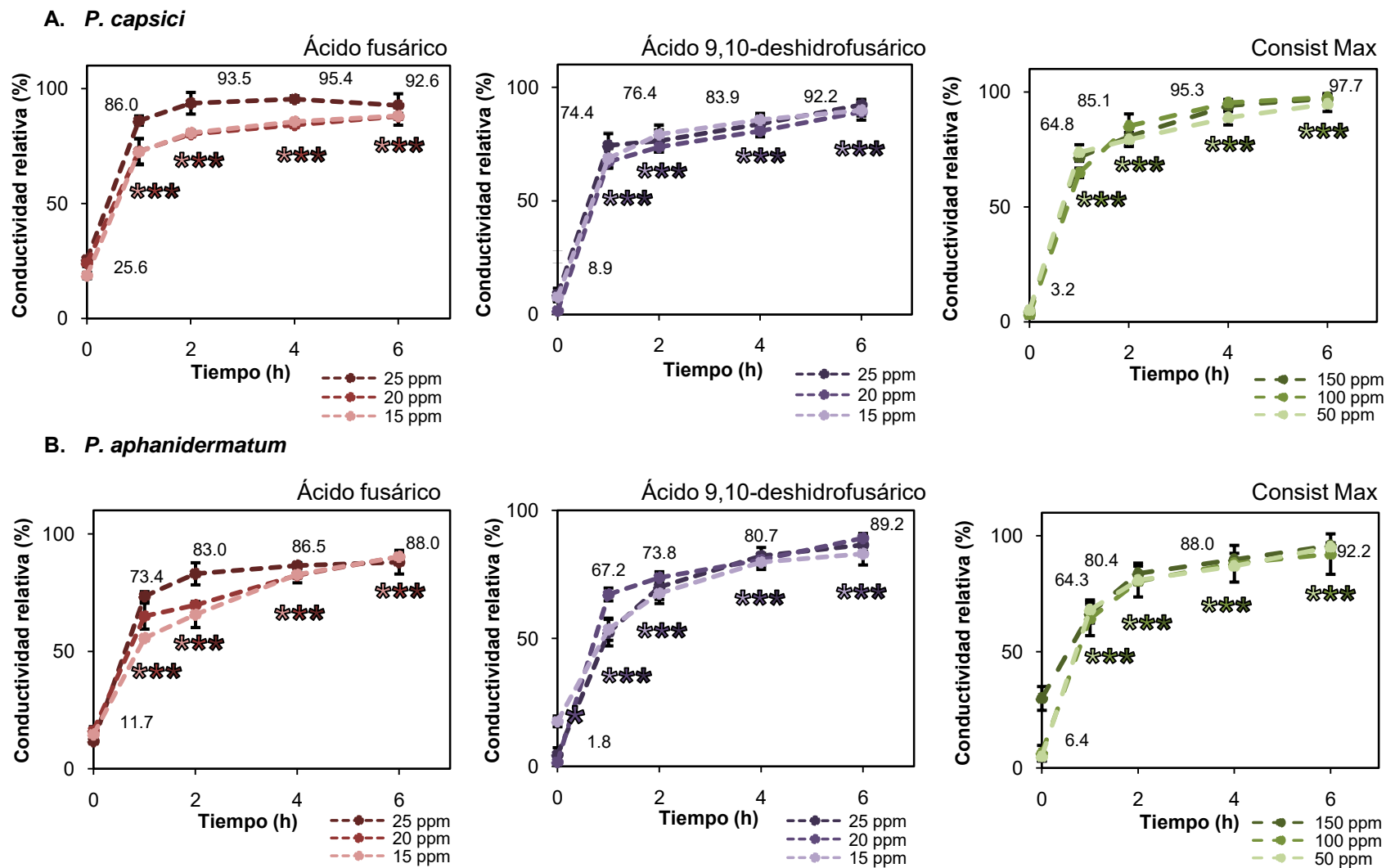
Las concentraciones utilizadas para evaluar el efecto de los compuestos **9** y **34** en este bioensayo, se seleccionaron con base en los efectos observados en los bioensayos de inhibición del crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos en caja de Petri, y las observaciones microscópicas realizadas, a partir de microcultivos en presencia de los compuestos puros empleando el método de dilución en agar.

En las **Figuras 46A** y **B** se muestran las gráficas comparativas del efecto de los compuestos **9** y **34** en un intervalo de concentraciones de 15 ppm (ácido fusárico: 83.7  $\mu\text{M}$ , ácido 9,10-deshidrofusárico: 84.6  $\mu\text{M}$ ) a 25 ppm (ácido fusárico: 139.5  $\mu\text{M}$ , ácido 9,10-deshidrofusárico: 141.1  $\mu\text{M}$ ) y del control positivo Consist Max® en un rango de concentraciones de 50 ppm (tebuconazol: 162.4  $\mu\text{M}$ , trifloxistrobina: 122.4  $\mu\text{M}$ ) a 150 ppm (tebuconazol: 487.3  $\mu\text{M}$ , trifloxistrobina: 367.3  $\mu\text{M}$ ), sobre conductividad relativa del micelio de los oomicetos *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, a las 1, 2, 4 y 6 h de incubación. En general, se observó que el incremento en el tiempo de incubación del micelio de ambos oomicetos en presencia de los ácidos **9** y **34** y del control positivo, aumentó la conductividad relativa en medio acuoso, alcanzando el máximo efecto a las 6 h de exposición. Además, se observó que en general, el incremento de la concentración del ácido **9**, aumentó significativamente la conductividad relativa en los cuatro tiempos de bioensayo, alcanzando valores de conductividad relativa en un intervalo del 86.0% al 92.6% sobre *P. capsici*, y cercanos al 73.4% y 88.0% sobre *P. aphanidermatum*, a la máxima concentración de prueba (25 ppm, 139.5  $\mu\text{M}$ ), resultando el metabolito más activo. Cabe destacar que el efecto demostrado por los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) a la concentración de 25 ppm (ácido fusárico: 139.5  $\mu\text{M}$ , ácido 9,10-deshidrofusárico: 141.1  $\mu\text{M}$ ), sobre la permeabilidad de la membrana de los oomicetos de prueba es superior al efecto provocado por el control positivo Consist Max® a la concentración de 150 ppm (tebuconazol: 487.3  $\mu\text{M}$ , trifloxistrobina: 367.3  $\mu\text{M}$ ).

Por otro lado, en las **Figuras 47A** y **B** se presentan las gráficas comparativas del efecto de los ácidos **9** y **34** a la concentración de 250 ppm (1394.9 y 1410.8  $\mu\text{M}$ , respectivamente), y del control positivo Consist Max® en un intervalo de concentraciones de 10 (tebuconazol: 32.5  $\mu\text{M}$ , trifloxistrobina: 24.5  $\mu\text{M}$ ) a 250 ppm (tebuconazol: 812.2  $\mu\text{M}$ , trifloxistrobina: 612.2  $\mu\text{M}$ ), sobre conductividad relativa del micelio de los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum* a las 1, 2, 4 y 6 h de incubación. Como se puede observar, los compuestos **9** y **34** afectaron la

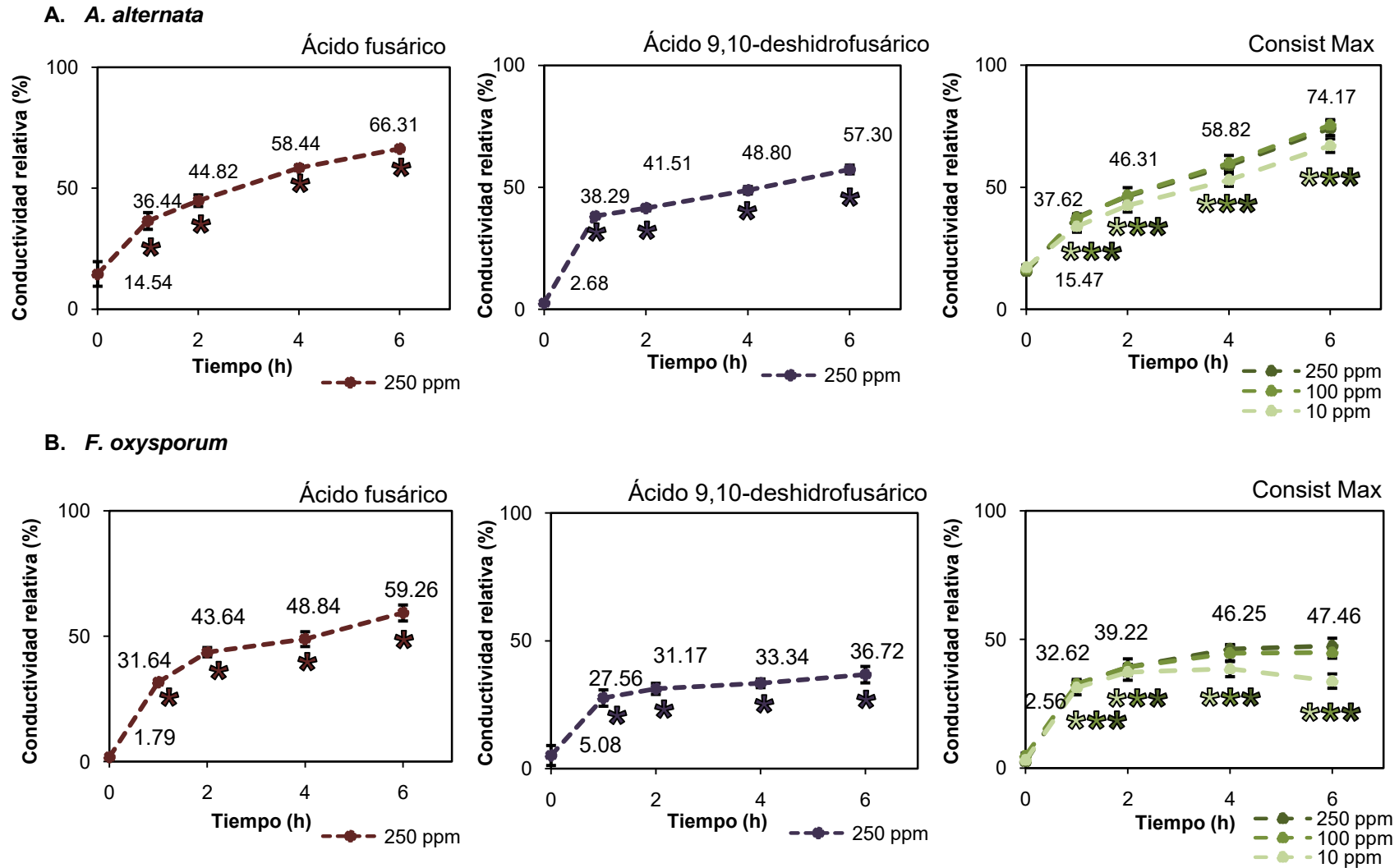
permeabilidad de la membrana de los hongos fitopatógenos evaluados, aumentando la conductividad relativa con respecto del tiempo de exposición de los micelios en presencia de los ácidos. El aumento de la permeabilidad celular generado por los compuesto **9** y **34** sobre *A. alternata* se encuentra en el intervalo de conductividad relativa de 36.4% a 66.3% y de 38.3% a 57.3%, respectivamente, y en los intervalos de 31.6% a 59.3% y de 27.5% a 36.7%, respectivamente sobre el hongo *F. oxysporum*. El efecto ocasionado por el ácido fusárico (**9**) es mayor al provocado por el ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**), alcanzado el mayor efecto a las 6 h de exposición de los micelios al tratamiento. Cabe destacar, que el compuesto **9** generó un mayor efecto sobre la permeabilidad de la membrana del hongo *F. oxysporum* comparado con el producido por el control positivo Consist Max® a la misma concentración de prueba (250 ppm).

Los resultados obtenidos demuestran que los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) alteran la permeabilidad de la membrana celular generando la fuga de los iones citoplásmicos al medio extracelular, y como consecuencia, podrían conducir a la muerte celular. Este efecto puede ser el resultado de la formación directa de poros en la membrana, la inhibición de las enzimas responsables de la síntesis de los esteroides que la conforman o la alteración de la dinámica del citoesqueleto (Deacon, 2005; Toquin *et al.*, 2008). Para evidenciar el daño directo en la membrana celular, por ejemplo, se puede cuantificar la fluorescencia emitida por algunos agentes intercalantes que se fijan a la membrana celular, únicamente cuando esta presenta daño (Sung, 2008). Tanto los agentes que desestabilizan la membrana fúngica, como aquellos que inhiben la síntesis de los esteroides que la conforman, resultan compuestos atractivos para el desarrollo de nuevos antifúngicos (Deacon, 2005; Toquin *et al.*, 2008).



**Figura 46.** Efecto de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre la permeabilidad de la membrana celular de los oomicetos *P. capsici* (**A**) y *P. aphanidermatum* (**B**). Control positivo: Consist Max®. (\*) Valores estadísticamente significativos.

## Resultados y discusión



**Figura 47.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la permeabilidad de la membrana celular del micelio de los hongos *A. alternata* (A) y *F. oxysporum* (B). Control positivo: Consist Max®. (\*) Valores estadísticamente significativos.

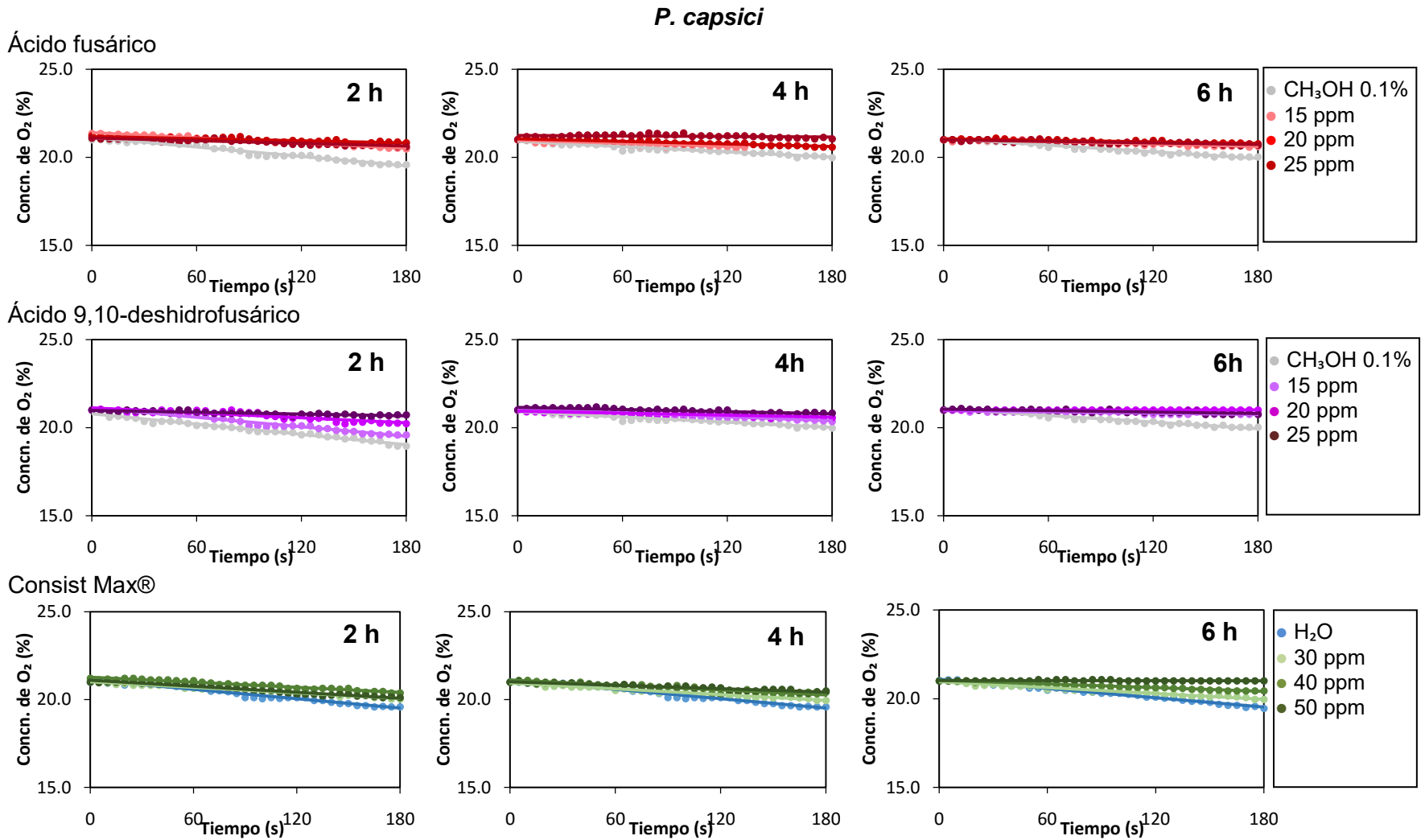
### 6.3. Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la respiración de los microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura

Para evidenciar el efecto cuantitativo de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la respiración celular de los hongos y oomicetos fitopatógenos de prueba, se determinó la tasa de consumo de oxígeno ( $TC_{O_2}$ ) del micelio de los microorganismos en presencia de los compuestos 9 y 34, empleando tres concentraciones de prueba, y registrando su efecto a las 2, 4 y 6 h de incubación. Con los valores obtenidos de  $TC_{O_2}$ , se calcularon los porcentajes de inhibición y las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) sobre la respiración.

