



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS METILÉNICOS DE HONGOS
ENDÓFITOS DE *Taxus globosa* Schltdt EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO
DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN LA
AGRICULTURA.**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA: OLIVERA RUIZ LIZBELIA YESENIA.

DIRECTORA: DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

COMISIÓN REVISORA:

DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA (REVISOR)

M. EN C. MINERVA DONAJÍ MÉNDEZ LÓPEZ (REVISOR)

M. EN C. AYMARA JUDITH DÍAZ BARRITA (VOCAL SUPLENTE)

OAXACA DE JUÁREZ, OAXACA

MARZO 2019

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	9
Capítulo I MARCO TEÓRICO	10
1. Evolución y coevolución en las plantas y los hongos	10
1.1 Definición de Endófito	10
1.2 Clasificación de endófitos	11
1.3 Concepto de extracto	13
1.3.1 Clasificación de los extractos	13
1.4 Ejemplos de metabolitos obtenidos a partir de la biodiversidad microbiana.	13
1.4.1 Mecanismos de acción de los metabolitos antifúngicos.	14
1.4.2. Metabolitos fúngicos de fitoprotección	16
1.5.1 Metodologías empleadas para la evaluación de metabolitos con interés en fitoprotección.	19
1.6 Importancia del control de los fitopatógenos en la Agricultura	21
1.6.1 Morfología de hongos fitopatógenos	22
1.6.2 Reproducción	22
1.6.3 Características de <i>Fusarium sp.</i>	23
1.6.3.1 Interacción <i>Fusarium sp.</i> –planta	23
1.6.3.2. Interacción de <i>Alternaria sp.</i> con la planta de tomate.	24
1.6.4 Características de <i>Pythium sp.</i>	24
Capítulo II: DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
2. Generalidades del estudio	26
2.1 Activación de las cepas endófitas de <i>Taxus globosa Schldt.</i>	27
2.2 Siembra en medio Líquido	27
2.3 Extracción por maceración	28
2.4 Aislamiento de los fitopatógenos	30
2.5 Determinación del inóculo por escala McFarland	32
2.6 Preparación de los extractos	33
2.7 Preparación de la Resazurina	33
2.7.1 Preparación del medio.	33
2.8 Pozos control.	33
2.8.1 Procedimiento de la prueba	34

Capítulo 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS	35
3.1 Identificación macro y microscópica de los fitopatógenos	35
3.2 Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos fúngicos en los fitopatógenos	36
3.3 Actividad biológica de los extractos fúngicos sobre <i>Alternaria sp.</i>	37
3.3. Actividad biológica de los extractos fúngicos sobre <i>Fusarium sp.</i>	38
3.4 Actividad biológica de los extractos fúngicos sobre <i>Pythium ultimum var. Ultimum</i>	39
3.5 Análisis Estadístico de la susceptibilidad de los fitopatógenos.	40
Capítulo 4 CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXO A: Composición de los medios.....	46
ANEXO B: Fórmula molecular del colorante Resazurina.....	47
ANEXO C: Clasificación taxonómica de los fitopatógenos estudiados.....	48
ANEXO D: Masa y volumen obtenidos del micelio y del filtrado de los 22 hongos endófitos.	49
ANEXO E: Peso de los Viales (obtenidos del caldo) antes y después de la eliminación completa del Cloruro de Metileno.....	50
ANEXO F: Peso de los Viales (obtenidos de la biomasa) antes y después de la eliminación completa del Cloruro de Metileno.....	51
ANEXO G: TABLA GUIA PARA REALIZAR LAS DILUCIONES DEL CALDO	52
ANEXO H: TABLA GUIA PARA REALIZAR LAS DILUCIONES DE LA BIOMASA	53
ANEXO I: PROPIEDADES Y USOS DEL FLUCONAZOL.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Diagrama de la metodología.....	26
Figura 2: Resiembra de las 22 cepas en medio líquido (PDB)	27
Figura 3 : Tratamiento posterior de los fases biomasa-caldo para la obtención de los metabolitos.....	28
Figura 4: Proceso de separación del solvente para la obtención de los metabolitos a partir del caldo.....	29
Figura 5: Obtención de los metabolitos secundarios a partir de la biomasa	30
Figura 6: Inducción de los fitopatógenos en hojas y raíces de tomate, mediante esporulación y aislamiento de la lesión	31
Figura 7: Distribución de la prueba en las microplacas de 96 pozos.	34
Figura 8: Observación macro y microscópica de los hongos fitopatógenos de estudio.....	34
Figura 9: Viraje de las placas en las pruebas de susceptibilidad de <i>Alternaria sp.</i>	36