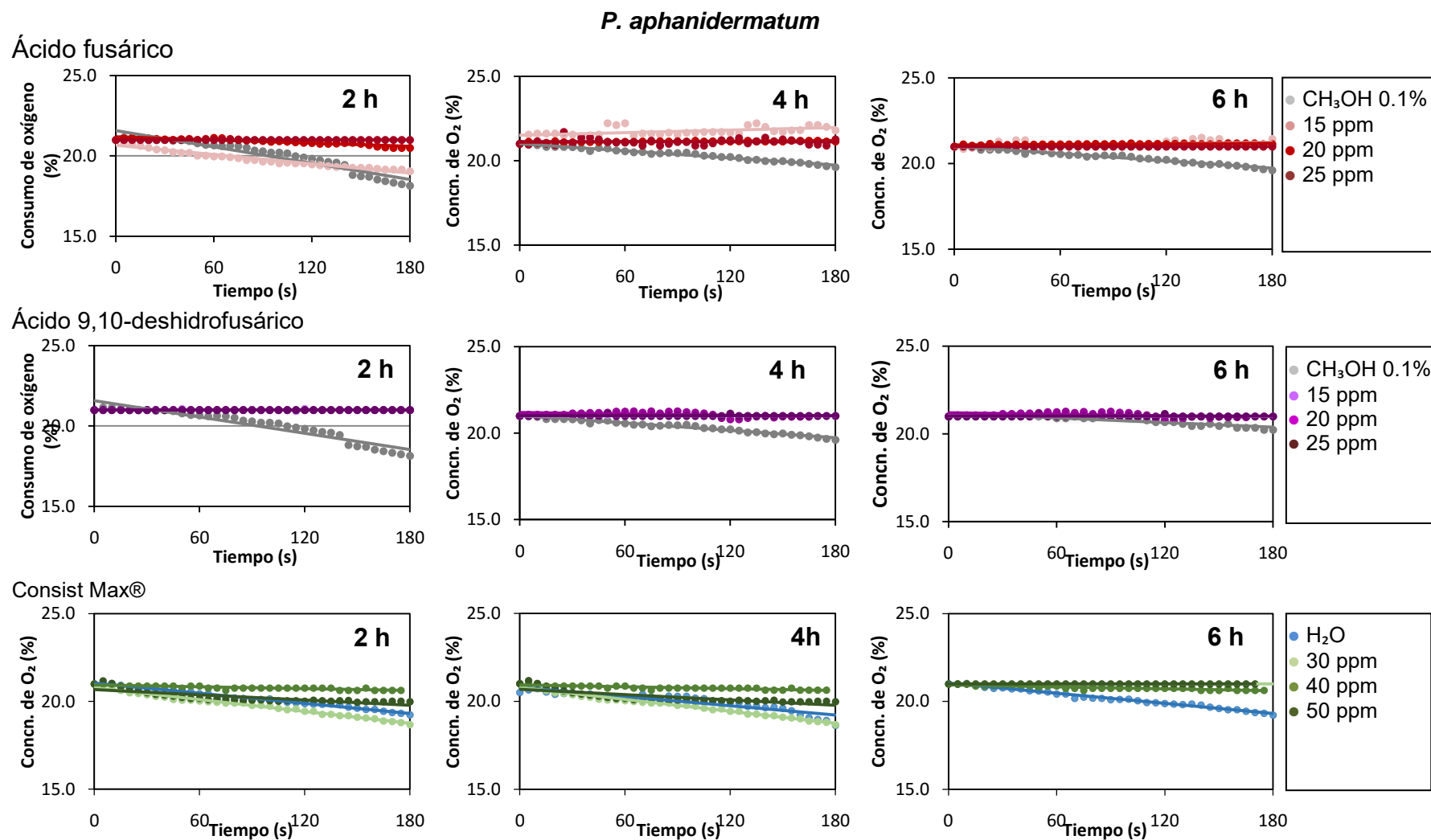
En las **Figuras 48 y 49** se presentan las gráficas comparativas de la  $TC_{O_2}$  del micelio de los oomicetos *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, respectivamente en un intervalo de concentraciones de los ácidos 9 y 34 de 15 ppm (ácido fusárico: 83.7  $\mu$ M, ácido 9,10-deshidrofusárico: 84.6  $\mu$ M) a 25 ppm (ácido fusárico: 139.5  $\mu$ M, ácido 9,10-deshidrofusárico: 141.1  $\mu$ M) y el efecto del control positivo Consist Max® en un rango de concentraciones de 30 ppm (tebuconazol: 97.5  $\mu$ M, trifloxistrobina: 73.5  $\mu$ M) a 50 ppm (tebuconazol: 162.4  $\mu$ M, trifloxistrobina: 122.4  $\mu$ M) a las 2, 4 y 6 h de exposición. Por otra parte, en las **Figuras 50 y 51** se muestran las gráficas de la  $TC_{O_2}$  del micelio de los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum*, respectivamente, en un intervalo de concentraciones de 75 ppm (ácido fusárico: 418.5  $\mu$ M, ácido 9,10-deshidrofusárico: 423.2  $\mu$ M) a 250 ppm (ácido fusárico: 1394.9  $\mu$ M, ácido 9,10-deshidrofusárico: 1410.8  $\mu$ M) para los compuestos 9 y 34, y 0.1 ppm (tebuconazol: 0.3  $\mu$ M, trifloxistrobina: 0.2  $\mu$ M) a 10 ppm (tebuconazol: 32.5  $\mu$ M, trifloxistrobina: 24.5  $\mu$ M) para el control positivo, a las 2, 4 y 6 h de incubación. En general, se observó que la pendiente de la  $TC_{O_2}$  del micelio de los cuatro microorganismos, es igual o cercana a cero al incrementar la concentración de los diferentes tratamientos, demostrando que los ácidos 9 y 34 inhiben el consumo de oxígeno de los microorganismos de prueba. Además, se observó que el efecto sobre el consumo de oxígeno es dependiente del tiempo de exposición a los compuestos.



## Resultados y discusión

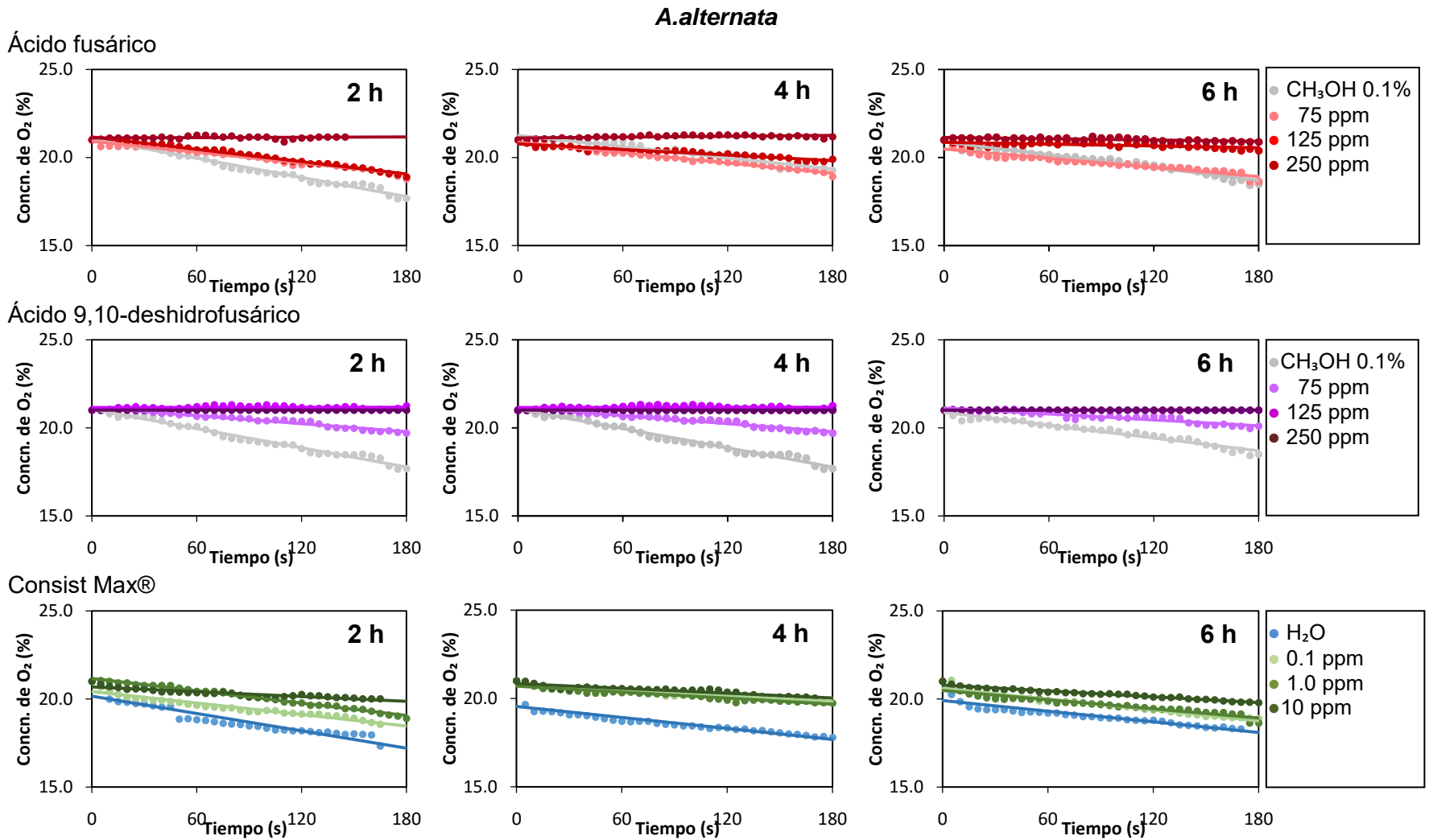


**Figura 48.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la tasa de consumo de oxígeno (TC<sub>O<sub>2</sub></sub>) del micelio del oomiceto fitopatígeno *P. capsici* a las 2, 4 y 6 h de incubación.

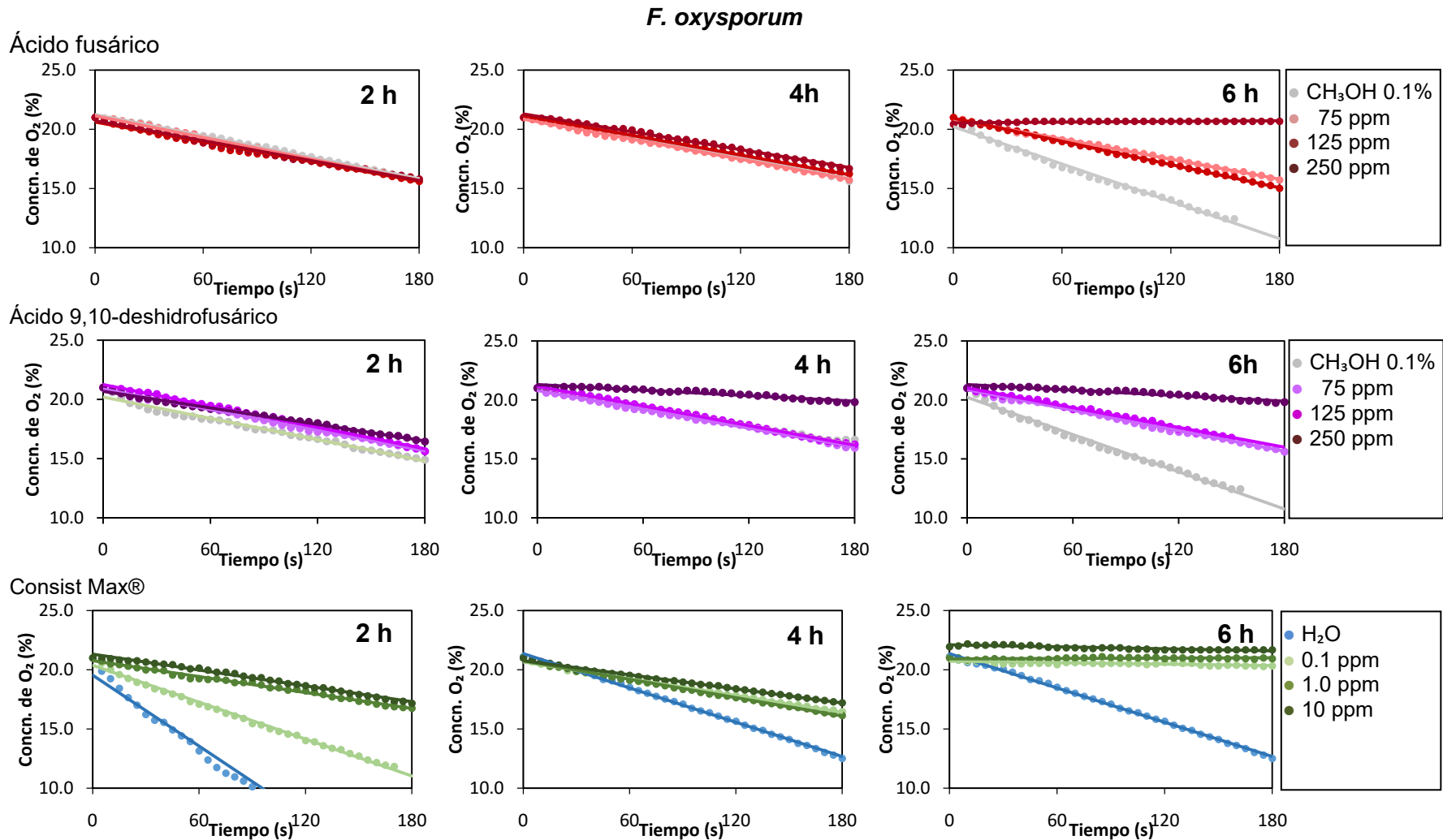


**Figura 49.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la tasa de consumo de oxígeno (TC<sub>O<sub>2</sub></sub>) del micelio del oomiceto fitopatológico *P. aphanidermatum* a las 2, 4 y 6 h de incubación.

## Resultados y discusión



**Figura 50.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la tasa de consumo de oxígeno (TC<sub>O<sub>2</sub></sub>) del micelio del hongo fitopatógeno *A. alternata* a las 2, 4 y 6 h de incubación.



**Figura 51.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la tasa de consumo de oxígeno ( $TC_{O_2}$ ) del micelio del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* a las 2, 4 y 6 h de incubación.

Por otra parte, en la **Figura 52A y B** se muestran los resultados obtenidos, expresados como porcentajes de inhibición sobre la respiración del micelio de los oomicetos *P. capsici* y *P. aphanidermatum* provocados por la presencia de los compuestos **9** y **34**, así como el efecto producido por el fungicida comercial Consist Max®, y en la **Figura 53A y B**, se presenta el efecto de los tratamientos sobre la respiración los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum*. En general, en presencia de todos los tratamientos se observó un efecto inhibitorio significativo y dependiente de la concentración y del tiempo de exposición a los compuestos.

Los compuestos **9** y **34** provocaron un efecto inhibitorio sobre la respiración del micelio de los oomiceto fitopatógenos, mayor al producido sobre la respiración de los hongos, mostrando porcentajes de inhibición en un intervalo del 34% al 100% sobre *P. aphanidermatum*, y entre 8% y 100% sobre *P. capsici*. El ácido fusárico (**9**) inhibió en un 100% la respiración de *P. aphanidermatum* en presencia de las tres concentraciones evaluadas (83.7, 111.6 y 139.5  $\mu\text{M}$ ) a las 4 h de exposición, y en un 100% la respiración de *P. capsici* a las 6 h de incubación. Por otro lado, el ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) inhibió en un 100% la respiración de *P. aphanidermatum* a las tres concentraciones de prueba (84.6, 112.9 y 141.1  $\mu\text{M}$ ) a partir de las 2 h de exposición. El efecto de ambos compuestos orgánicos sobre *P. aphanidermatum* fue mayor al producido por el control positivo a las tres concentraciones evaluadas (tebuconazol: 97.5, 129.9 y 162.4  $\mu\text{M}$ ; trifloxistrobina: 73.5, 97.5 y 129.9  $\mu\text{M}$ ) y los tres tiempos de exposición. Asimismo, el compuesto **34** inhibió en un 100% la respiración de *P. capsici* a las concentraciones de 20 ppm (112.9  $\mu\text{M}$ ) y 25 ppm (141.1  $\mu\text{M}$ ) a las 6 h de incubación, siendo superior al efecto causado por el control positivo Consist Max® a 50 ppm (tebuconazol: 162.4  $\mu\text{M}$ , trifloxistrobina: 122.4  $\mu\text{M}$ ).

Con respecto al efecto de los ácidos **9** y **34** sobre la respiración de los hongos, el ácido fusárico (**9**) inhibió la respiración de *A. alternata*, en un intervalo del 38% al 100%, inhibiendo en un 100% la respiración del microorganismo a la concentración de 250 ppm (1394.9  $\mu\text{M}$ ) a partir de las 2 h de exposición. El ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) generó inhibición de la respiración de *A. alternata*, con porcentajes significativos en un rango del 25% al 100%, alcanzando el 100% de inhibición a las concentraciones de 125 y 250 ppm (705.4 y 1410.8  $\mu\text{M}$ , respectivamente) a las 2 h de exposición al compuesto (**Figura 52A**). En general, la respiración del micelio del hongo *F. oxysporum* es inhibida con porcentajes significativos en el rango del 25% al 88% por el ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) y con porcentajes del 10% al 85% en presencia del ácido fusárico (**9**). En ambos casos el efecto de los compuestos **9** y **34**

## Resultados y discusión

---

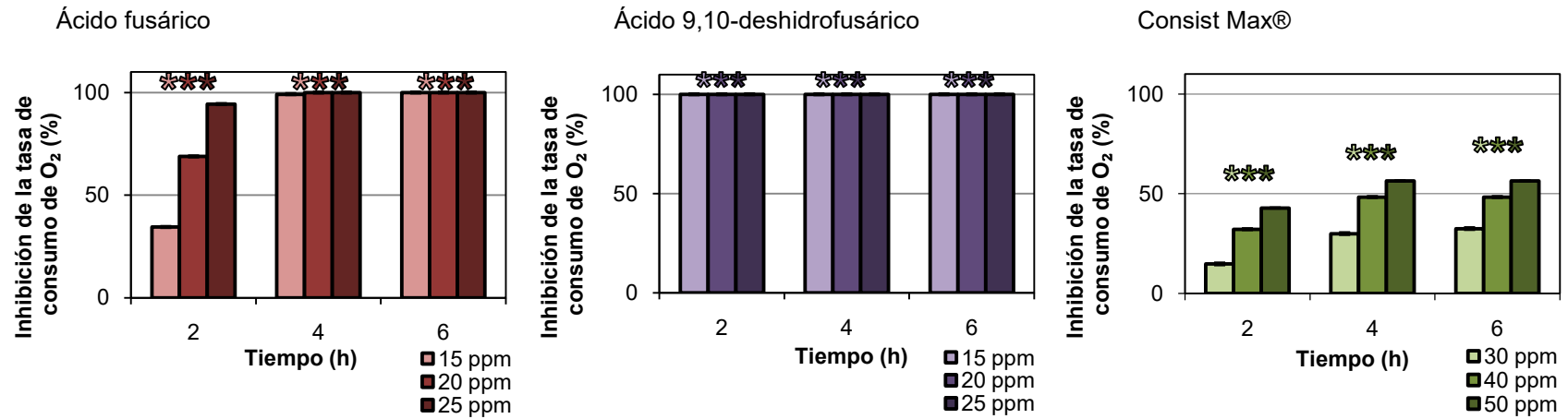
sobre la respiración de los hongos es menor al causado por el agroquímico comercial Consist Max®.

Finalmente, en los **Cuadros 21** y **22** se presentan los valores de  $CI_{50}$  sobre la respiración del micelio de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba en presencia de los tratamientos, expresados en ppm y  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Los valores de  $CI_{50}$  obtenidos para los compuestos **9** y **34** sobre los oomicetos fitopatógenos a las 2, 4 y 6 h de exposición, son menores a los producidos con el fungicida sintético trifloxistrobina, uno de los principios activos del agroquímico comercial Consist Max®, cuyo mecanismo es a nivel del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. A las 2 h de tratamiento con los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**), se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  de 130.0 y 128.01  $\mu\text{M}$ , respectivamente sobre la respiración del oomiceto *P. capsici* y de 95.4 y <84.6  $\mu\text{M}$ , respectivamente sobre *P. aphanidermatum*. En contraste, el control positivo Consist Max®, posee un valor de  $CI_{50}$  >122.4  $\mu\text{M}$  sobre ambos oomicetos. Además, los valores de  $CI_{50}$  obtenidos sobre los oomicetos en presencia de los compuestos **9** y **34** a las 4 y 6 h de exposición disminuyen.

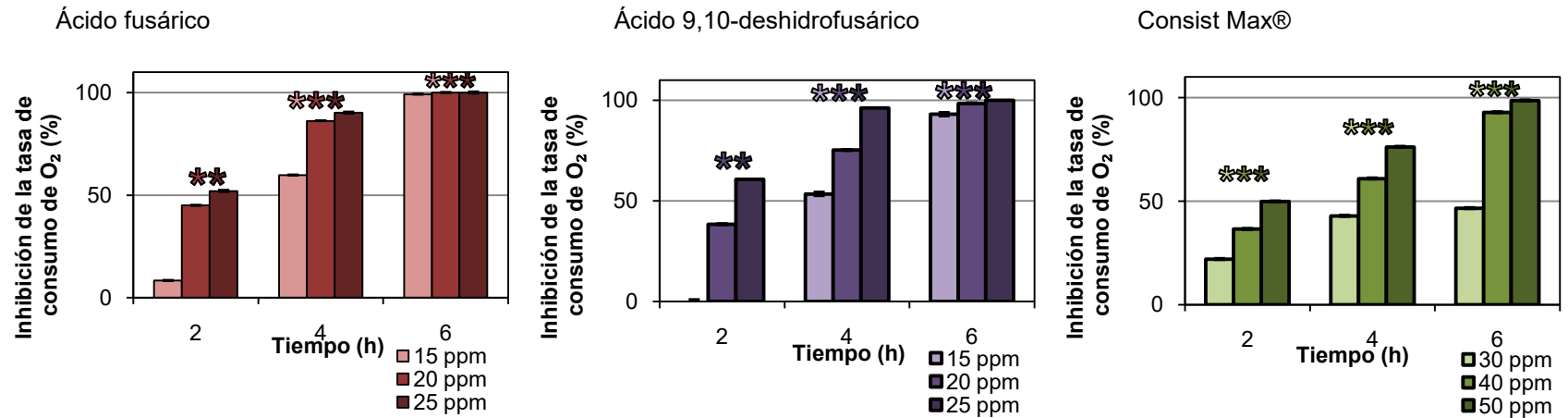
Con respecto a los hongos fitopatógenos, los valores de  $CI_{50}$  generados por los ácidos **9** y **34** sobre el micelio de *A. alternata* a las 2 h de tratamiento son menores a la máxima concentración de prueba. A las 4 y 6 h de incubación se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  en el intervalo de 546.3 a 630.5  $\mu\text{M}$ , para el compuesto **9** y < 423.2 para el compuesto **34**. Por otro lado, a las 2 y 4 h de exposición del micelio de *F. oxysporum* los valores de  $CI_{50}$  provocados por los ácidos **9** y **34** sobre el micelio de *F. oxysporum* son mayores a la máxima concentración de prueba. A las 6 h de exposición del micelio con los compuestos **9** y **34** se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  de 982.6  $\mu\text{M}$  y 781.0  $\mu\text{M}$  respectivamente. Sin embargo, para ninguno de los hongos los valores de  $CI_{50}$  son comparables con el fungicida sintético Consist Max®.

## Resultados y discusión

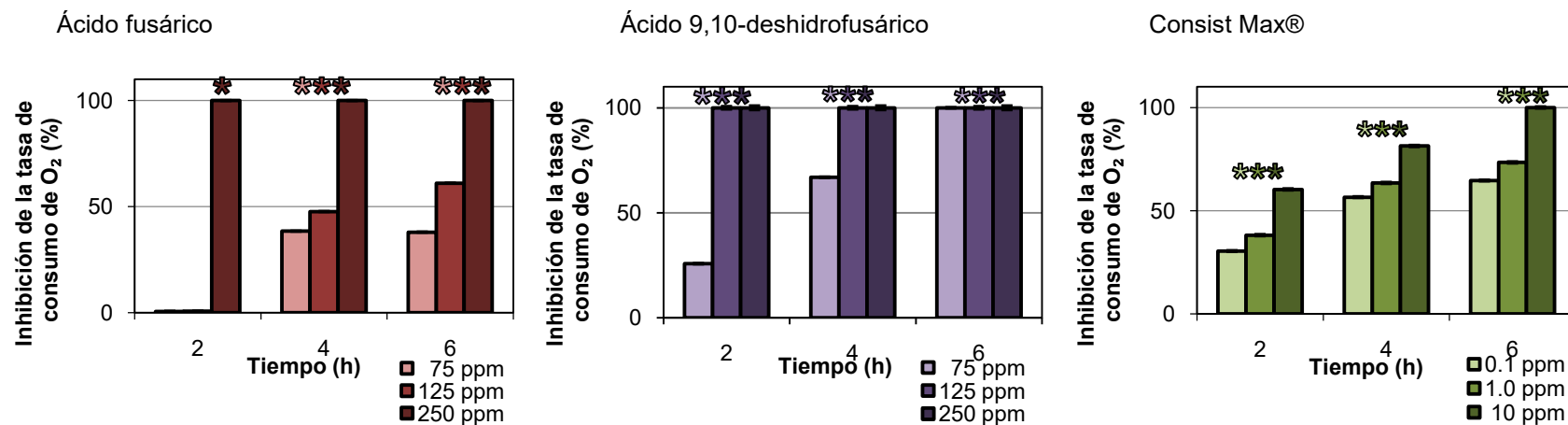
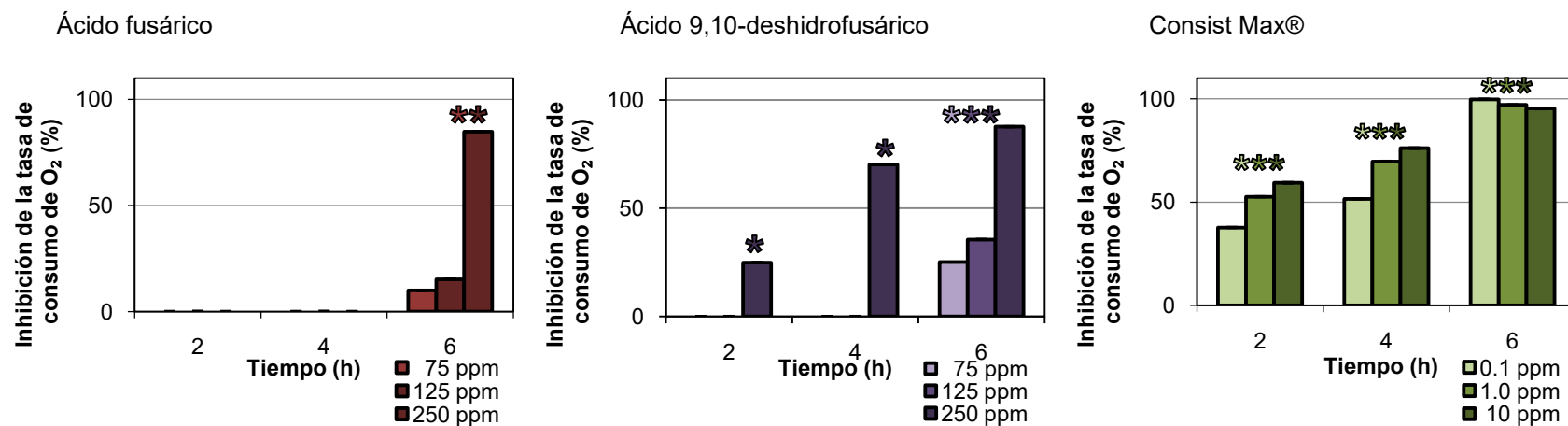
### A. *P. aphanidermatum*



### B. *P. capsici*



**Figura 52.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (30) sobre la respiración del micelio de los oomicetos *P. aphanidermatum* (A) y *P. capsici* (B). Control positivo: Consist Max®. (\*) Valores estadísticamente significativos.

**A. *A. alternata*****B. *F. oxysporum***

**Figura 53.** Efecto de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la respiración del micelio de los hongos *A. alternata* (A) y *F. oxysporum* (B). Control positivo: Consist Max®. (\*) Valores estadísticamente significativos.



**Cuadro 21.** Concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) expresada en ppm de los ácidos fusárico (9) y 9,10-deshidrofusárico (34) sobre la respiración del micelio de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura.

Microorganismo fitopatógeno	Tiempo (h)	CI <sub>50</sub> (ppm)		
		Consist Max®	Ácido fusárico (19)	Ácido 9,10-deshidrofusárico(34)
<i>P. capsici</i>	2	> 50.0	23.3	22.7
	4	33.6	< 15.0	< 15.0
	6	30.4	< 15.0	< 15.0
<i>P. aphanidermatum</i>	2	> 50.0	17.1	< 15.0
	4	46.7	< 15.0	< 15.0
	6	42.9	< 15.0	< 15.0
<i>A. alternata</i>	2	3.0	< 250.0	< 125.0
	4	< 0.1	113	< 75.0
	6	< 0.1	97.9	< 75.0
<i>F. oxysporum</i>	2	1.0	> 250.0	> 250.0
	4	< 0.1	> 250.0	< 250.
	6	< 0.1	176.1	138.4

## Resultados y discusión

**Cuadro 22.** Concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) expresada en  $\mu\text{M}$  de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) sobre la respiración del micelio de cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en agricultura.

Microorganismo fitopatógeno	Tiempo (h)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )			
		Consist Max®		Ácido fusárico ( <b>9</b> )	Ácido 9,10-deshidrofusárico ( <b>34</b> )
		Tebuconazol	Trifloxistrobina		
<i>P. capsici</i>	2	>162.4	>122.4	130.0	128.1
	4	109.2	82.3	<83.7	<84.6
	6	98.8	74.4	<83.7	<84.6
<i>P. aphanidermatum</i>	2	>162.4	>122.4	95.4	<84.6
	4	151.7	114.4	<83.7	<84.6
	6	139.4	105.0	<83.7	<84.6
<i>A. alternata</i>	2	9.7	7.3	<1394.9	<705.4
	4	<0.3	<0.2	630.5	<423.2
	6	<0.3	<0.2	546.3	<423.2
<i>F. oxysporum</i>	2	3.2	2.4	>1394.9	>1410.8
	4	<0.3	<0.2	>1394.9	<1410.8
	6	<0.3	<0.2	982.6	781.0

Con base en los resultados obtenidos, los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) alteran la permeabilidad de la membrana celular e inhiben la tasa de consumo de oxígeno ( $TC_{O_2}$ ) de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba, con un mayor efecto sobre los oomicetos, de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Estos efectos podrían estar implicados en los cambios de las características macroscópicas del micelio y en el deterioro de las hifas, observados en los bioensayos en caja de Petri y en las preparaciones a partir de los microcultivos de los microorganismos de prueba.

---

## IX. Conclusiones

Los resultados de la presente investigación permitieron evidenciar el potencial antioomiceto y antifúngico de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos cultivables, con potencial antagónico, aislados de las plantas *M. affinis* y *S. macrocarpum*.

El cultivo en pequeña escala de los siete hongos endófitos puros aislados de *M. affinis* y de los 14 endófitos puros de *S. macrocarpum* en medio CPD bajo condiciones estáticas a temperatura ambiente, permitieron el crecimiento apropiado de los microorganismos. Asimismo, los métodos de extracción empleados, permitieron la obtención de extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio en cantidad suficiente para llevar a cabo el estudio primario de la actividad antifúngica y antioomiceto de los 21 aislamientos, sobre cuatro microorganismos fitopatógenos con importancia en la agricultura.

En general, los extractos orgánicos de los 21 aislamientos endofíticos demostraron actividad antioomiceto de moderada a alta, en particular sobre el oomiceto *P. capsici*, y actividad antifúngica de baja a moderada sobre los hongos *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Los extractos orgánicos de los endófitos MAE3, SME4, SME7, SME9, SME10 y SME13 mostraron porcentajes de inhibición del 100% sobre el crecimiento de los oomicetos *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, siendo comparable al efecto generado por el antioomiceto comercial Ridomil 4E®. Los extractos del medio de cultivo de los endófitos SME4, SME9 y SME13 mostraron actividad antifúngica alta, inhibiendo con porcentajes superiores al 50% el crecimiento de *A. alternata*, y los extractos de los hongos MAE1, MAE2, MAE3, MAE5, MAE7, SME2, SME4, SME6 y SME10, actividad biológica moderada sobre *A. alternata* inhibiendo con porcentajes del 25.4 al 46.6% su crecimiento. Los extractos de los endófitos MAE2, MAE3, MAE5, SME1, SME2, SME4 y SME11 presentaron actividad moderada sobre *F. oxysporum*, inhibiendo su crecimiento en más del 26.3%.

## Conclusiones

---

Los hongos endófitos SME4, SME9 y SME13 aislados de *S. macrocarpum* mostraron el mayor potencial antifúngico y antioomiceto, inhibiendo con porcentajes significativos en un intervalo de 32.3% a 100% el crecimiento de al menos tres de los microorganismos fitopatógenos de prueba.

Las características macro y microscópicas del aislamiento SME13 de *S. macrocarpum* corresponden a las descritas para el género *Fusarium* sp.

El medio de cultivo CPD y las condiciones estáticas y a temperatura ambiente resultaron las mejores condiciones de incubación para la obtención de cantidades adecuadas de los extractos orgánicos bioactivos de medio de cultivo y micelio del hongo endófito *Fusarium* sp. aislamiento SME13, para su estudio químico biodirigido.

El estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos de medio de cultivo y micelio permitieron la obtención de los metabolitos secundarios bioactivos: los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) y la bikaverina (**35**).

Los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) poseen potencial para el desarrollo de agroquímicos alternativos sobre dos oomicetos fitopatógenos con importancia en la agricultura *P. capsici* y *P. aphanidermatum*, y sobre dos hongos fitopatógenos *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) alteran la morfología de las hifas de los oomicetos *P. capsici* y *P. aphanidermatum* y disminuyen la formación de sus estructuras de reproducción. Asimismo, disminuyen la densidad del micelio y la producción de pigmentos de las hifas de los hongos fitopatógenos *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**) alteran la permeabilidad de la membrana celular e inhiben la respiración de los microorganismos fitopatógenos blanco de forma dependiente de la concentración y de la exposición a los metabolitos secundarios.

De acuerdo a las observaciones realizadas, el efecto antioomiceto y antifúngico observado en presencia de los ácidos fusárico (**9**) y 9,10-deshidrofusárico (**34**)

sobre los microorganismos fitopatógenos blanco, podría estar mediado por el daño a la membrana celular y la inhibición de la respiración mitocondrial.

Finalmente, la presente investigación contribuye al conocimiento de los hongos endófitos aislados de plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad del país. Asimismo, evidencia la importancia del estudio de los productos naturales fúngicos en el descubrimiento de compuestos con potencial uso agroquímico.

---

## X. Referencias bibliográficas

- Abbas, H. K., Boyette, C. D., & Hoagland, R. E. (1995). Phytotoxicity of *Fusarium*, other fungal isolates, and of the phytotoxins fumonisin, fusaric acid, and moniliformin to jimsonweed. *Phytoprotection*, 76(1), 17. doi: 10.7202/706081ar
- Agrios G. N. (2004). *Plant Pathology*. EE. UU. Elsevier Academic Press.
- Armendáriz-Guillén, B. (2013). *Hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antifúngico*. (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Arora, D., Sharma, N., Singamaneni, V., Sharma, V., Kushwaha, M., Abrol, V., Gupta, P. (2016). Isolation and characterization of bioactive metabolites from *Xylaria psidii*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Aegle marmelos* and their role in mitochondrial dependent apoptosis against pancreatic cancer cells. *Phytomedicine*, 23(12), 1312-1320.
- Arx, J. A. v. (1981). *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture* (3 ed.). Vaduz, Germany: J. Cramer.
- Balan, J., Fuska, J., Kuhr, I., & Kuhrová, V. (1970). Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi*, effective against *Leishmania brasiliensis*. *Folia Microbiologica*, 15(6), 479-484.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.
- Barrios-González, J., & Tarragó-Castellanos, M. R. (2015). Solid-State Fermentation: Special Physiology of Fungi. En J.M. Mérillon, K. G. Ramawat (Eds), *Fungal Metabolites* (pp 1-29). Switzerland: Springer International Publishing.
- Bell, A. A., Wheeler, M. H., Liu, J., Stipanovic, R. D., Puckhaber, L. S., & Orta, H. (2003). United States Department of Agriculture?Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f spvasinfectum: potential targets for disease control. *Pest Management Science*, 59(6-7), 736-747.

## Referencias bibliográficas

---

- Benavidez Rozo, M. E., Patriarca, A., Cabrera, G., & Fernandez Pinto, V. E. (2014). Determination of the profiles of secondary metabolites characteristic of *Alternaria* strains isolated from tomato. *Rev Iberoam Micol*, 31(2), 119-124.
- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., & Zeeck, A. (2002). Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *Chembiochem: A European Journal Of Chemical Biology*, 3(7), 619-627.
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Rebutier, D., Madiona, K., Pennarun, A. M., Bouteau, F. (2006). Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytol*, 169(1), 209-218. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01561.x
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed* (2 ed.). Brussels, Belgium: FRAC.
- Capasso, R., Evidente, A., Cutignano, A., Vurro, M., Zonno, M. C., & Bottalico, A. (1996). Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. *Phytochemistry*, 41(4), 1035-1039.
- Copping, L. G., & Duke, S. O. (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, 63(6), 524-554.
- Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*.
- Cornforth, J. W., Ryback, G., Robinson, P. M., & Park, D. (1971). Isolation and characterization of a fungal vacuolation factor (bikaverin). *J Chem Soc Perkin* 1(16), 2786-2788.
- Correia, M., Rodrigues, M., Paíga, P., & Delerue-Matos, C. (2016). Fungicides. In P. M. F. Benajamin Caballero, Fidel Toldrá (Ed.), *Encyclopedia of Food and Health* (Vol. 3). United Kindon: Academic Press.
- Cruz-Cruz, C. A., Ramírez-Tec, G., & Peña-Rodríguez, L. M. (2015). Los metabolitos secundarios en interacción planta-patógeno: fitoprotectores y fitotoxinas. En G. Delgado & A. R. d. Vivar (Eds.), *Temas Selectos de Química de Productos Naturales* (pp. 541). México: Instituto de Química, UNAM

## Referencias bibliográficas

---

- D'Alton, A., & Etherton, B. (1984). Effects of Fusaric Acid on Tomato Root Hair Membrane Potentials and ATP Levels. *Plant Physiology*, 74(1), 39-42.
- Deacon, J.W. (2005). *Fungal Biology*. 4 Ed. EE. UU. Wiley-Blackwell Ed.
- Duan, Y., Ge, C., Liu, S., Chen, C., & Zhou, M. (2013). Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(1-2), 61-67.
- Durringer, J. M., Murty, L., & Craig, A. M. (2013). Endophyte Mycotoxins in Animal Health. In D. R. Gang (Ed.), *Phytochemicals, Plant Growth, and the Environment* (Vol. 42)
- Faeth, S. H. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*, 7(1), 25-36.
- FAO. (2008). *Climate-related transboundary pests and diseases. technical background document from the expert consultation held on 25 to 27 February 2008*. Roma, Italia
- French, E. R., & Hebert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. E. IICA (Ed.). San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Garcia-Mendez, M. C., Macias-Ruvalcaba, N. A., Lappe-Oliveras, P., Hernandez-Ortega, S., & Macias-Ruvalcava, M. L. (2016). Phytotoxic Potential of Secondary Metabolites and Semisynthetic Compounds from Endophytic Fungus *Xylaria feejeensis* Strain SM3e-1b Isolated from *Sapium macrocarpum*. *J Agric Food Chem*, 64(21), 4255-4263.
- Ghannam, I. A. Y., Roaiah, H. F., Hanna, M. M., El-Nakkadya, S. S., & Cox, R. J. (2014). Identification, crystal structure and antitumor activity of fusaric acid from the sugarcane fungal pathogen, *Fusarium sacchari*. *International Journal Of Pharmacy & Technology*, 6(2), 6528-6535.
- Gibbons, S. (2012). An Introduction to Planar Chromatography. In S. D. Sarker & L. Nahar (Eds.), *Natural Products Isolation* (Third Edition ed., Vol. 864, pp. 117-153): Springer New York Dordrecht Heidelberg London.