Figura 10 : Concentraciones Mínimas Inhibitorias seleccionadas de las cepas positivas contra <i>Alternaria sp</i> después de 18 hrs de reacción.....	37
Figura 11: Viraje de las placas en las pruebas de susceptibilidad de <i>Fusarium sp</i>	38
Figura 12: Concentraciones Mínimas Inhibitorias seleccionadas de las cepas positivas contra <i>Fusarium sp</i> después de 18 hrs de reacción.....	38
Figura 13: Viraje de las placas en las pruebas de susceptibilidad de <i>Pythium ultimum var</i>	39
Figura 14: Concentraciones Mínimas Inhibitorias seleccionadas de las cepas positivas contra <i>Pythium ultimum var</i> después de 18 hrs de reacción.....	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Grupos y clases de hongos endófitos.....	11
Tabla 2 Antibióticos producidos a partir de microorganismos.....	16
Tabla 2: Métodos sugeridos por la CLSI para ensayos de susceptibilidad microbiana.....	18
Tabla 4: Recopilación de ensayos realizados con extractos fúngicos.....	20
Tabla 5: Porcentajes de inhibición asignadas a cada tonalidad de las placas con resazurina.....	36
Tabla 6 : Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo	40

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA:

Inicialmente a la Dra. Claudia, por aceptarme y confiar en mí para llevar a cabo esta tesis. Gracias por los consejos, las tareas, el material, sus palabras de aliento, a su paciencia, en fin; gracias por su generosidad.

Gracias a mis asesores, al doctor Medina, a la maestra Donají y a la maestra Aymara, por aceptar y tomarse el tiempo para llevar a cabo las correcciones y brindarme sus consejos para mejorar este trabajo.

Este espacio no suficiente para agradecer a cada una de las personas que me ayudaron a terminar este proyecto: Romi, Perla, dra Lucía, lme, Ale, a mis compañeras y amigas del laboratorio.

A todos que, de alguna manera, han hecho este trabajo posible, gracias!
¡Y bueno qué sería de la vida sin una motivación! Les dedico esta tesis a mis hermanas Lilian y Paola y a mi hermanito Michael.

Y al final y no menos importante: a mis padres gracias por su amor verdadero. Agradezco a mi papá Gerardo y a mi mamá Sofía que desde siempre han valorado mucho el estudio y formación, no midiendo esfuerzos y sacrificios para proporcionar mejores condiciones a nosotras sus hijas e hijo.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de cloruro de metileno de 22 cepas de hongos endófitos obtenidos de *Taxus globosa* Schldt contra tres tipos de hongos fitopatógenos: *Pythium ultimum* var. *ultimum*, *Fusarium spp* y *Alternaria spp*; responsables de grandes pérdidas económicas en cultivos de importancia agrícola.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad usando algunos de los estándares del CLSI (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio) con pequeñas modificaciones; adaptando la metodología M38-A para hongos filamentosos. En este ensayo REMA (ensayo de microtitulación con Resazurina); los extractos diluidos más el medio RPMI-1640 conteniendo a las esporas de los fitopatógenos y la Resazurina al 0.002% fueron adicionadas a los pozos de las microplacas. El cambio de color fue leído después de 18 a 24 h de incubación. Se usaron las instalaciones del Laboratorio de Control ambiental del Instituto Tecnológico de Oaxaca en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular de la UABJO.