- Gould A. B. (2009). Fungi: Plant Pathogenic. En M. Schaechter (Ed) Encyclopedia of Microbiology Vol. 5 (pp 457- 477). Amsterdam. Elsevier, Inc.
- Gullino, M. L., Leroux, P., & Smith, C. M. (2000). Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection*, 19, 1 - 11.
- Harris, D. C. (2012). *Análisis químico cuantitativo* (3a ed.). Barcelona: Reverté.
- Herre, E. A., Mejía, L. C., Kyllö, D., Rojas, A. E., Maynard, Z., Butler, A., & A., V. B. S. (2007). Ecological implication of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88(3), 550-558.
- Herrera, T., & Ulloa, M. (1998). *El reino de los hongos: micología básica y aplicada* (2da. ed.). México: UNAM, Fondo de Cultura Económica.
- Hidaka, H. (1971). Fusaric (5-Butylpicolinic) Acid, an Inhibitor of Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase, affects Serotonin and Noradrenaline. *Nature*, 231(5297), 54-55.
- Hidaka, H., & Asano, M. (1976). Relaxation of isolated rabbit arteries by fusaric (5-butylicolinic) acid. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 199(3), 620-629.
- Hidaka, H., Nagatsu, T., Takeya, K., Takeuchi, T., Suda, H., Kojiri, K., Umezawua, H. (1969). Fusaric acid, a hypotensive agent produced by fungi. *The journal of antibiotics*, 22(5), 228-230.
- Hollomon, D. W. (2015). Fungicide Resistance: 40 Years on and Still a Major Problem. In H. Ishii & H. D. William (Eds.), *Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management* (1 ed., pp. 3-11): Springer Japan
- Islam, M. T., & von Tiedemann, A. (2011). 2,4-Diacetylphloroglucinol suppresses zoosporogenesis and impairs motility of Peronosporomycete zoospores. *World J Microbiol Biotechnol*, 27(9), 2071-2079. doi: 10.1007/s11274-011-0669-7
- Judelson, H. S., & Blanco, F. A. (2005). The spores of Phytophthora: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 47-58. doi: 10.1038/nrmicro1064

## Referencias bibliográficas

---

- Kamoun S. (2009). Plant Pathogens Oomycetes (water mold). En M. Schaechter (Ed) Encyclopedia of Microbiology Vol. 5 (pp 689 – 695). Amsterdam: Elsevier, Inc.
- Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem*, 20(19), 5678-5698.
- Kim, J. C., Choi, G. J., Jang, G. S., Lim, H. G., & Cho, G. (2007). Repub. Korea Patent No.: S. K. Korea Research Institute of Chemical Technology.
- Kjaer, D., Kjaer, A., Pedersen, C., Bu'lock, J. D., & Smith, J. R. (1971). Bikaverin and norbikaverin, benzoxanthentrione pigments of *Gibberella fujikuroi*. *J Chem Soc Perkin 1*, 16, 2792-2797.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chem Biol*, 19(7), 792-798.
- Kuźniak, E. (2001). Effects of Fusaric Acid on Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Tomato Cell Cultures. *Journal of Phytopathology*, 149(10), 575-582.
- Kwon, H.-R., Son, S.-W., Han, H.-R., Choi, G.-J., Jang, K.-S., Choi, Y.-H., Kim, J.-C. (2007). Nematicidal Activity of Bikaverin and Fusaric Acid Isolated from *Fusarium oxysporum* against Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *The plant pathology journal*, 23(4), 318-321.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A. A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38(2), 143-158.
- Laundon, G. F., & Waterston, J. M. (1964). *Pythium aphanidermatum*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 36, 1-2.
- Latijnhouwers, M., de Wit P. J.G. M., Govers F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology* 11(10) 462 – 469.
- Laundon, G. F., & Waterston, J. M. (1964). *Pythium aphanidermatum*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 36, 1-2.
- Leadbeater, A. (2011). The Impact of the New European Regulations on the Management of Crop Diseases. En H. W. Dehne, H. B. Deising, U. Gisi, K. H.

- Kuck, P. E. Russell & H. Lyr (Eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI* (1 - 10). Alemania. Germany: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A., & Bullock, S. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. EE. UU.: Wiley-Blackwell.
  - Leroux, P., Bach, J., Debieu, D., Fillinger, S., Fritz, R., & Walker, A.-S. (2007). Mode of action of sterol biosynthesis inhibitors and resistance phenomena in Fungi. In H. W. Dehne, H. B. Deising, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell & L. H. (Eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V. 15th International Reinhardtsbrunn Symposium* (pp. 85-92). Friedrichroda, Germany: DPG Selbstverlag
  - Li-jian, X., Pei-qin, L., Jiang-W, Z., Ti-jiang, S., Chun-hui, Y., Ming-an, W., & Li-gang, Z. (2010). Two Antimicrobial Compounds Fusaric Acid and 9,10-Dehydrofusaric Acid from Endophytic *Fusarium redolens* Dzf2. *Natural Product Research & Development*, 22(4), 564-567.
  - Li Xing, Z., Li-Hua, X., & Cheng-Ling, J. (2012). Methods for the study of endophytic microorganisms from traditional Chinese medicine plants. *Methods Enzymology*, 517, 3-21.
  - Liu, S., Dai, H., Orfali, R. S., Lin, W., Liu, Z., & Proksch, P. (2016). New Fusaric Acid Derivatives from the Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* and Their Phytotoxicity to Barley Leaves. *J Agric Food Chem*, 64(16), 3127-3132.
  - Macías-Rubalcava, M. L., García-Méndez, M. C., King-Díaz, B., & Macías-Rubalcava, N. A. (2017). Effect of phytotoxic secondary metabolites and semisynthetic compounds from endophytic fungus *Xylaria feejeensis* strain SM3e-1b on spinach chloroplast photosynthesis. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 116.
  - Macias-Rubalcava, M. L., Hernandez-Bautista, B. E., Jimenez-Estrada, M., Gonzalez, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., Anaya, A. L. (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, 69(5), 1185-1196.

## Referencias bibliográficas

---

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clarck, D. P. (2009). *BROCK. Biología de los microorganismos* (12 ed.): Pearson Education.
- Magan, N., Aldred, D. (2008). Chapter 2: Environmental Fluxes and Fungal Interactions: Maintaining a Competitive Edge. En S. V. Avery, M. Stratford and P. Van West (Eds.). *Stress in Yeast and Filamentous Fungi* Vol. 27 (pp 19 – 35). Amsterdam: Elsevier.
- Maheshwari, R. (2005). *Fungi experimental Methods in Biology/ Ramesh Maheshwari* (B. J. W. Ed.): Taylor & Francis.
- Maienfisch, P., & Stevenson, T. M. (2015). Modern Agribusiness-Markets, Companies, Benefits and Challenges. En P. Maienfisch, T. M. & Stevenson (Eds.) *Discovery and Synthesis of Crop Protection Products* Vol. 1204 (pp. 1-13): EE. UU. American Chemical Society.
- McInnes, A. G., Smith, D. G., Walter, J. A., Vining, L. C., & Wright, J. L. C. (1975). Homonuclear <sup>13</sup>C decoupling in <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of biosynthesis using doubly labelled precursors. Assembly pattern of the acetate units in bikaverin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 3, 66-68.
- McMurry, J. (2012). *Química Orgánica. 8a edición*. México: Cengage Learning.
- Medvedeva, T. M., Bezborodov, A. M., Zheludkova, M. D., Zhdanova, N. F., & Kudnin, A. N. (1978). Synthesis and Pharmacological activity of fusaric acid and its derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 12, 614- 617.
- Meléndez-González, C., Muria-González, M. J., Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B. E., Simón, H.-O., González, M. C., . . . Macías-Rubalcava, M. L. (2015). Acremoxanthone E, a Novel Member of Heterodimeric Polyketides with a Bicyclo[3.2.2]nonene Ring, Produced by *Acremonium camptosporum* W. Gams (Clavicipitaceae) Endophytic Fungus. *Chemistry and Biodiversity*, 12, 133 - 147.
- Mier, T., Rivera-Becerril, F., A., A. Z. M., C., T., S., A.-O., & Ulloa, M. (2013). *Métodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Niehaus, E.-M., Díaz-Sánchez, V., Walburga von Barga, K., Kleigrewe, K., Humpf, H.-U., & LimónBettina Tudzynski, M. C. (2014). Fusarins and Fusaric Acid in Fusaria. In J.-F. Martín, C. G.-. Estrada & S. Zeilinger (Eds.), *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites* (1 ed., pp. XI, 351): Springer-Verlag New York.
- Osono, T. (2004). Diversity and Ecology of Endophytic and Epiphytic Fungi of Tree Leaves in Japan: A Review. In V. C. Verma & A. C. Gange (Eds.), *Advances in Endophytic Research*: Springer.
- Peng, L., Yang, S., Cheng, Y. J., Chen, F., Pan, S., & Fan, G. (2012). Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1533-1539.
- Pinheiro, E. A., Pina, J. R., Feitosa, A. O., Carvalho, J. M., Borges, F. C., Marinho, P. S., & Marinho, A. M. (2017). Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*. *Rev Argent Microbiol*.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Nueva York: Springer.
- Rakotonirainy, M. S. (2017). MYCOTA. Revisado el 17 de Enero de 2017, de <http://mycota-crcc.mnhn.fr/>
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2008). *Rang y Dale Farmacología* (Sexta ed.). España: Elsevier España.
- Rodriguez, R. J., & Redman, R. S. (1997). Fungal Life-Styles and Ecosystem Dynamics: Biological Aspects of Plant Pathogens, Plant Endophytes and Saprophytes. *Advances in Botanical Research*, 24, 169-193.
- Roque-Flores, G. (2017). *Efecto fitotóxico, antifúngico y antioomiceto de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles del aislamiento endofítico SMEG4 de Sapium macrocarpum (Euphorbiaceae)*. (Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México.
- Samadi, L., & Shahsavan Behboodi, B. (2006). Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Planta*, 225(1), 223-234.

## Referencias bibliográficas

---

- Sanchez-Fernandez, R. E., Diaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sanchez, S., & Macias-Rubalcava, M. L. (2016). Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microb Ecol*, 71(2), 347-364.
- Sánchez-Fernández, R. E. (2016). *Actividad antagónica, antifúngica y fitotóxica de hongos endófitos de Gliricidia sepium (Fabacea): Identificación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de Nodulisporium sp. GS4d2II1a*. (Doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad de México.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146.
- Sánchez-Ortiz, B. L. (2016). *Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de hongos endófitos de haematoxylon brasiletto (Fabacea) útiles en agricultura*. (Doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Scherlach, K., & Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem*, 7(9), 1753-1760.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661-686.
- Schulz, B., Römmert, A.-K., Dammann, U., Aust, H.-J., & Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103(10), 1275-1283.
- Selim, M. E., & El-Gammal, N. A. (2015). Role of Fusaric Acid Mycotoxin in Pathogenesis Process of Tomato Wilt Disease Caused by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(10).
- SENASICA (2016a). Revisado el 20 de abril de 2017. Plaguicidas de uso agrícola, de <http://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/plaguicidas-de-uso-agricola>.

- SENASICA (2016b) Revisado el 20 de abril de 2017. Registro de plaguicidas agrícolas, de <http://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/guia-para-registrar-plaguicidas-agricolas>
- Shaw, D. S. (1988). The Phytophthora species. In G. S. Sidhu (Ed.), *Genetics of Plant Pathogenic Fungi* (1 ed., Vol. 6, pp. 566): Academic Press
- Son, S. W., Kim, H. Y., Choi, G. J., Lim, H. K., Jang, K. S., Lee, S. O., Kim, J. C. (2008). Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *J Appl Microbiol*, 104(3), 692-698.
- Song, J. J., & Yee, N. K. (2001). A concise synthesis of fusaric acid and (S)-(+)-fusarinolic acid. *Journal of Organic Chemistry*, 66(2), 605-608.
- Sparks, T. C., Hahn, D. R., & Garizi, N. V. (2017). Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest Manag Sci*, 73(4), 700-715.
- Stamps, D. J. (1984). *Phytophthora capsici*. *C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* 836.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal Of Natural Products*, 2(2), 257-268.
- Sung, W. S., Lee, J., & Lee, D. G. (2008). Fungicidal Effect of Piscidin on *Candida albicans*: Pore Formation in Lipid Vesicles and Activity in Fungal Membranes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(10), 1906-1910. doi: 10.1248/bpb.31.1906
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R., & Murali, T. S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23(1-2), 9-19.
- Tamm, L., Thürig, B., Fließbach, A., Goltlieb, A. E., Karavani, S., & Cohen, Y. (2011). Elicitors and soil management to induce resistance against fungal plant diseases. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 58(3-4), 131-137.

## Referencias bibliográficas

---

- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites (1987 to 2000). *Natural Product Reports*, 18(4), 448-459.
- Telles-Pupulin, A. R., Salgueiro-Pagadigorria, C. L., Bracht, A., & Ishii-Iwamoto, E. L. (1998). Effects of fusaric acid on rat liver mitochondria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 120, 43–51.
- Toquin, V., Barja, F., Sirven, C., Gamet, S., Latorse, M. P., Zundel, J. L., Beffa, R. (2008). A New Mode of Action for Fluopicolide: Modification of the Cellular Localisation of a Spectrin-like Protein. In H. W. Dehne, H. B. Deising, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell & H. Lyr (Eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* V. Germany: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft.
- Ulloa, M., & Hanlin, R. T. (1978). *Atlas de micología básica* (S. A. Editorial Concepto Ed.). Ciudad de México.
- UNAM. (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Revisado el 7 de Abril de 2017, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- USEPA. (2015). *Compliance Monitoring Strategy For Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA)*. U. S.: EPA.
- Villanueva-Silva, R. (2014). *Potencial antagónico de hongos endófitos de Mimosa affinis y Sapium macrocarpum*. (Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México.
- Villaverde, J. J., Sandín-España, P., Sevilla-Morán, B., López-Goti, C., & Alonso-Prados, J. L. (2016). Biopesticides from Natural Products Current Development, Legislative Framework, and Future Trends. *BioResources*, 11(2), 5618-5640.
- Walton, H. F. (1978). *Análisis químico e instrumental moderno*. Barcelona, España: Editorial Reverte.
- Wang, E. T., Rogel, M. A., García de los Santos, A., Julio, M.-R., Cevallos, M. A., & Martínez-Romero, E. (1999). Rhizobium etli bv. mimosae, a novel biovar isolated from Mimosa affinis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1479-1471 1491.



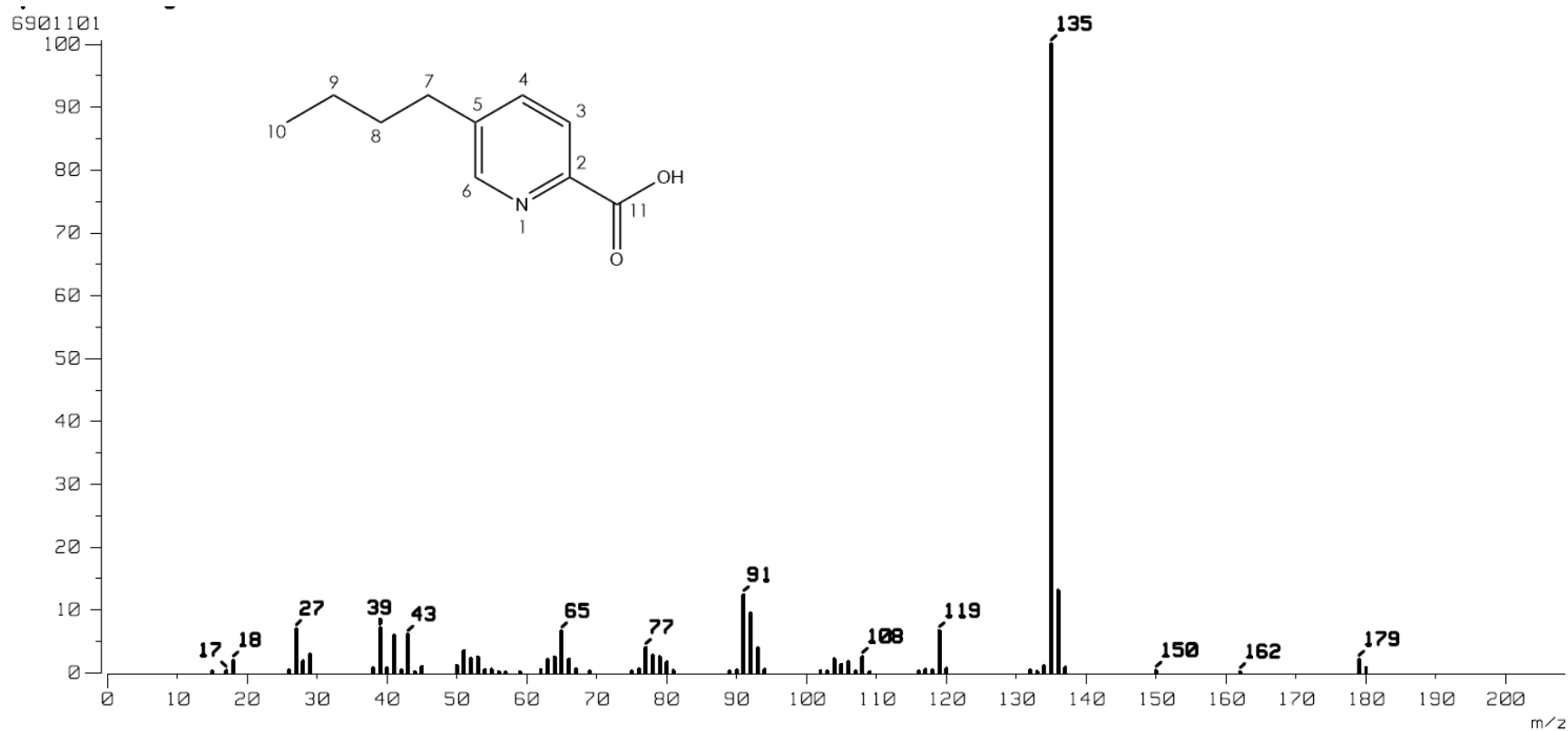
- Wang, H., & Ng, T. B. (1999). Pharmacological activities of fusaric acid (5-butylicolinic acid). *Life Sciences*, 65(9), 849-856.
- Wang, M., Ling, N., Dong, X., Liu, X., Shen, Q., & Guo, S. (2013). Effect of fusaric acid on the leaf physiology of cucumber seedlings. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1), 103-112.
- Wicklow, D. T., & Poling, S. M. (2009). Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. *Phytopathology*, 99(1), 109-115.
- Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrewe, K., Beyer, M., Humpf, H. U., & Tudzynski, B. (2009). Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol*, 72(4), 931-946.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., & Ruangrunsi, N. (2004). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10(3), 265-272.
- Wolf-Rainer, A., & Hanssen, H.-P. (1992). Fusoxysporone - a New Type of Ditetpene *Fusarium oxysporum*. *Tetrahedron*, 48(48), 10559-10562.
- Yang, S., Liu, L., Li, D., Xia, H., Su, X., Peng, L., & Pan, S. (2016). Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action. *Food Chem*, 196, 610-618.
- Yoonjeong, J., Ji-Eun, K., Sang-Hee, J., Min-Kyoung, P., Jun Sung, K., & Myung-Haing, C. (2016). Trifloxystrobin-induced mitophagy through mitochondrial damage in human skin keratinocytes. *The Journal of Toxicological Sciences*, 41(6), 731-737.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., . . . Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res*, 165(6), 437-449.
- Zhang, S. P., Huang, R., Li, F. F., Wei, H. X., Fang, X. W., Xie, X. S., He, J. (2016). Antiviral anthraquinones and azaphilones produced by an endophytic fungus *Nigrospora* sp. from *Aconitum carmichaeli*. *Fitoterapia*, 112, 85-89.