Los extractos que presentaron actividad antifúngica importante frente a *Fusarium sp*, fueron KG09, KG10, KG21, CT25, KG36, KG44, KG47, KG56, KG61, KG62, KG72, KG73, KG74 y KG76. Contra *Alternaria sp* presentaron actividad las cepas: KG47, KG61, KG73, KG74 y KG76 estas cuatro cepas alcanzaron un color rosa pálido transparente. Y contra *Pythium ultimum* var. *ultimum* las cepas KG10, KG12, KG14, KG17, KG21, KG47, KG48, KG72, KG 73, KG74 y KG76.

Los extractos más efectivos fueron las provenientes del filtrado-caldo, las concentraciones mínimas inhibitorias al ser menores de 100 µg/µl demostraron que la actividad fungicida fue buena, y el hongo más sensible a los extractos fue *Fusarium sp*, seguido de *Pythium ultimum* var. *ultimum*, y al final *Fusarium sp*.

INTRODUCCIÓN

Son ampliamente conocidas las restricciones de organismos internacionales que dictaminan a ciertos fungicidas sintéticos, pues su uso inadecuado tanto en número de aplicaciones y dosificación ha provocado efectos devastadores al acumularse como contaminantes que afectan al suelo, agua y productos agrícolas. Además, han dado lugar a la aparición de microorganismos altamente resistentes que conducen a enfermedades fúngicas con mayor incidencia que antes. Para reducir este problema, existe la necesidad de buscar y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos y animales.

Partiendo de este conocimiento, se ha hecho hincapié en la obtención de nuevas formas para combatir a los microorganismos fitopatógenos, mediante compuestos obtenidos a partir de los hongos endófitos, que son ampliamente distribuidos a lo largo de la gran diversidad existente entre las especies de plantas y microorganismos que habitan en conjunto. Los hongos endófitos de plantas son microorganismos fúngicos los cuales pasan toda o parte de su ciclo de vida colonizando inter o intracelularmente tejidos sanos de la planta hospedera, típicamente no causan síntomas de enfermedad (Strobel, 2003).

Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su planta hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina. (Elvira Sánchez-Fernández *et al.*, 2013)

Debido a la amplia variedad botánica existente en Oaxaca y en México, existe todavía un campo amplio que necesita ser estudiado, pues solo el 5 % de las plantas han sido estudiadas junto con sus respectivos metabolitos (Moreno Perez *et al.*, 2016), este trabajo se enfocó en el potencial fungicida agrícola de la especie *Taxus globosa* pero anteriormente se han hecho estudios referentes al campo de la farmacología con las mismas 22 cepas.

Los extractos que se han estudiado ampliamente son los llamados aceites esenciales de plantas; usando los solventes más comunes, pero uno de los inconvenientes que existen al hacer este tipo de extracción es que se debe de acabar con la vida de la planta pues se trabaja de manera directa con ésta, en cambio con los extractos fúngicos, se está trabajando con microorganismos que tienen la capacidad de reproducirse fácil y rápidamente sin que exista la necesidad de esperar a que la planta esté en su etapa de madurez y tener que sacrificarla. De ahí la gran importancia de trabajar con estos microorganismos que viven como endófitos en la planta.

El método de microdilución colorimétrica en microplaca con Resazurina que se eligió para realizar las pruebas fue el más conveniente debido a su: rapidez, bajo costo, facilidad de implementación y con resultados rápidos, además de que se trabajaron con las muestras de extractos fúngicos, las cuales son muy pequeñas y difíciles de manipular. El método incorporó un indicador redox en el medio de cultivo con los fitopatógenos, que cambió de color cuando no existió crecimiento fúngico en el pocillo, el cual facilitó la lectura visual. Sin necesidad de haber leído espectrofotométricamente.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el potencial antifúngico de extractos metélicos obtenidos del *Taxus globosa* *Schldt* en tres hongos fitopatógenos.

Objetivos específicos:

1. Determinar cuál de las dos fuentes de extractos fúngicos es más efectiva a la misma concentración: la proveniente de la biomasa o la obtenida del caldo.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) a partir del caldo y biomasa de los extractos fúngicos, mediante el método de microdilución con Resazurina.
3. Determinar cuál es el fitopatogeno más sensible a los extractos fúngicos.

Capítulo I MARCO TEÓRICO

1. Evolución y coevolución en las plantas y los hongos

Sin duda el grupo más numeroso de fitopatógenos lo constituyen los hongos, los que posiblemente aparecieron antes que las plantas en la tierra y durante su proceso evolutivo se relacionaron con todos los demás grupos de seres vivos (Pirozynski y Hawksworth, 1988). En el caso particular de las plantas superiores se establecieron relaciones dinámicas de simbiosis, comensalismo y parasitismo y su influencia mutua fue enorme. De acuerdo a Alarcón *et al.* (2006) en el 85 % de las especies vegetales los hongos micorrízicos han sido factores determinantes en su evolución y en cuanto a los hongos fitopatógenos prácticamente no existe una especie vegetal que no sea parasitada por lo menos por un hongo y existen algunas que son hospederos de varias decenas de hongos.

Existen antecedentes paleobotánicos de la presencia de hongos fitopatógenos desde hace alrededor de 400 millones de años (Swain, 1978) y las micorrizas también datan de esa época: periodo Silúrico–Devónico (Alarcón *et al.*, 2006). De los primeros estudios de la interacción genética planta–patógeno surgió la teoría gen a gen en el patosistema lino–roya en donde después de estudiar la herencia de la resistencia, se llegó a la conclusión de que por cada gen de resistencia en el hospedero existe un gen de virulencia en el patógeno y que el equilibrio entre ambos tipos de genes permite la relación permanente entre el lino y el hongo causante de la roya (Flor, 1947). Cada especie vegetal al tener una presión de selección de diferentes patógenos diversifica sus formas de defensa contra ellos. (Montes-Belmont, 1995)

1.1 Definición de Endófito

La palabra “endófito” etimológicamente significa “dentro de la planta” (*endon*: dentro, *phyton*: planta). En un principio, el término endófito se refería a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas, pero en 1995 se restringió el término únicamente a microorganismos, refiriéndose sólo a bacterias y a hongos que no provocan daño aparente a la planta hospedera. Actualmente, este término se refiere a bacterias,

hongos, algas e insectos, en donde los hongos son los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia como endófitos.

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente. Los hongos endófitos se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares), desde las que habitan en el ártico hasta los trópicos, así como en los campos agrícolas. De todos los ecosistemas del Planeta Tierra, los bosques templados y tropicales presentan una gran biodiversidad de plantas y éstas parecen albergar también una cantidad significativa de hongos endófitos. Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina. (Elvira Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

1.2 Clasificación de endófitos

Los hongos endófitos son un grupo muy diverso y polifilético que habitan en diversas partes de las plantas. La mayoría pertenecen al *phylum* Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota.

Históricamente los hongos endófitos se han clasificado en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida, algunos científicos los clasifican tomando en cuenta su taxonomía, sus plantas hospederas, su evolución y sus funciones ecológicas. A continuación se clasifica de manera más detallada en la tabla 1: En esta clasificación se conservan los grupos Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, y este último se divide en tres clases;

Tabla 3: Grupos y clases de hongos endófitos

CRITERIO	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
	(clavicipitáceos)	No Clavicipitáceos		
Rango de hospederos	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Tallo y rizomas	Tallos, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores y frutos	Raíces
Función ecológica	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros.	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés biótico y abiótico y protegen contra los hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios,	Inducen resistencia a las enfermedades, protección contra los herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de los metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros
Transmisión *	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Colonización en planta	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva

***transmisión de hongos endófitos en las plantas: vertical, a través de las semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente.**

Fuente:(Juarez-Becerra, Sosa-Morales, & Lopez-Malo, 2010)

Los Clavicipitáceos son los endófitos que colonizan los pastos, mientras que los no Clavicipitáceos colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas. Existen diversos estudios relativos a los hongos endófitos de las zonas templadas, no obstante, la información sobre los endófitos de zonas tropicales aún representa un objeto potencial de estudio, ya que se tiene información muy limitada al respecto. Asimismo, se conoce relativamente poco de la naturaleza de la interacción entre las plantas leñosas y sus endófitos foliares, a pesar de su abundancia y gran diversidad, particularmente en regiones tropicales, donde se ha planteado que cada hoja representa un mosaico de diversas especies de hongos endófitos. Dreyfuss y colaboradores estimaron que debe haber aproximadamente 1.3 millones de especies de hongos endófitos por descubrir.