## Referencias bibliográficas

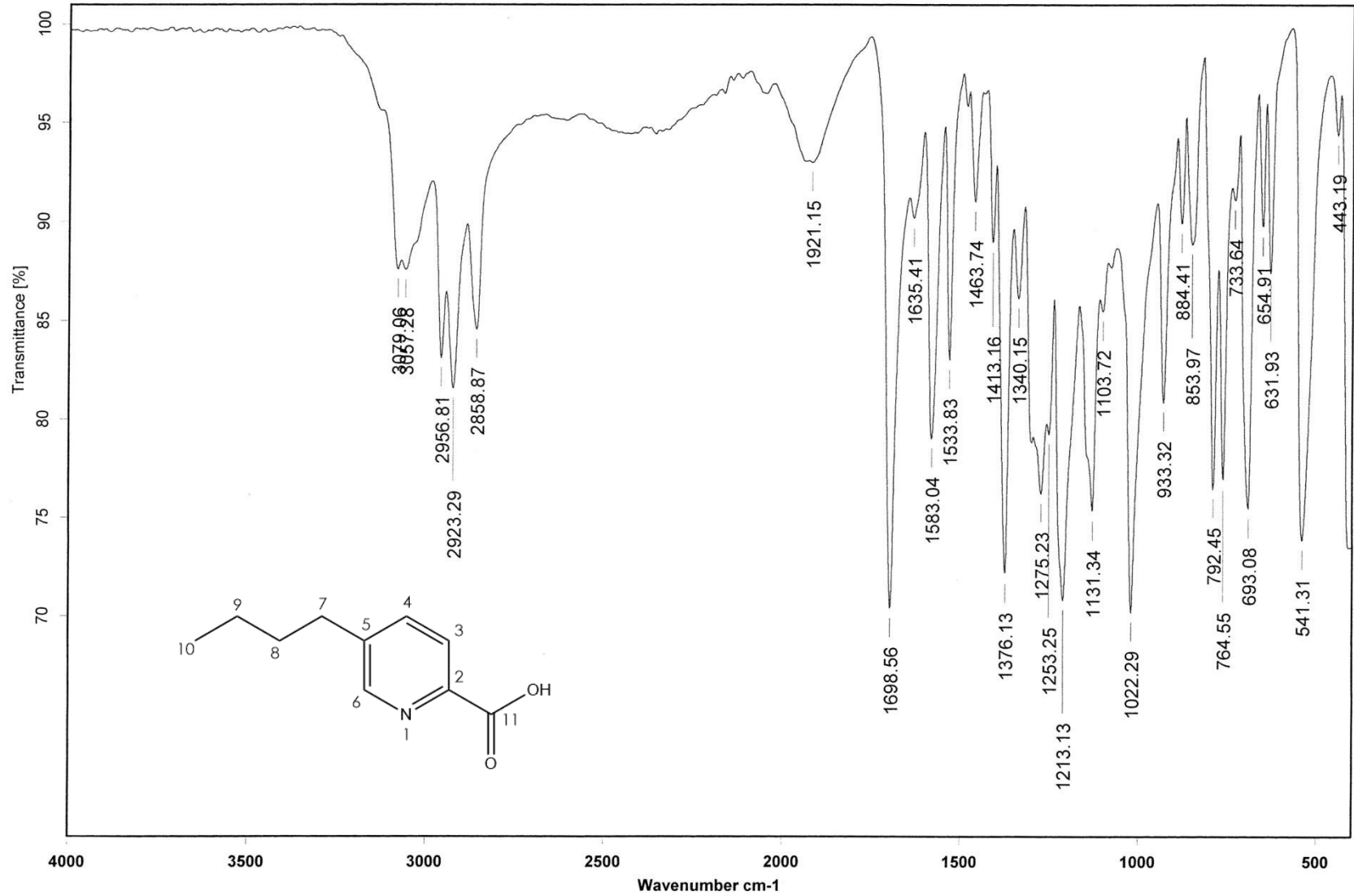
---

- Zhang, W., Krohn, K., Draeger, S., & Schulz, B. (2008). Bioactive Isocoumarins Isolated from the Endophytic Fungus *Microdochium bolleyi*. *Journal of Natural Products*, 71(6), 1078-1081.
- Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep*, 23(5), 753-771.

## Anexo. Espectrometría y espectroscopía

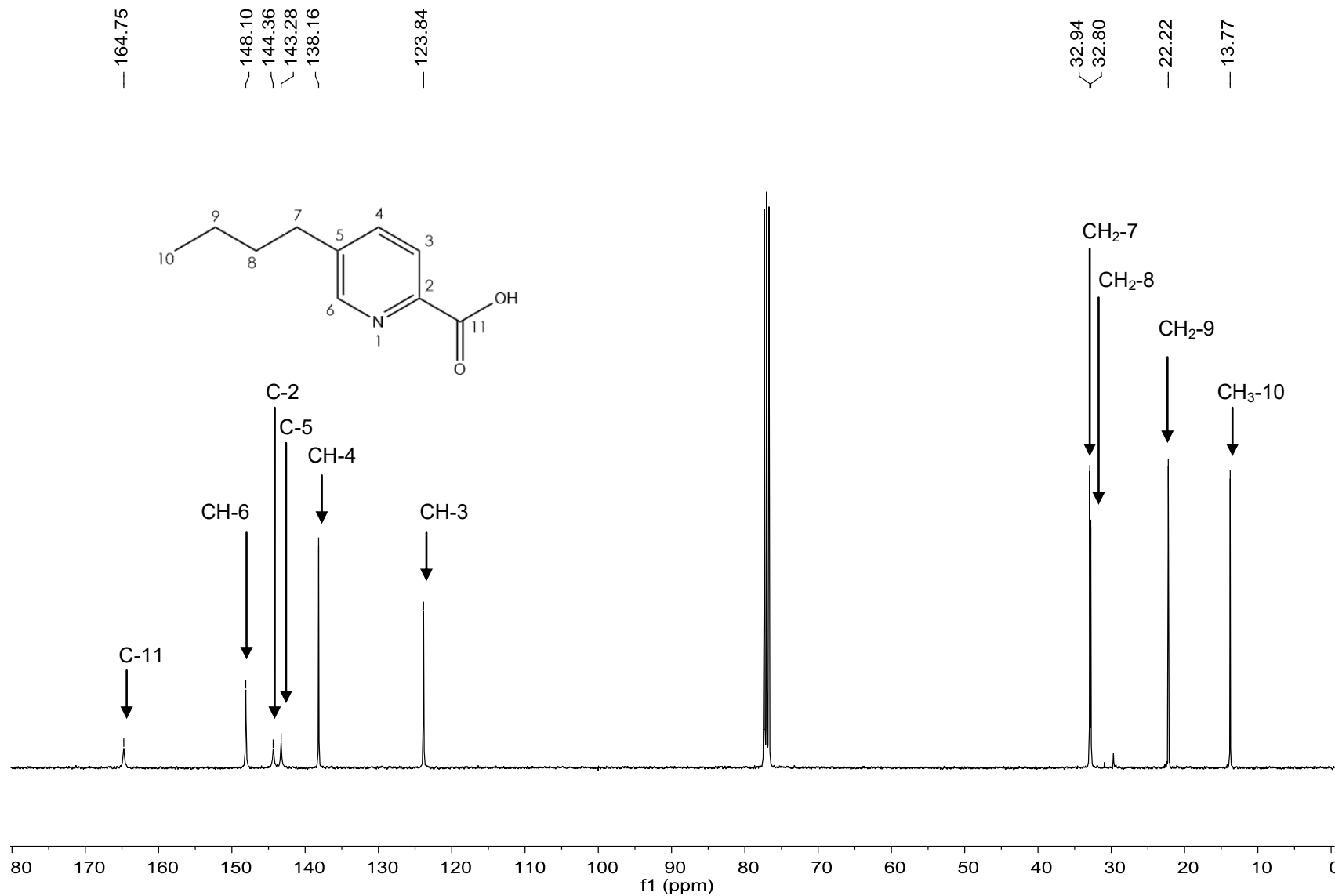


**Espectro 1.** Espectro de masas del ácido fusárico (9) obtenido por la técnica de impacto electrónico.

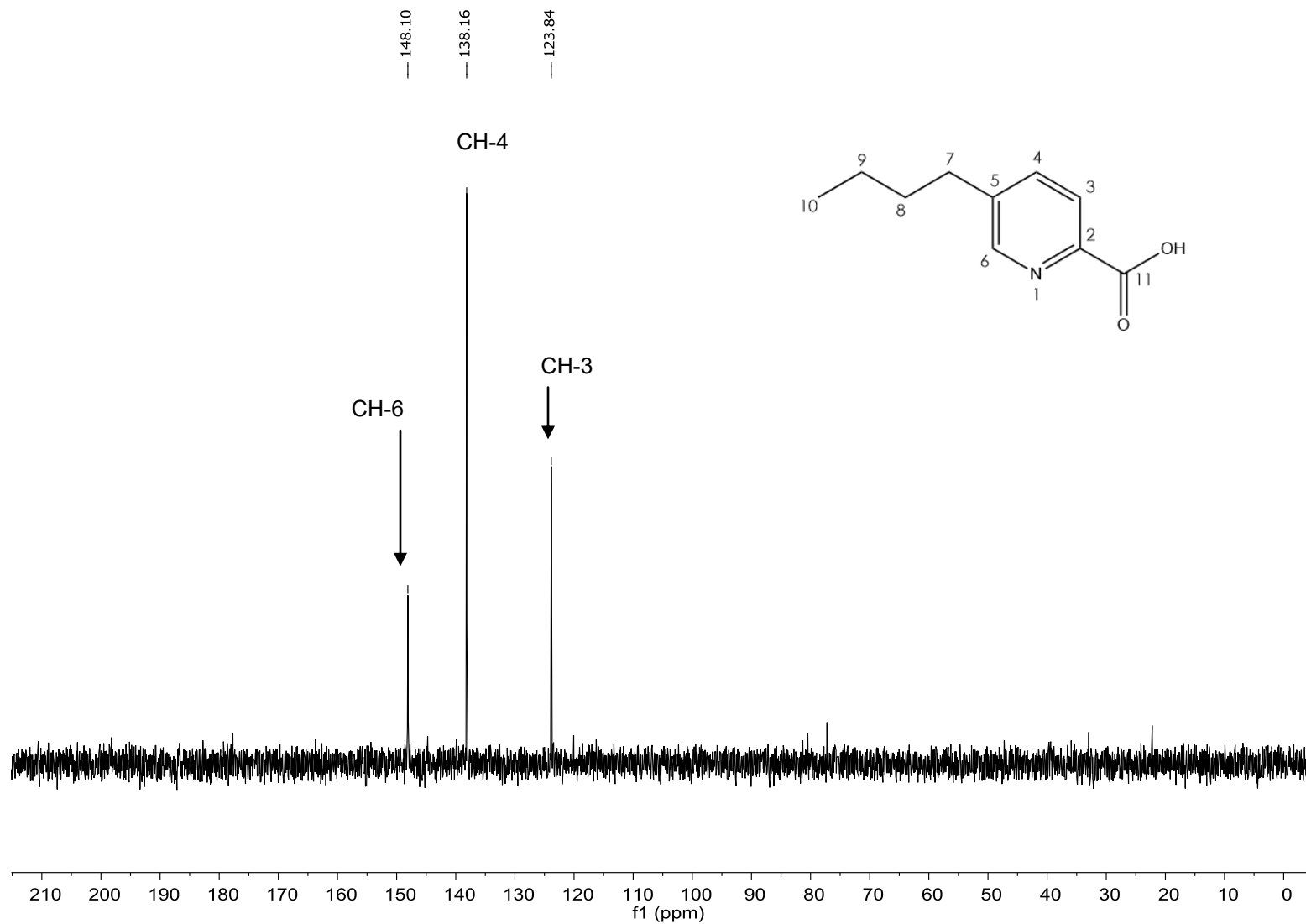


**Espectro 2.** Espectro en el IR del ácido fusárico (9).

# Anexo. Espectrometría y espectroscopía

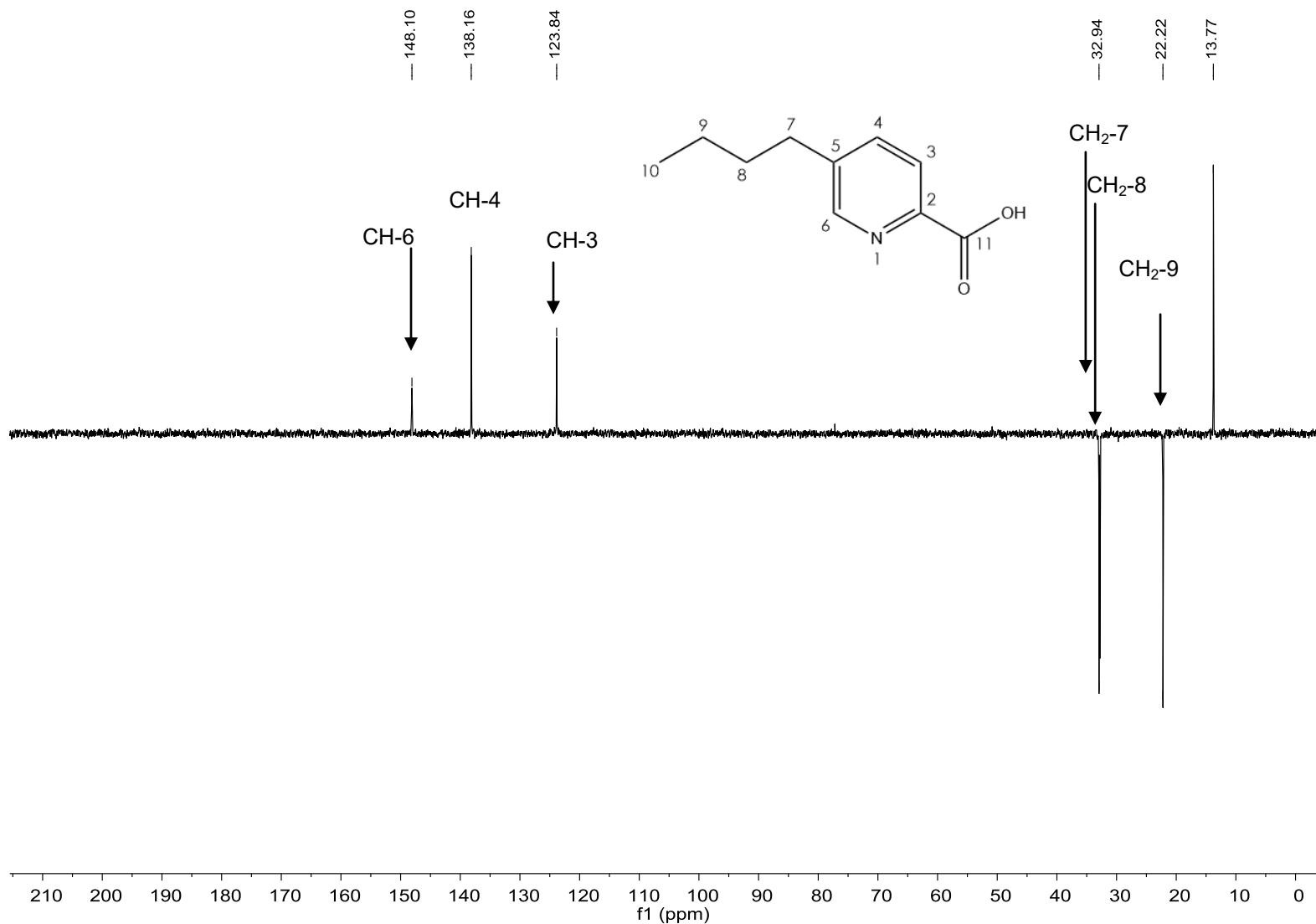


**Espectro 3.** RMN <sup>13</sup>C del ácido fusárico (**9**) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

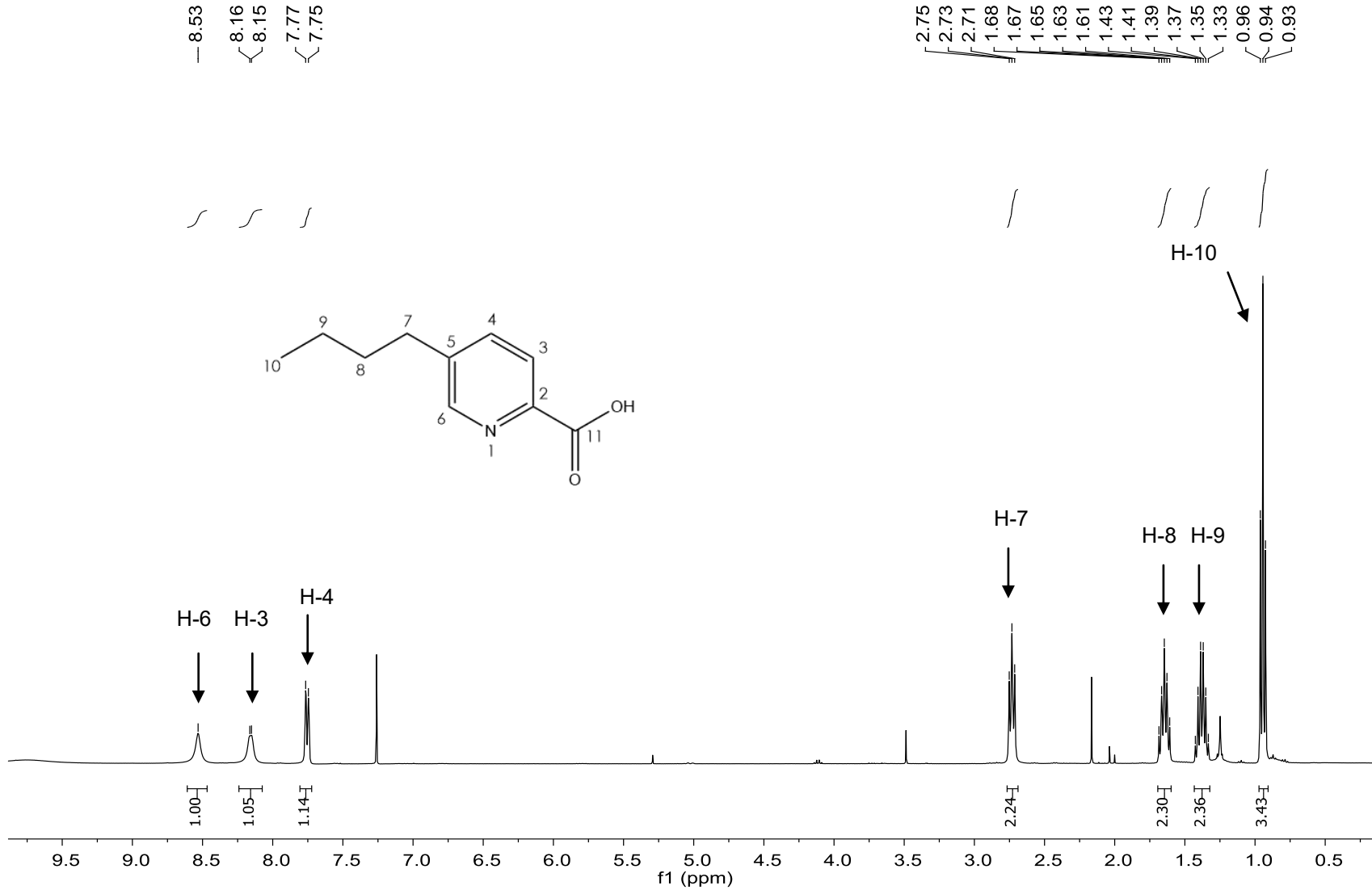


**Espectro 4.** RMN-DEPT-90 del ácido fusárico (9) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

# Anexo. Espectrometría y espectroscopía

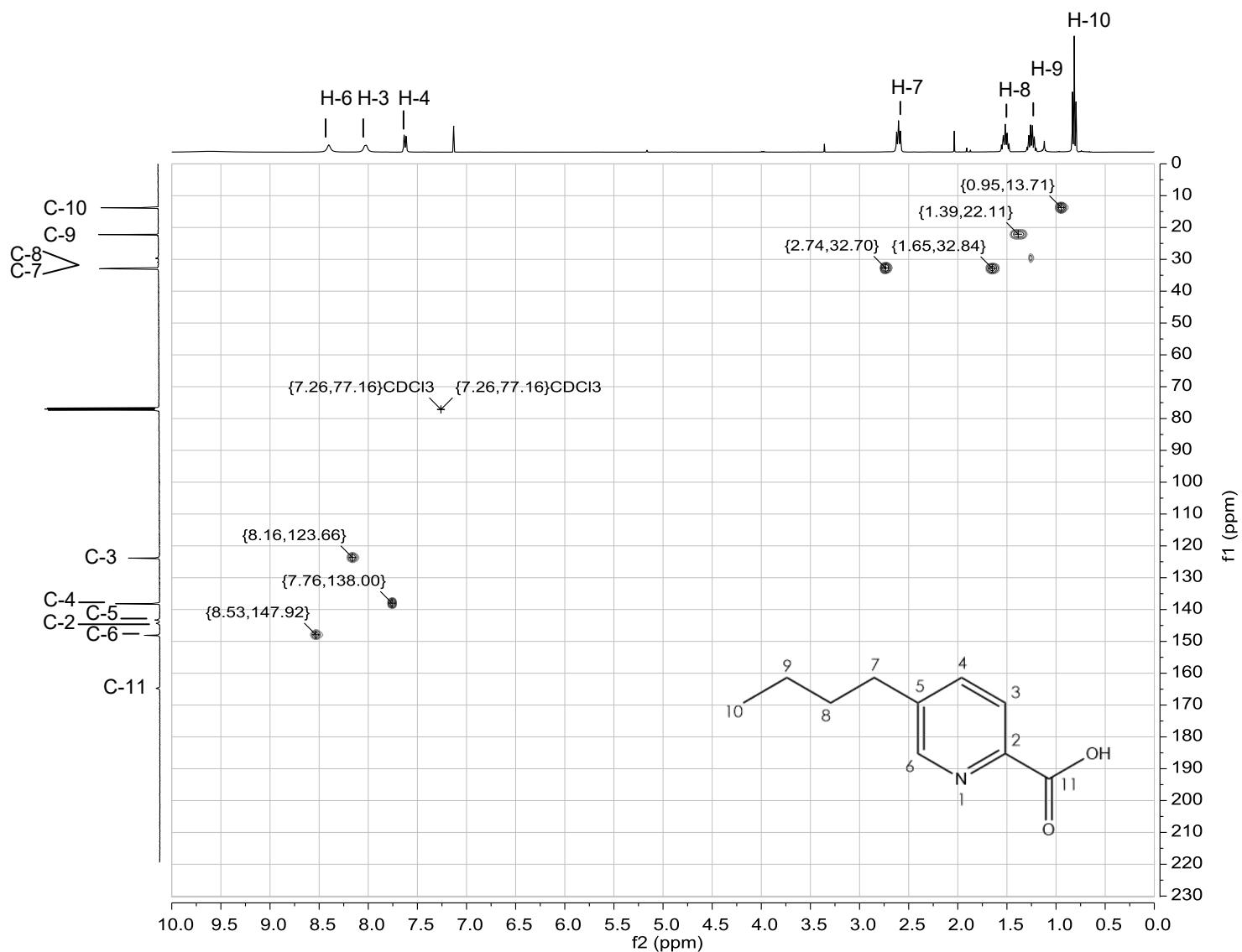


**Espectro 5.** RMN-DEPT-135 del ácido fusárico (9) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

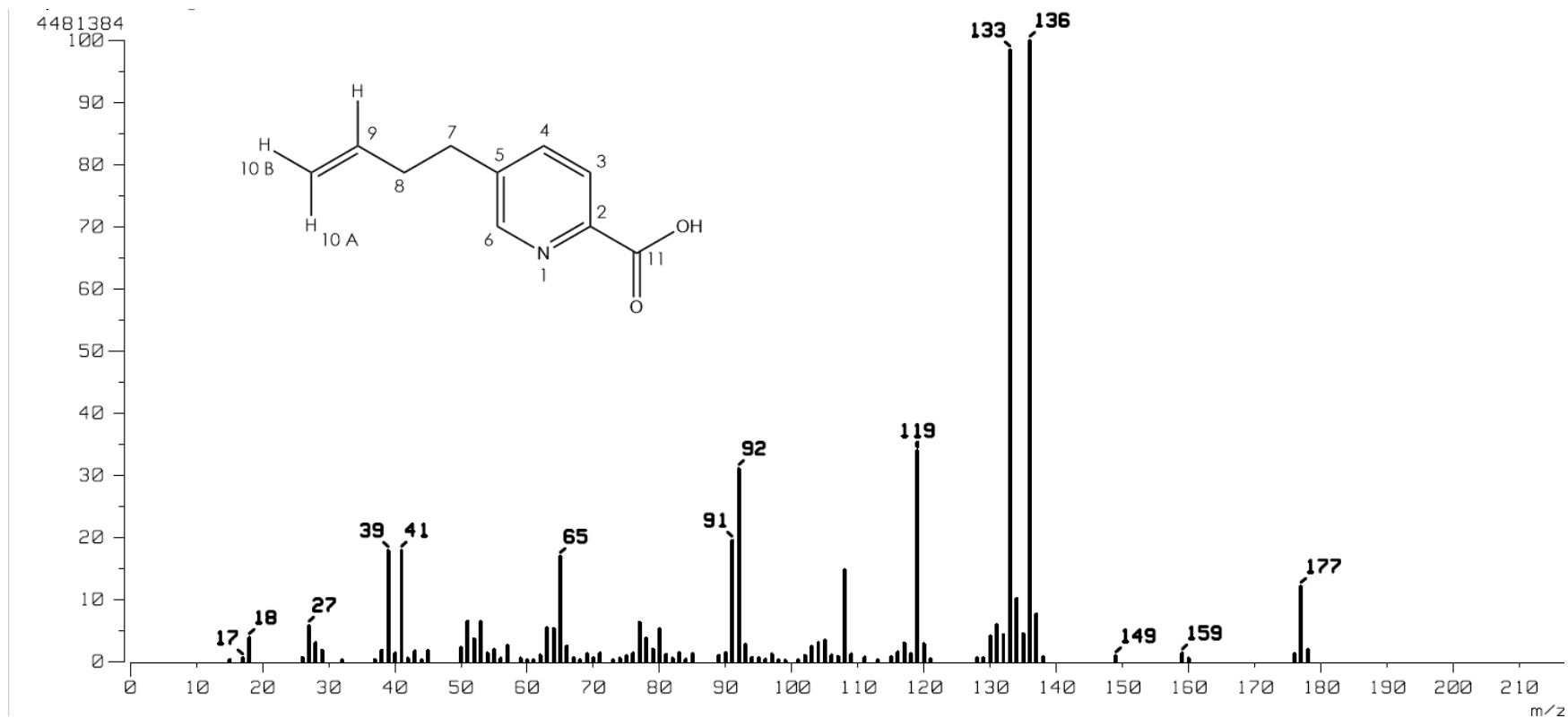


**Espectro 6.** RMN <sup>1</sup>H del ácido fusárico (9) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

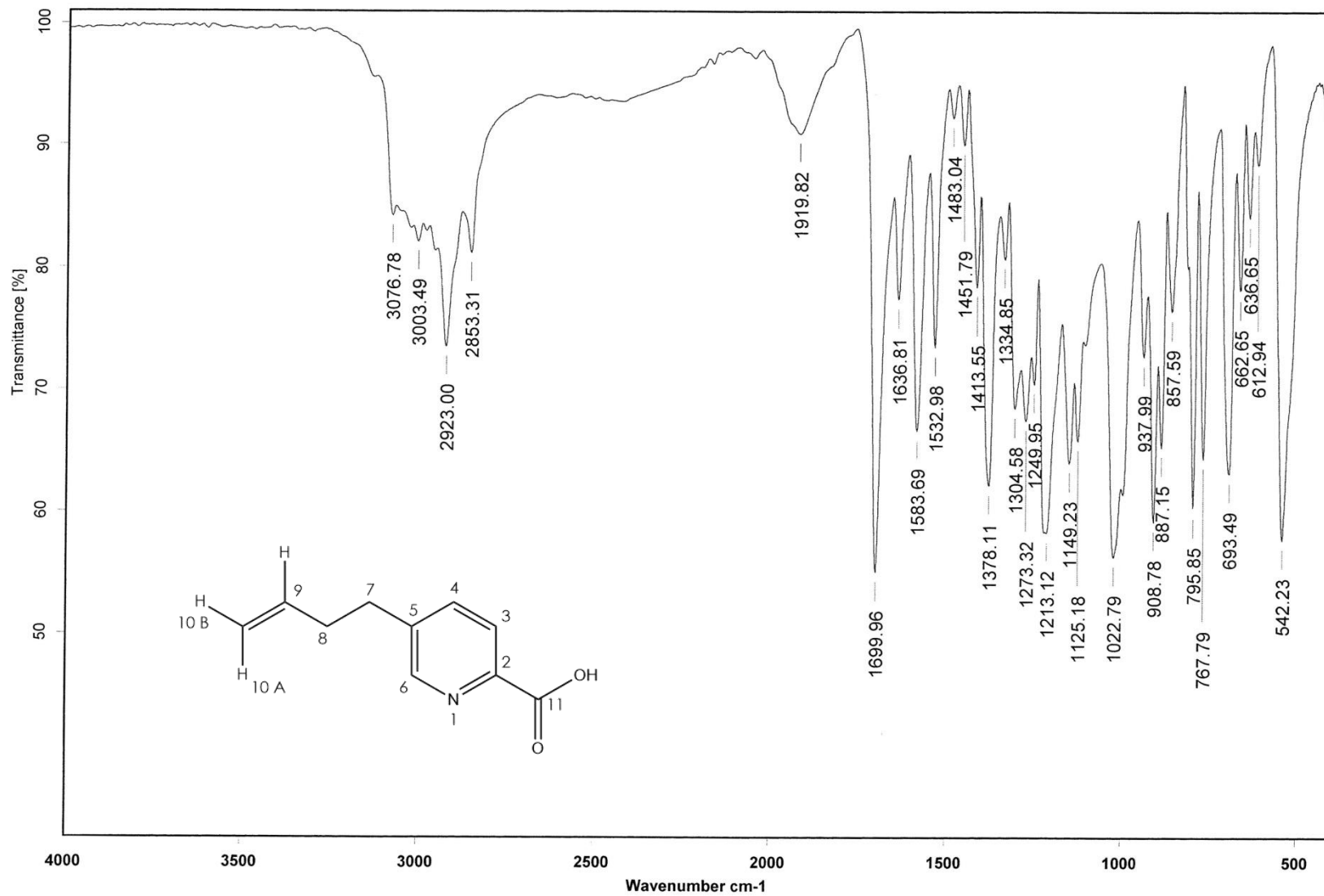




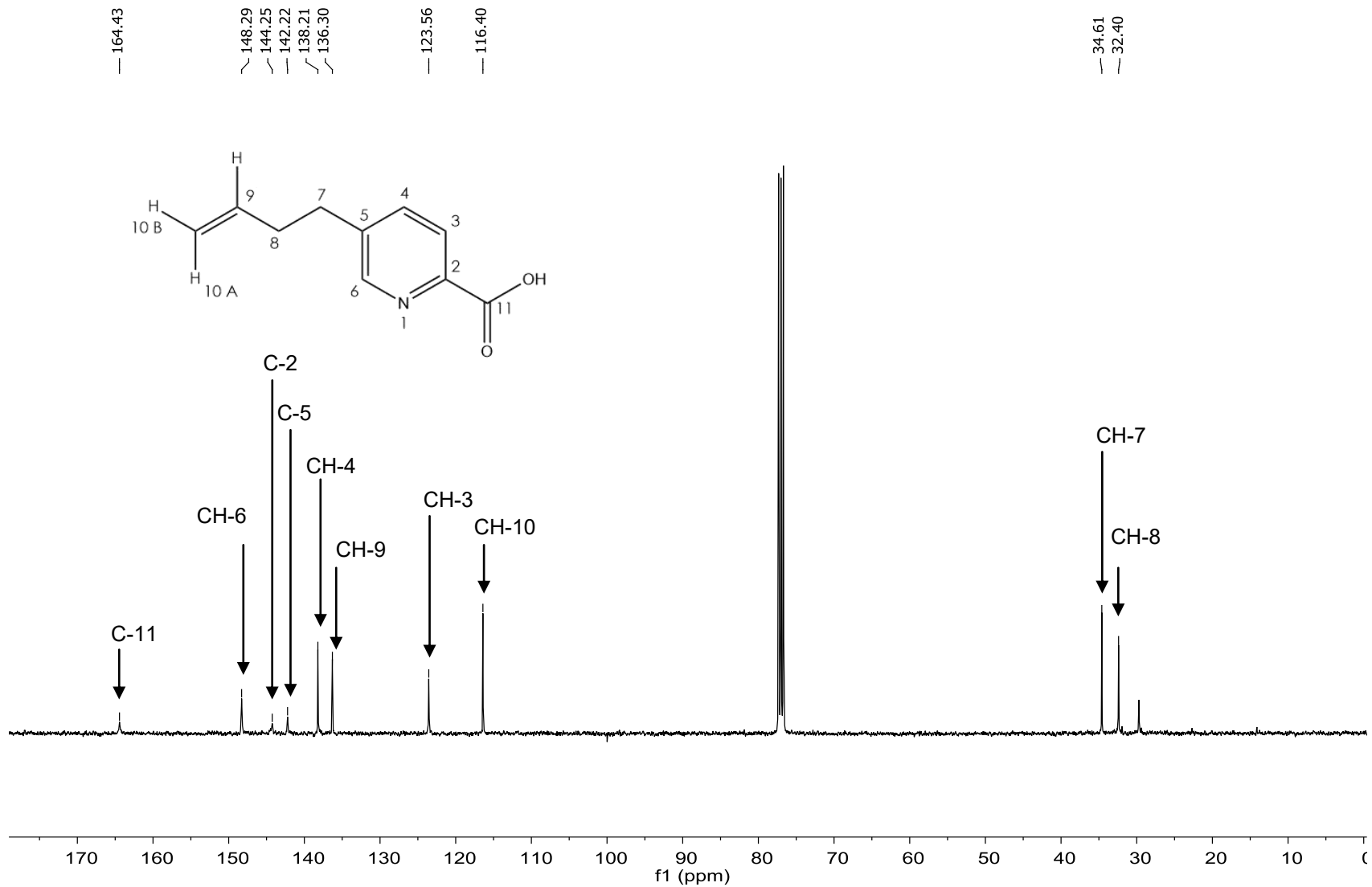
**Espectro 7.** Espectro HSQC del ácido fusárico (9) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