1.3 Concepto de extracto

El extracto es toda aquella materia proveniente de una planta y que ha pasado por un proceso de disminución de partícula, maceración en frío, separación mediante presión baja y extracción usando cualquier solvente polar como: metanol o éter y que al final es una mezcla de sustancias activas (metabolitos) presentes en la planta que presenta consistencia hidrófoba. Constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad de una planta.

1.3.1 Clasificación de los extractos

De acuerdo a su consistencia: Blandos, firmes, secos y fluidos (insolubles), dependiendo del solvente que se ha utilizado: Alcoholes, cetonas, alcanos, etc.

Los solventes más ampliamente usados en investigaciones de actividad antimicrobiana en plantas son el metanol, etanol y agua. Se ha encontrado que los extractos vegetales con solventes orgánicos proporcionan mejor actividad antimicrobiana comparada con los extractos acuosos. Dependiendo de su procedencia: vegetal (procedente de cualquier parte de la planta) o de microorganismos, como en este ensayo.

1.4 Ejemplos de metabolitos obtenidos a partir de la biodiversidad microbiana.

Los microorganismos son una gran fuente de recursos biotecnológicos porque tanto bacterias como hongos poseen una maquinaria enzimática y una composición genética y fisiológica diversa. Hawksworth y Rossman (1987) estiman , que existe al menos 1,5 millones de hongos en nuestro planeta, con un 25 % de especies identificadas representado a 250 000, pero en años recientes el número de especies identificadas ha incrementado, especialmente con el hallazgo de los hongos endófitos, con aproximadamente un millón de especies, reflejando la diversidad de este grupo de organismos asombrosos y extremadamente versátiles, y con esto se pueden encontrar nuevos productos naturales y biomoléculas asociadas.

Extractos de productos naturales, especialmente de microorganismos, constituyen una fuente valiosa de diversas moléculas en el descubrimiento de muchos fármacos y lideran al descubrimiento de fármacos importantes. La gran diversidad de microorganismos que existe contribuye a una fuente infinita de nuevas moléculas. Estudios recientes indican que sólo conocemos el 5% de las especies de hongos y tal vez el 0.1% de las bacterias. Los compuestos orgánicos obtenidos a partir de microorganismos terrestres o acuáticos han tenido un amplio uso en el tratamiento de muchas enfermedades. Éstos compuestos obtenidos a partir de bacterias, actinomicetos, hongos y levaduras, proporcionaron importantes contribuciones al descubrimiento de agentes antibacterianos (penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas y policétidos), agentes inmunosupresores (ciclosporinas y rapamicina), agentes reductores del colesterol (lovastatina y mevastatina), agentes antihelmínticos (ivermectina), agente antidiabético (acarbose) y agentes anticancerosos (p. ej., pentostatina, peplomycin, y epirubicina).

Otro de los usos de los microorganismos es como fuente de antibióticos, derivados de fuentes fúngicas, pertenecen a los más de 3000 metabolitos producidos por esta microbiota (IBWF, 2005), con diferencias tanto en sus estructuras químicas y moleculares, como las funciones que realizan, las cuales no siempre son conocidas. (Calvo et al ,2002) Los antibióticos de la clase de los beta-lactámicos ya han sido comercializados y son un ejemplo destacado para la biotecnología, por su producción industrial por fermentación, desde hace 60 años y porque actualmente estos antibióticos particularmente penicilinas y cefalosporinas representan en el mundo productos de importancia biotecnológica con ventas mundiales alrededor de 15 billones de dólares, aproximadamente el 65 % del mercado total de antibióticos en el mundo. Muchos de estos antibióticos se modifican mediante un proceso conocido como semisíntesis.