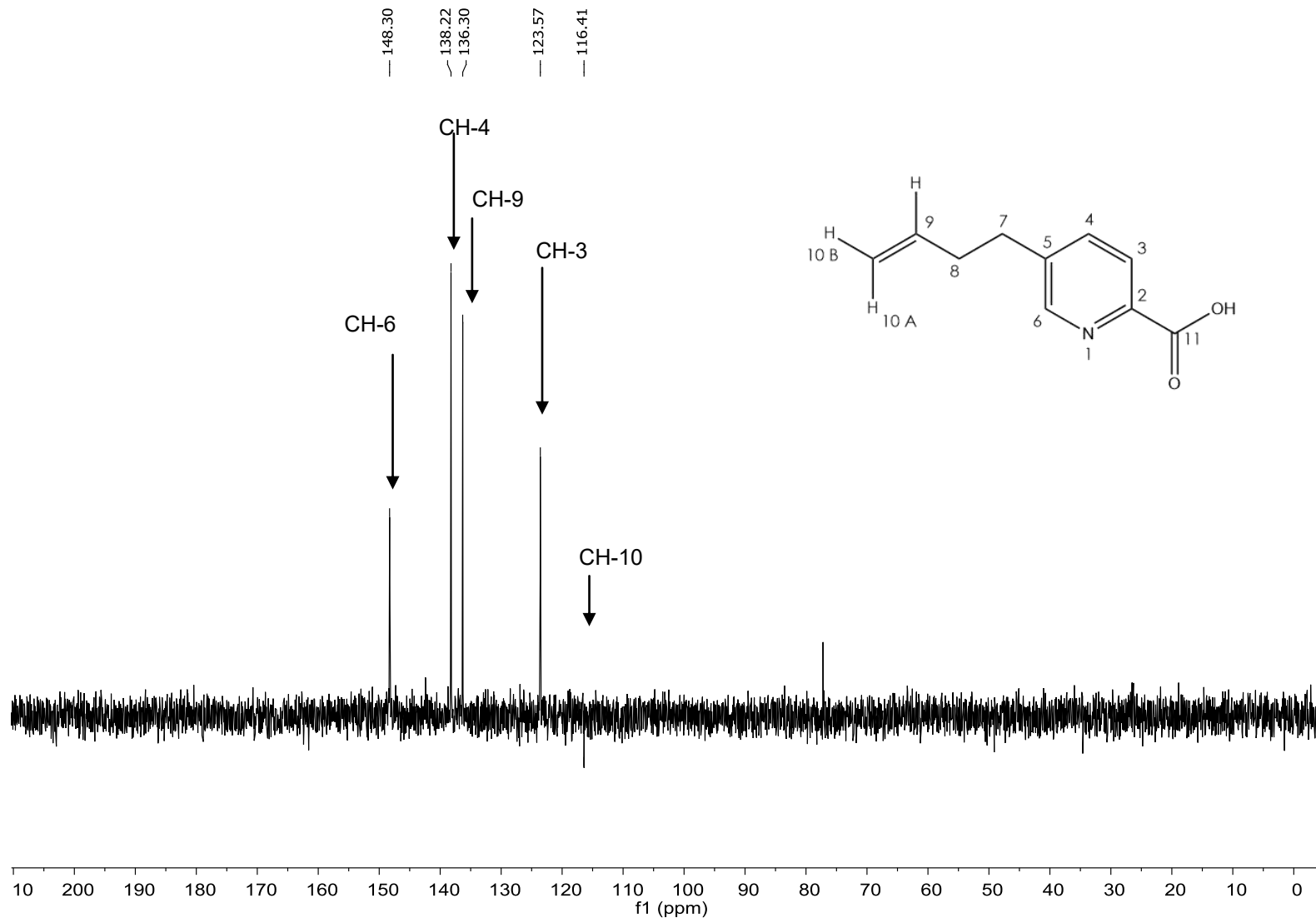


**Espectro 8.** Espectro de masas del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) obtenido por la técnica de impacto electrónico.

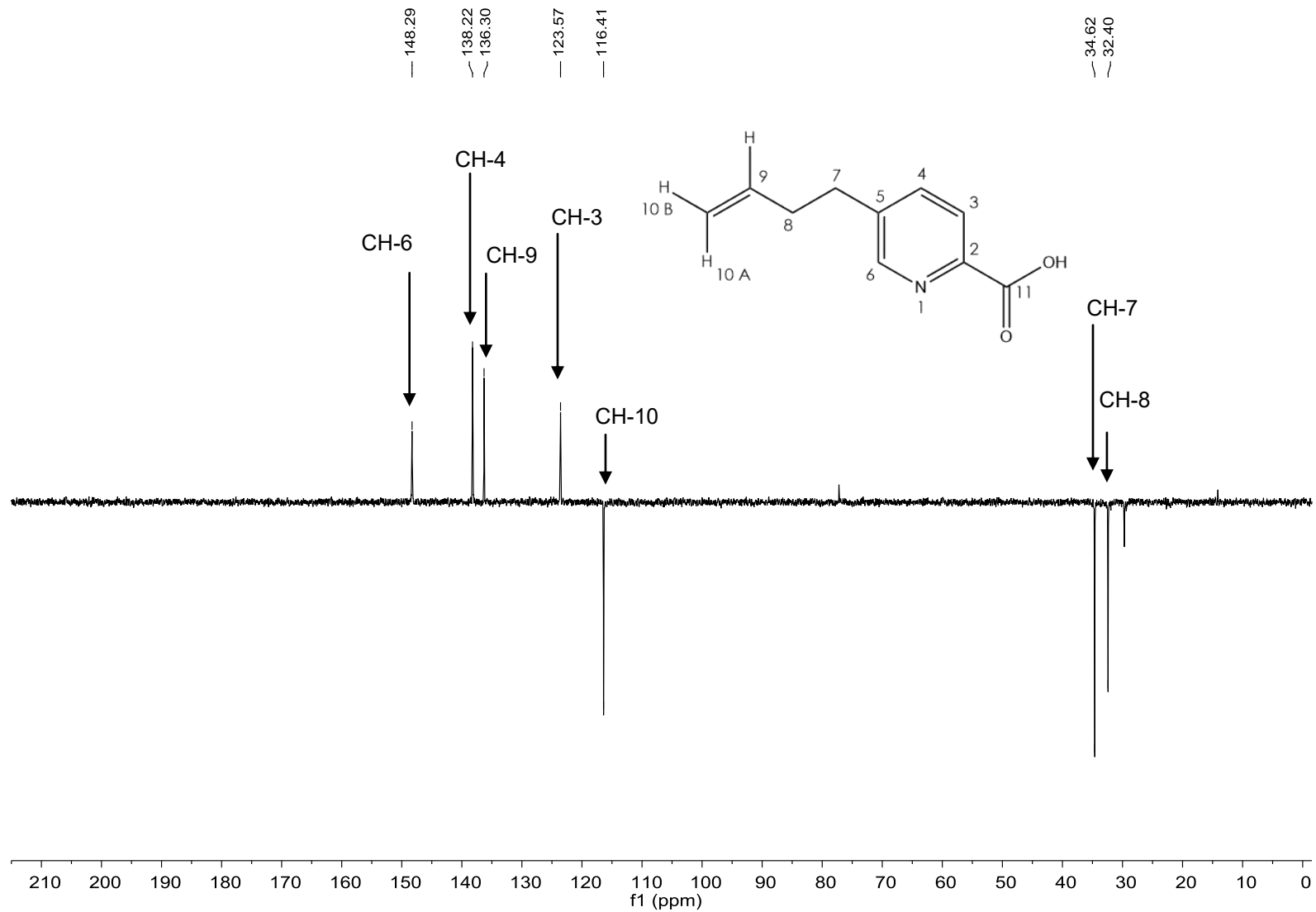


**Espectro 9.** Espectro en el IR del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**).



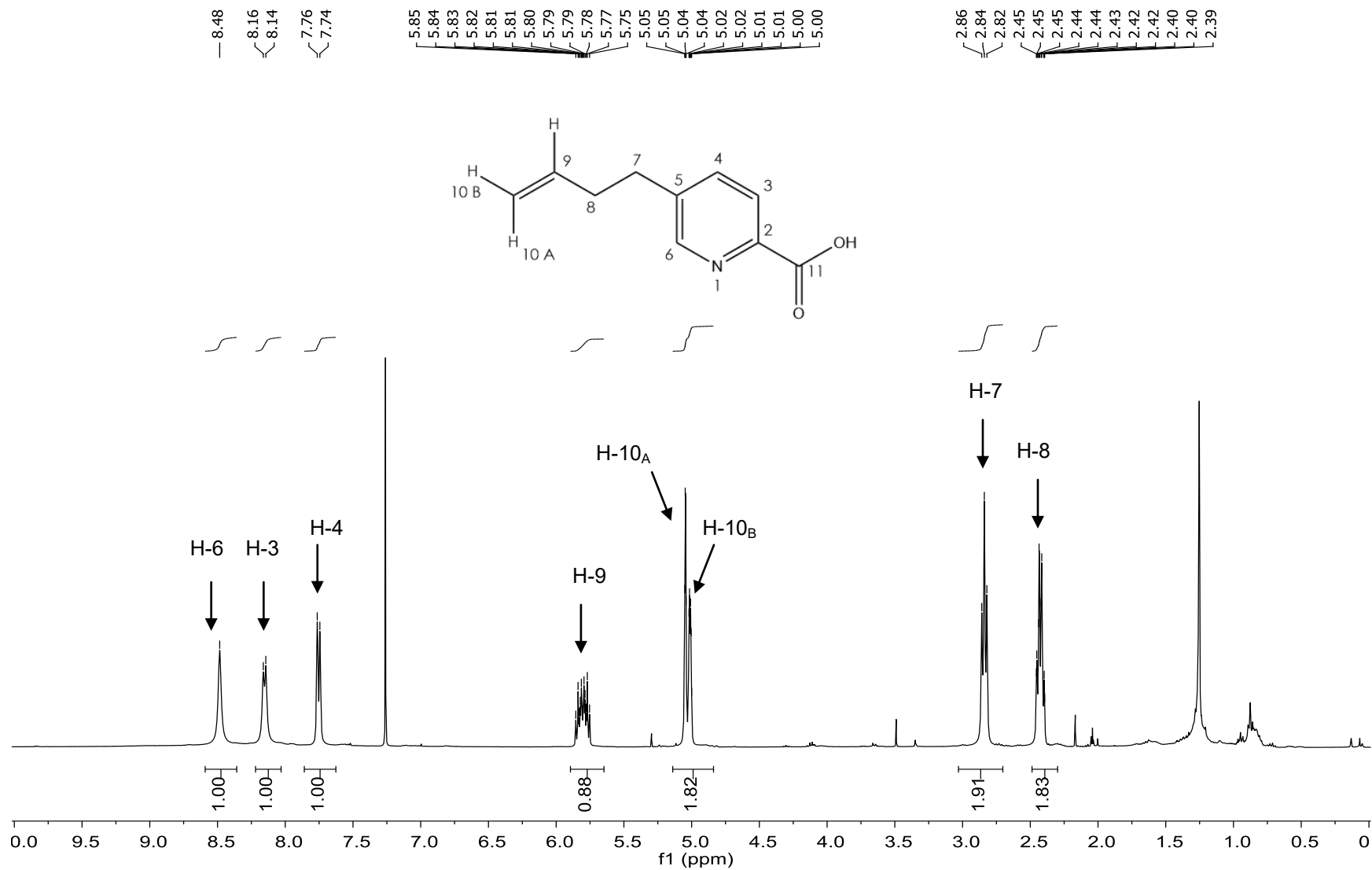


Espectro 11. RMN-DEPT-90 del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

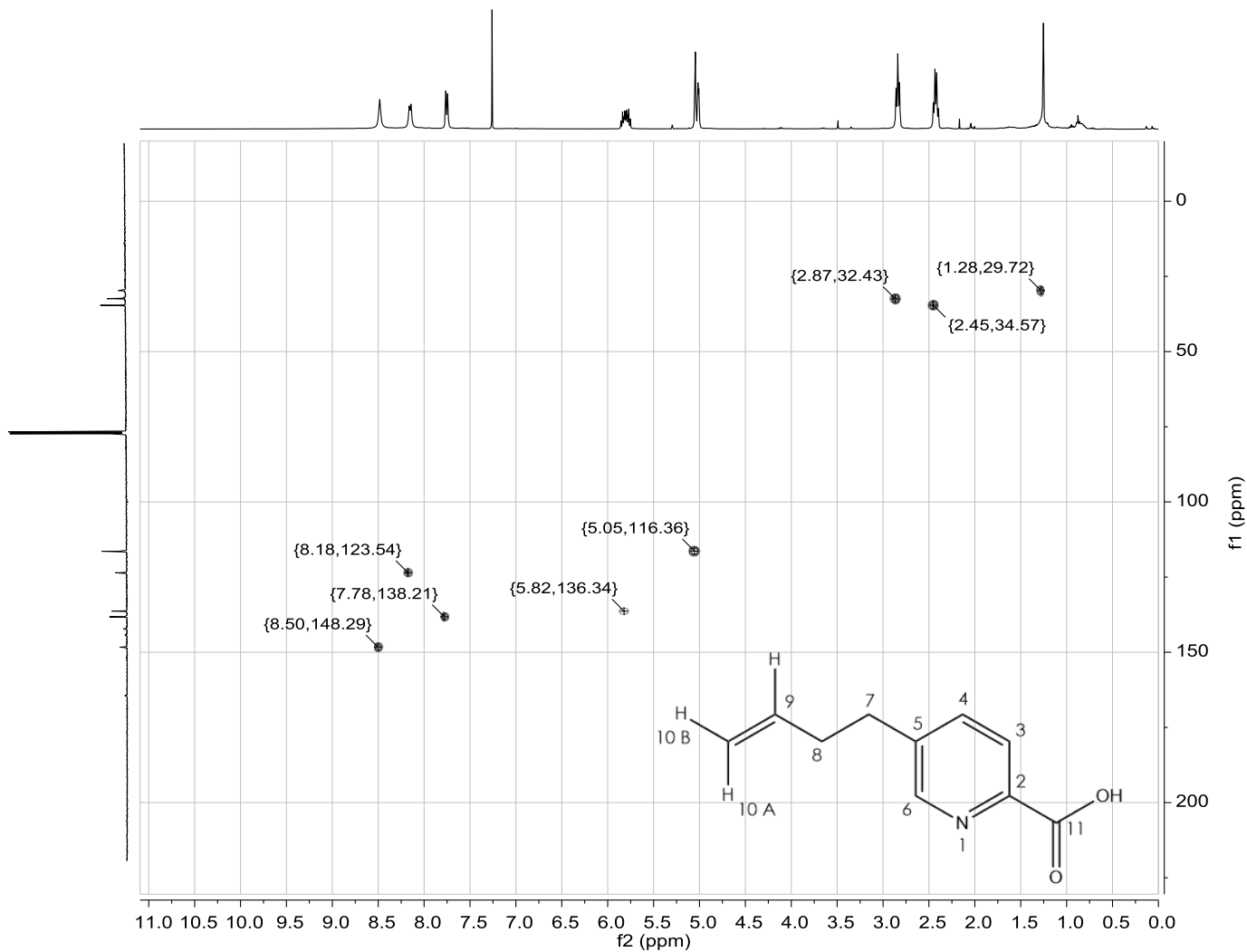


**Espectro 12.** RMN-DEPT-90 del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

# Anexo. Espectrometría y espectroscopía



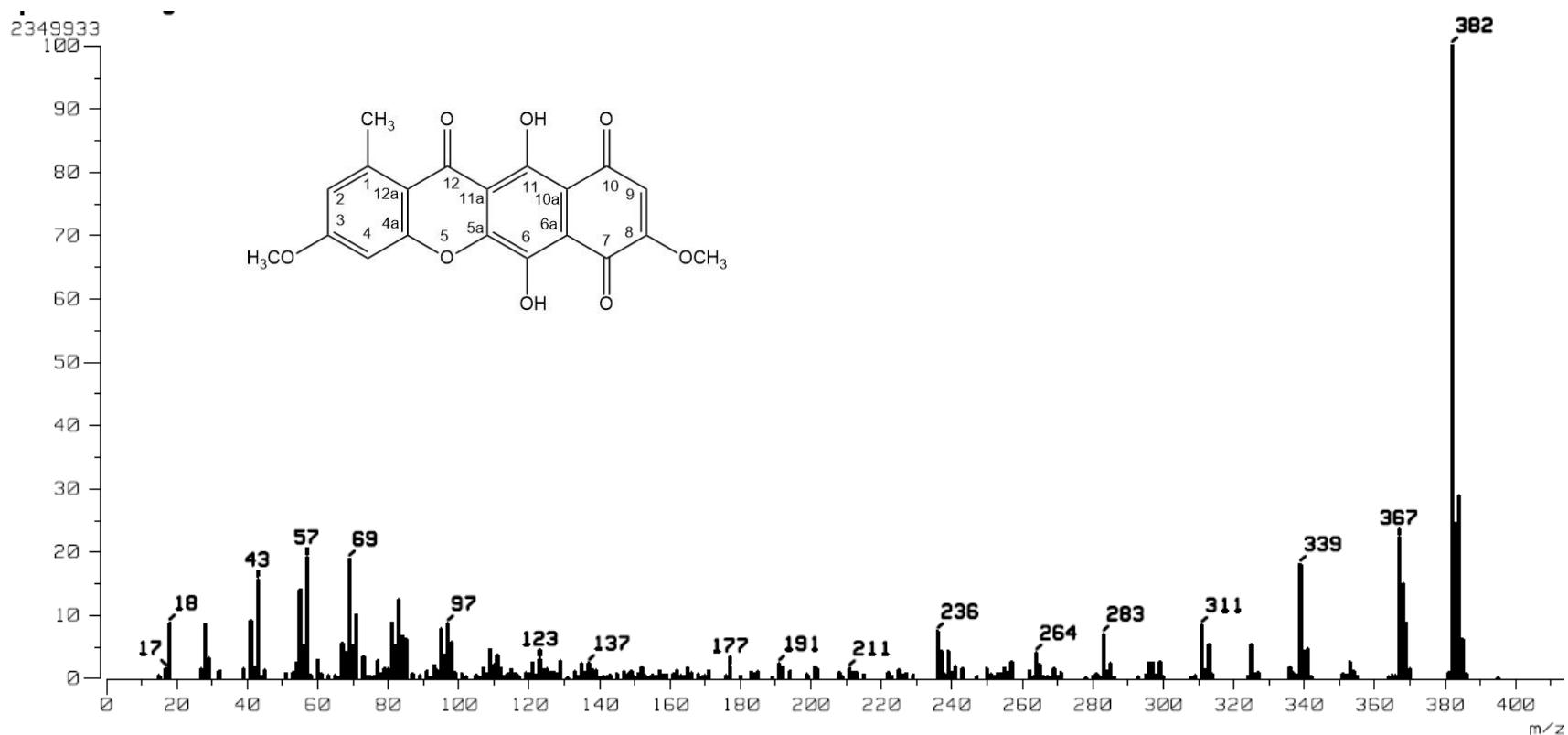
**Espectro 13.** RMN <sup>1</sup>H del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



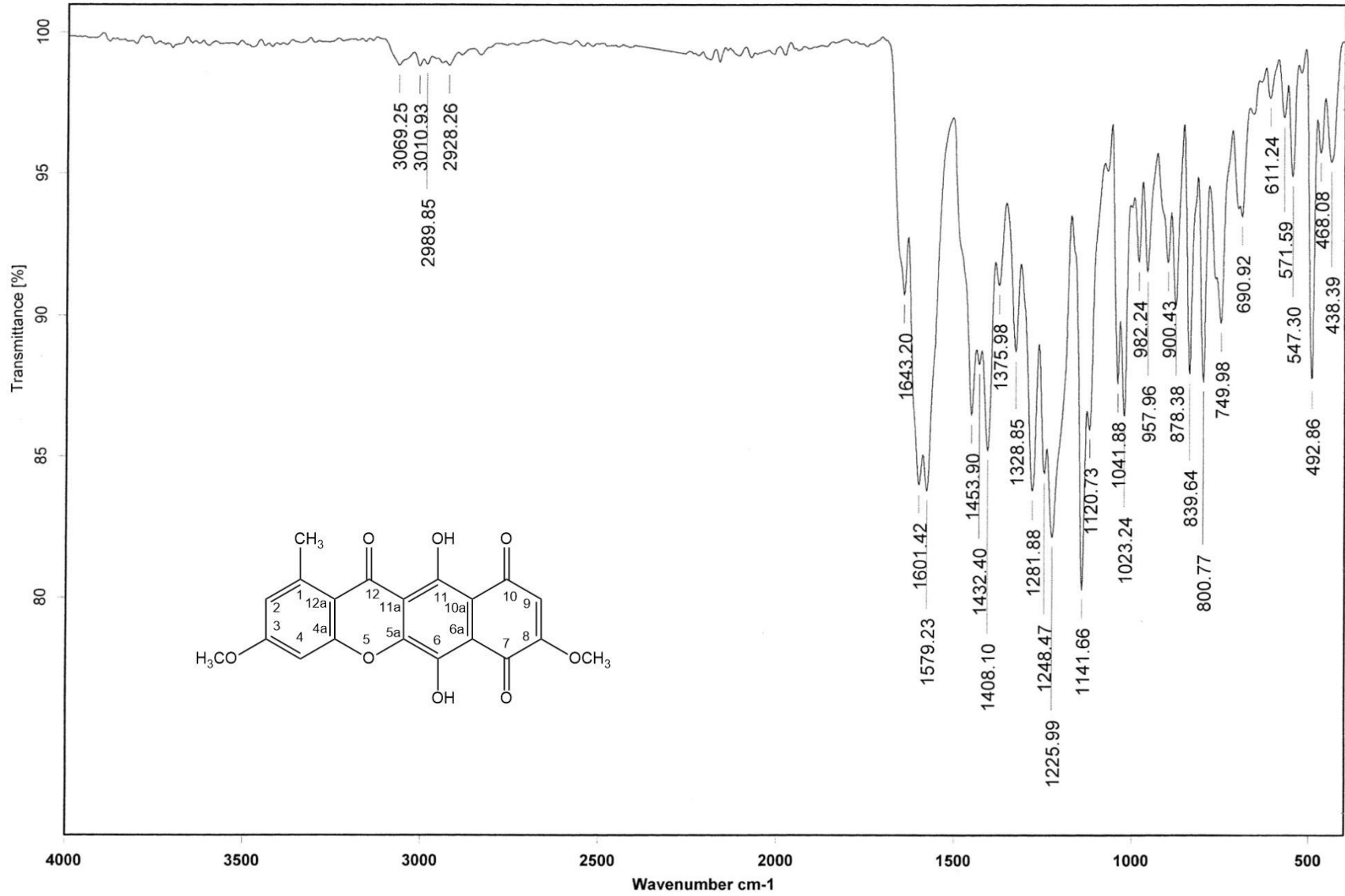
**Espectro 14.** Espectro HSQC del ácido 9,10-deshidrofusárico (**34**) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



## Anexo. Espectrometría y espectroscopía

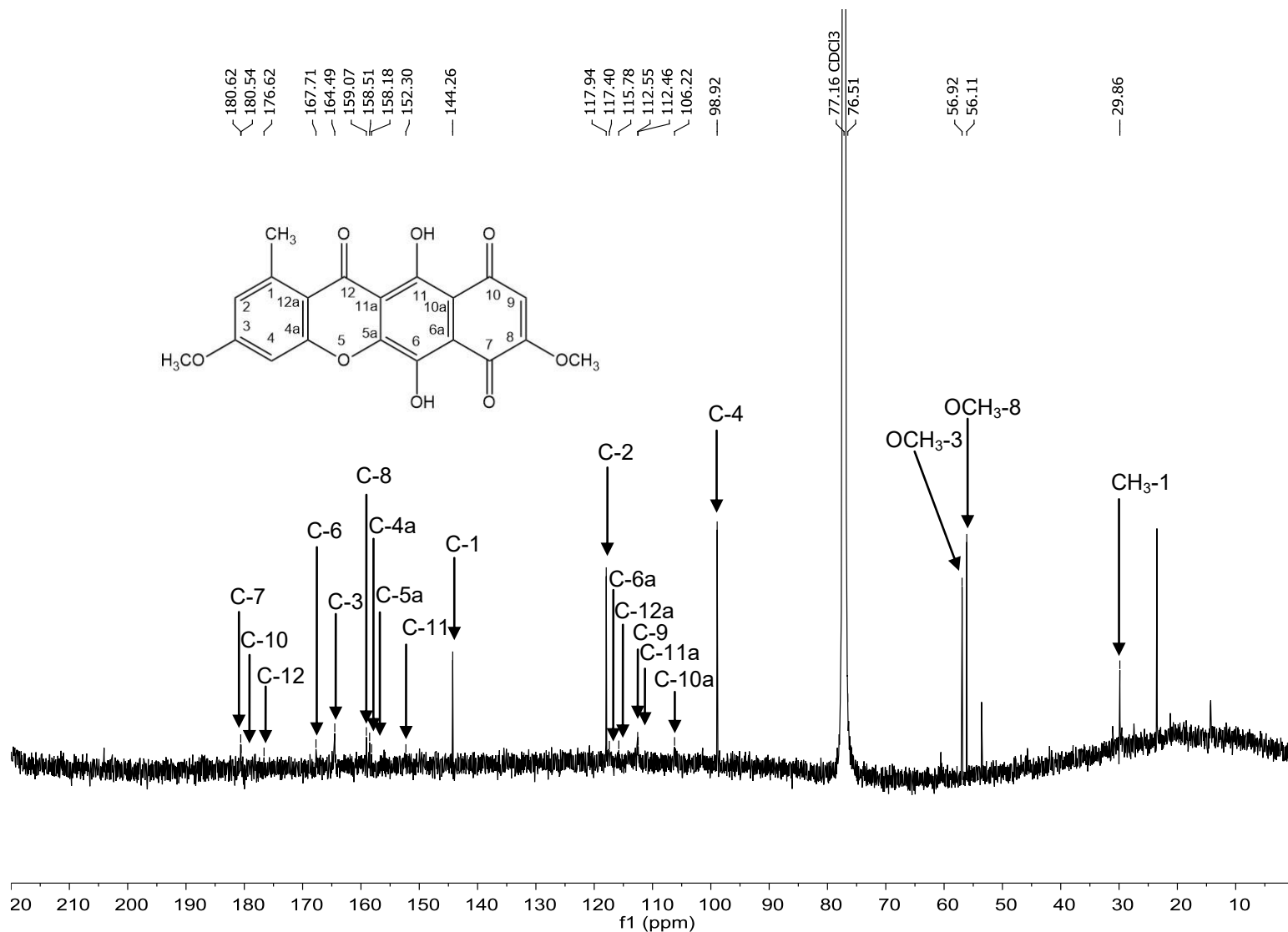


**Espectro 15.** Espectro de masas de la bikaverina (**35**) obtenido por la técnica de impacto electrónico.

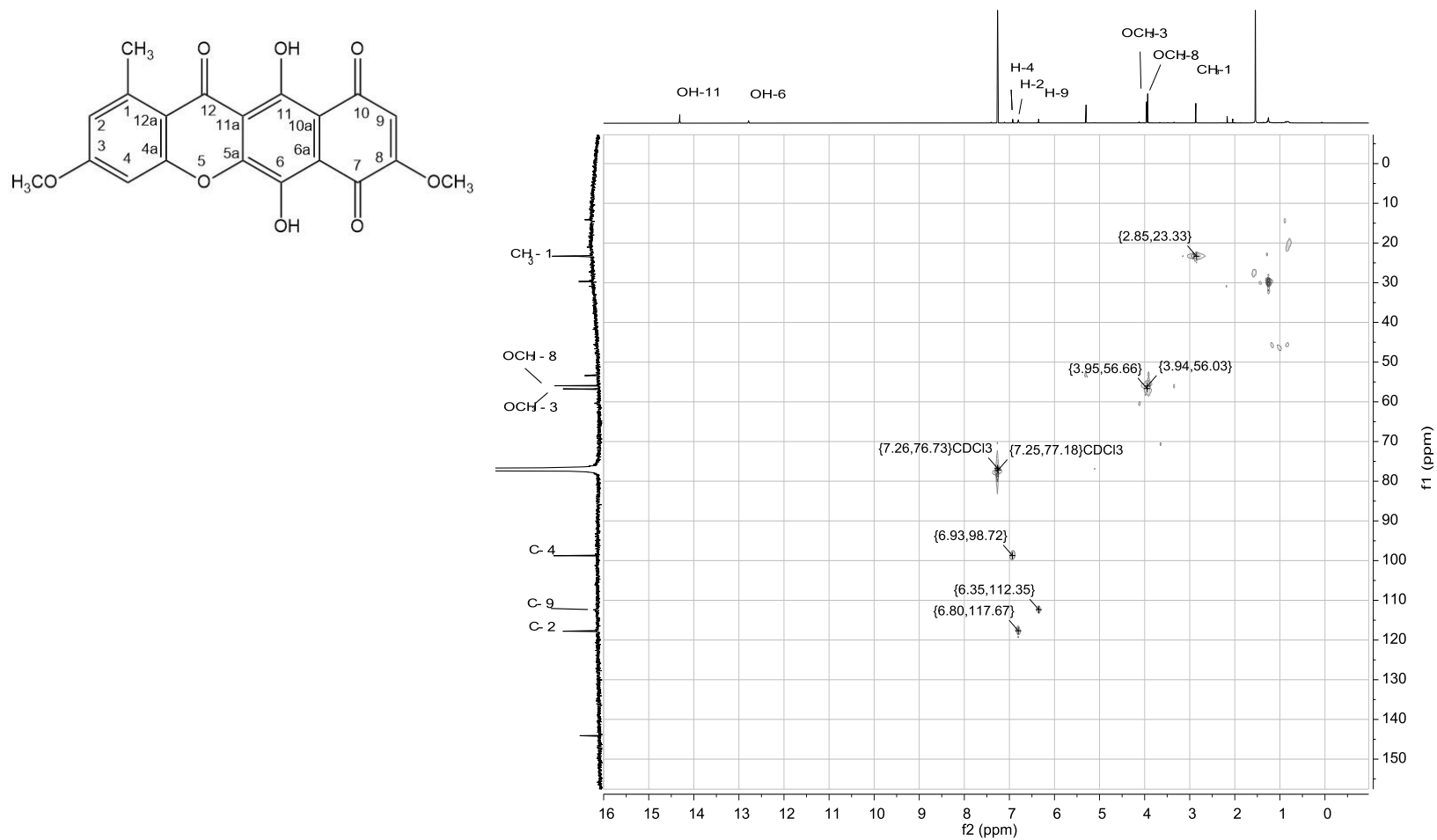


Espectro 16. Espectro en el IR de la bikaverina (35).

# Anexo. Espectrometría y espectroscopía

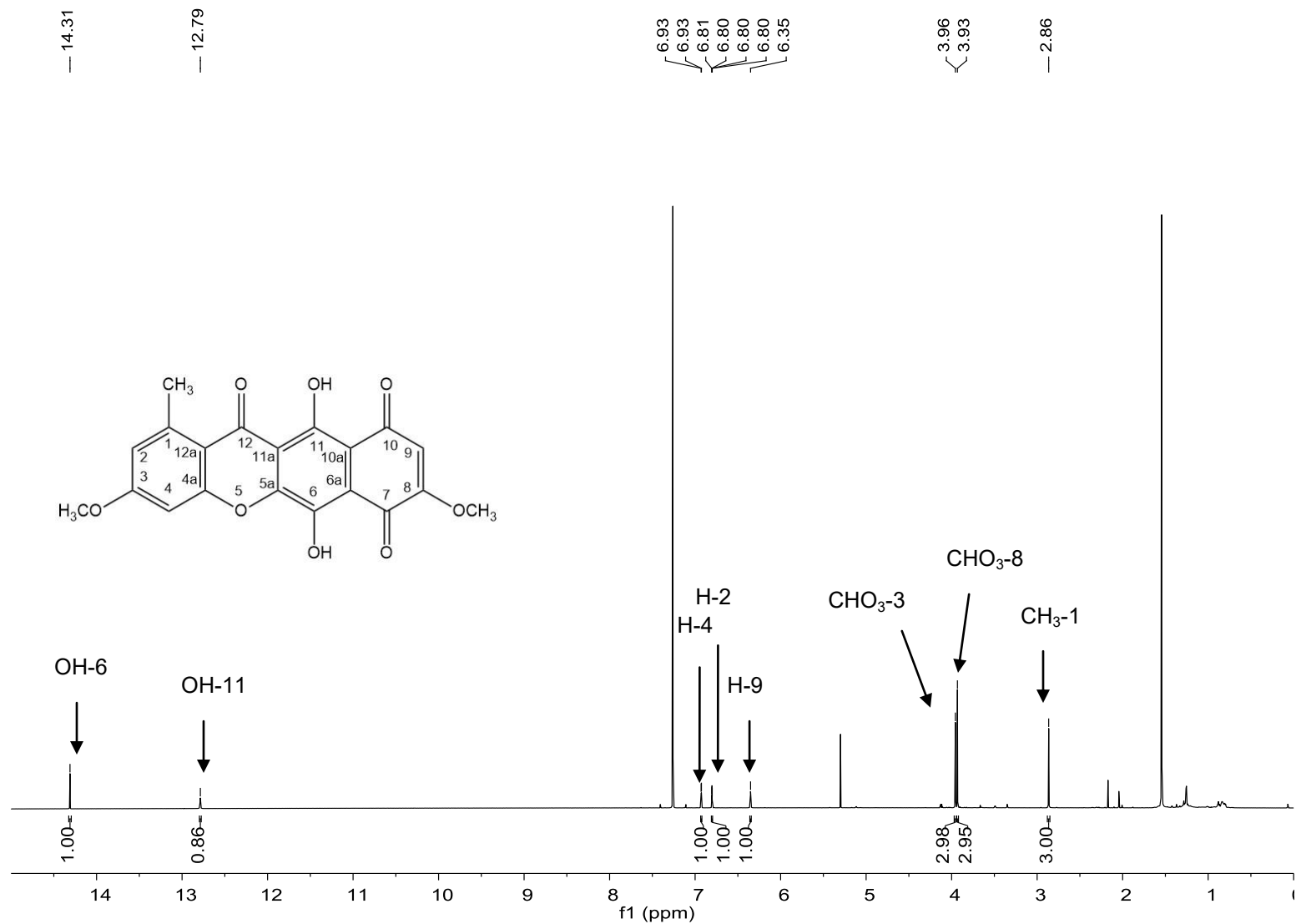


Espectro 17. RMN <sup>13</sup>C de la bikaverina (35) (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

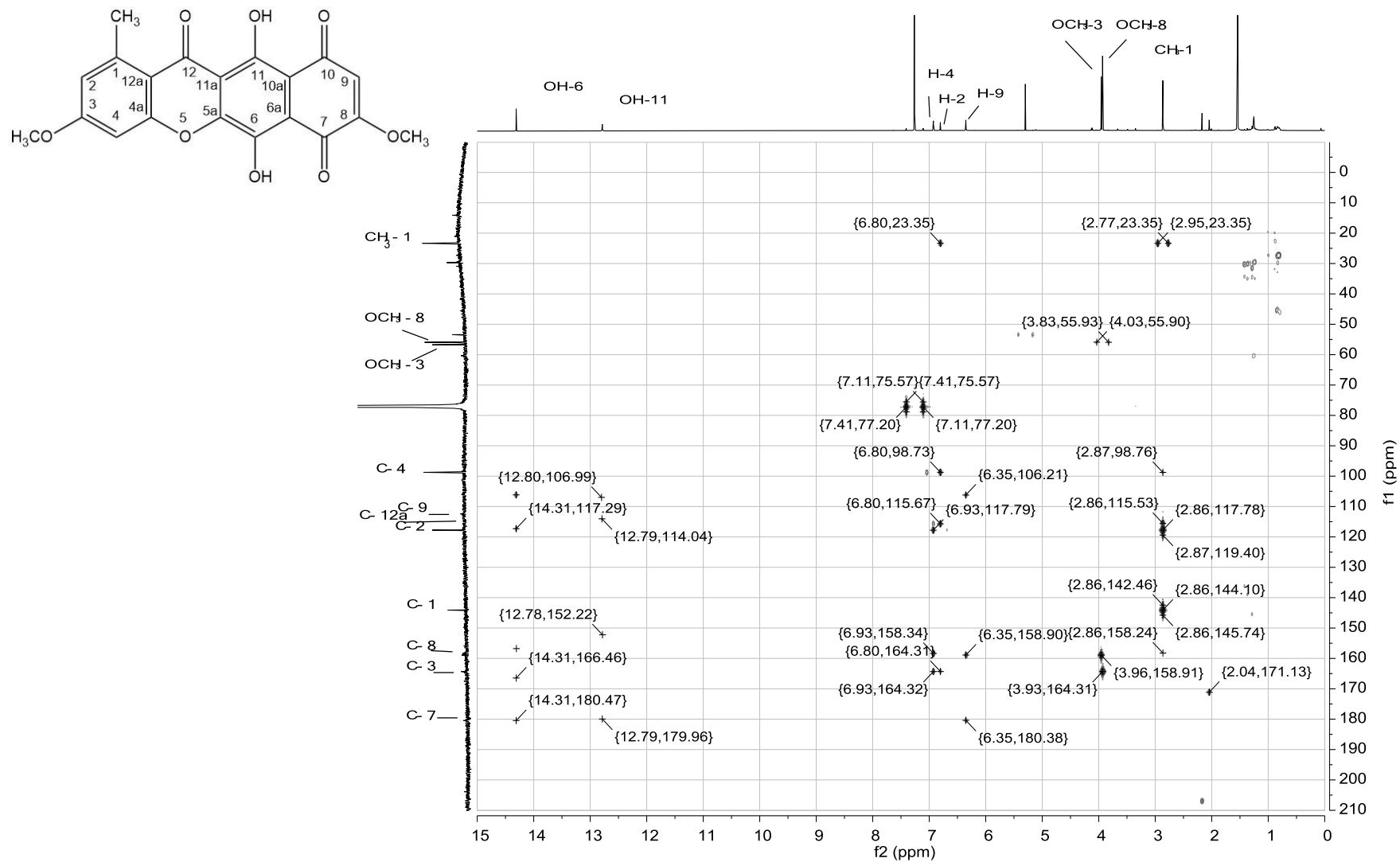


**Espectro 18.** Espectro HSQC editado de la bikaverina (**35**) (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>). CH y CH<sub>3</sub> se muestran en escala de grises.

# Anexo. Espectrometría y espectroscopía



**Espectro 19.** RMN <sup>1</sup>H de la bikaverina (**35**) (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Espectro 20.** Espectro HMBC de la bikaverina (**35**) (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>).