1.4.1 Mecanismos de acción de los metabolitos antifúngicos.

En cuanto los mecanismos de acción de los metabolitos todavía quedan muchas interrogantes. Se ha probado que los terpenos son los principales responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Su efecto antimicrobiano está basado en su habilidad para dañar las biomembranas. En función de sus características lipofílicas interactúan con las enzimas de la membrana e interfieren procesos vitales como la

ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos (Lucini *et al.*, 2006). Se ha demostrado que los alcoholes fenólicos (timol, carvacrol, eugenol) son los más fuertes inhibidores de los procesos enzimáticos. Esto se atribuye a su característica lipofílica y sus grupos OH libres. Se ha encontrado que los alcoholes no fenólicos (geraniol, linalol) tienen un efecto menor que los alcoholes fenólicos y su efecto es reducido por la esterificación de los grupos OH (Knoblock *et al.*, 1989; Pepeljnjak *et al.*, 2003). Se conoce que el cineol reduce la división celular y que el limoneno, el α -pineno y el α -pineno inhiben el consumo de oxígeno (Peñuelas *et al.*, 1996); también se sabe que el 1-8 cineol inhibe la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Koitabashi *et al.*, 1996). Los isotiocianatos reaccionan con las proteínas de los hongos, ocasionando su inactivación mediante su unión al grupo amino del aminoácido lisina o con el grupo sulfhídrico de la cisteína (Tiznado-Hernández *et al.*, 2006). El principal mecanismo de actividad antifúngica de las saponinas es debido a su habilidad de formar complejos con los esteroides en las membranas de los hongos lo cual ocasiona la desintegración de la membrana (Glauert *et al.*, 1962; Morrissey y Osbourn, 1999). Los compuestos fenólicos se ha demostrado que inhiben las enzimas reaccionando con los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos (Murphy, 1999). Las quinonas, flavonas, flavonoides, taninos y flavonoles forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación (Murphy, 1999). Dentro de los alcaloides los llamados cuaternarios se les atribuyen la propiedad de intercalarse en el ADN lo que ocasiona múltiples efectos en el microorganismo. Muchos hongos fitopatógenos (a excepción de los biotróficos) secretan enzimas hidrolíticas que se difunden en las células del hospedero antes del avance de los microorganismos, lo cual puede ser inhibido por radicales libres de fenoles oxidados que funcionan como inhibidores no específicos, así como taninos, cianidina, delphinidina y malvidina (Schlösser, 1980). El ácido gálico actúa sobre la polifenoloxidasas de algunos hongos saprófitos y fitopatógenos ocasionando la acumulación de productos de oxidación. Las proteínas y los polipéptidos antifúngicos tienen mecanismos de acción muy variados, que incluyen la degradación de polímeros de la pared celular, de los canales de la membrana, la degradación de los ribosomas y la inhibición de la síntesis de ADN.

1.4.2. Metabolitos fúngicos de fitoprotección

Además de las aplicaciones en la salud humana, de los metabolitos secundarios derivados de fuentes microbianas, se ha descubierto el potencial, de los hongos filamentosos y de sus diferentes compuestos de biosíntesis, en diferentes campos. Encontrándose que esta microbiota comprende una colección de microorganismos industrialmente muy importantes, por ser una rica fuente de metabolitos secundarios y de su prospección resultan grandes posibilidades de encontrar nuevos compuestos potencialmente significativos para el tratamiento de nuevas enfermedades en humanos, plantas y animales, entre otras implicaciones futuras.

Muchos de los metabolitos utilizados como agentes de biocontrol de microorganismos Fitopatógenos, presentan diferentes modos de acción específicos o no específicos, y comprenden tanto agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas, siendo considerados como mecanismos de antibiosis. En la tabla 2 se enumeran algunos de los metabolitos fúngicos utilizados como antibióticos en la Fitoprotección, que a la vez se han agrupado dentro de estos fenómenos de antagonismo como: antibióticos, sustancias volátiles y enzimas.

Tabla 4: Antibióticos producidos a partir de microorganismos.

Antibióticos	Micorganismo productor(hongo Endófito)	Fitopatógeno que ataca
Gliotoxina	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Pythium sp.</i>
Quetomina	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Venturia inequalis</i>
Koningina A y B	<i>Trichoderma koningi</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Scytalol D	<i>Scytalidium sp</i> <i>Cephalosporium caeruleum</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
6-amil- α -pirona	<i>Trichoderma lignorum</i> y <i>T. viride</i>	<i>Candida albicans</i>

Autoría: Propia

A) Antibióticos

Desde los años 50's existen varios reportes que mencionan la producción de metabolitos fúngicos para el control de ciertas enfermedades ocasionadas por fitopatógenos. Como la gliotoxina producida por *Trichoderma viride*, para el control de *Pythium*.

Las estrobilurinas en el presente, están dentro de los fungicidas más vendidos alrededor del mundo, siendo usados como protectores de plantas contra los más importantes hongos fitopatógenos. Por otra parte análogos químicos como kresoxin-metil,

azoxystrobina, metominostrobin y trifloxystrobina, tienen un amplio espectro de actividad ya que, son inhibidores de la respiración fúngica controlando ascomicetes y basidiomicetes, mildius (polvoso y veloso) y royas presentes en hojas tallos y frutas y espigas principalmente de cebada, trigo arroz. Además de su uso para cultivos de cereales, estos fungicidas se emplean para otros cultivos para el control de *Alternaria sp*, *Rhizoctonia solana*, *Pythium spp*, *Venturia spp*, *Botrytis Cinérea* y *Sclerotinia*, entre otras enfermedades.

Estos fungicidas del tipo estrobilurinas son un ejemplo del éxito en la aplicación comercial de un producto a base de hongos o de sus metabolitos, evidenciando que las sustancias naturales pueden ser una importante fuente de agentes fúngicos, que luego pueden ser desarrolladas como productos o bien como moléculas modelas para la síntesis de nuevos fungicidas selectivos. Este último autor, además menciona su importancia para el ambiente, porque se asume que los compuestos naturales, siendo parte del ecosistema, pueden ser biodegradables, compatibles y menos tóxicos.

B) Enzimas

Las enzimas son otro tipo de metabolitos fúngicos que median el antagonismo ejercido por agentes de biocontrol, lo que significa su uso potencial sobre poblaciones de Fitopatógenos y de insectos de plaga. Debido a que, las enzimas pueden degradar las paredes celulares y otros compuestos estructurales, o bien actuar frente a algunos eventos relacionados con la patogénesis de organismo.

Fravel 1988 menciona dos investigaciones realizadas en 1982 y 1987, donde encontraron compuestos que tenían una acción enzimática en fitopatógenos como *Sclerotinia* y *R. solani*, derivados de *Talaromyces Flavus*, *Gliocladium virens* y especies de *Trichoderma sp*. Cabe resaltar, que la mayoría de enzimas de importancia agroecológica, son las que producen varias especies de este género, como las chitininasas y β -1,3-glucanasas reportadas por Elad y Kapat (1999) para *Trichoderma harzianum*.

C) Sustancias volátiles

Trichoderma harzianum es una fuente de antifúngicos con diferentes modos de acción, como los metabolitos volátiles identificados como alquilpironas con acción fungicida y mayoritariamente fungistática sobre patógenos como *R. solani*. Otro microorganismo que produce sustancias volátiles protectoras, es *Boletus varigatus* (Catalina & Parra, 2006) dentro de las que se incluyen alcoholes como etanol e isobutanol y ácido isobutírico,

Por lo general los principales compuestos volátiles, pertenecen al grupo de los alcoholes y de los ácidos, como los compuestos reportados para el hongo endófito *Mascador albas*, porque este micelio aislado de un árbol de canela produjo 28 compuestos que inhiben y destruyen varias especies de hongos, oomycetos y bacterias.

Este tipo de metabolitos principalmente 2-metil-1-butanol y el ácido isobutírico, pueden ser empleados para controlar algunas de las enfermedades que se presentan postcosecha durante el almacenamiento de los frutos, ocasionados por *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* y *Rhizopus*, ya que no se requiere el contacto del hongo con el fruto o el fitopatógeno para ver un efecto inhibitorio, fungicida o fungistático de los volátiles.

1.5 Endófitos obtenidos a partir de especies de *Taxus sp*:

Entre los hongos endófitos que se destacan a partir de diversos estudios son: *Alternaria*, *Fusarium*, *Monochaetia*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Phythomyces*, *Taxomyces andreanae*, entre otros (Strobel, 2003).

Además *Trichothecium sp.*, *Sporormia minima*, *Fusarium mairei*, se han identificado como endófitos de *Taxus sp.*

Gliocladium sp., el hongo endófito *Stemphylium sedicola* y *Nodulisporium. Pestalotiopsis microspora*, *Didymostilbe sp*, *Taxomyces andreanae*, *Pestalotia heterocornis*,

Las concentraciones de metabolitos producidas por los hongos endófitos varían de acuerdo con el género y especie fúngica así como con la especie vegetal.

1.5.1 Metodologías empleadas para la evaluación de metabolitos con interés en fitoprotección.

Los métodos existentes para la evaluación de susceptibilidad se pueden clasificar de acuerdo al Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) como se resume en la tabla 3, los cuales permiten cuantificar la sensibilidad del patógeno respecto a los compuestos que están a prueba.

Tabla 5: Métodos sugeridos por la CLSI para ensayos de susceptibilidad microbiana.

MÉTODO	DESCRIPCIÓN	Ventajas	Desventajas
Microdiluciones	Se realiza con medios líquidos (RPMI) mediante diluciones seriadas en micro placas de poliestireno, de 20 μ L. Se compara el crecimiento del microorganismo cuantificado con un control.	Reduce la cantidad de metabolito e inóculo necesaria Técnica útil para determinar la MIC Aumento de sensibilidad con respecto a la técnica de difusión.	Las variables deben de ser muy precisas ya que un pequeño error puede arrojar resultados poco confiables
macrodiluciones	Se utilizan tubos estériles de 11x70 mm y el volumen final en cada tubo es de 1 ml. El medio de cultivo, la preparación del mismo y de la solución madre de antifúngico es igual al Método de microdilución.	Es útil en las que se duda en establecer la CMI por el método de microdilución, debido al crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI (trailing growth).	El volumen de materia a evaluar debe ser grande.
Difusión en Disco	se colocan discos de papel filtro(5-10mm de diámetro) con el antibiótico y en el centro de la caja se desarrolla el fitopatógeno en el agar (PDA, extracto de malta) para medir los halos de inhibición.	Es rápida No es costosa	Limitada por los problemas de difusión en agar del hongo con el metabolito. No se obtiene como tal la MIC, sino el crecimiento radial en mm. La cantidad de muestra a evaluar debe ser mayor.
Bioautografía	Se usan placas para cromatografía que se han inoculado previamente con el antifúngico y se coloca después en una caja con medio de cultivo para observar el halo de inhibición	Permite la localización de los compuestos activos en la muestra. Se pueden evaluar varios antifúngicos a la vez.	Solventes ácidos o demasiado alcalinos pueden permanecer en las placas de TLC, después del secado, inhibiendo el crecimiento bacteriano.
Colorimétricos	La lectura se facilita por medio de un cambio de color del indicador de pH presente en el medio de cultivo líquido.	Poco laborioso y estandarizado. Usado tanto para levaduras como para hongos filamentosos.	Comparación con fungicidas específicos, sin posibilidad de incorporar nuevos antifúngicos.

Autoría : propia

En la tabla 4 se muestran los ensayos que se tomaron como referencia para realizar todas las pruebas, como se puede observar la mayoría de los microorganismos estudiados son bacterias y hongos patógenos para el hombre, también se percató que la mayoría de las técnicas que se han utilizado para el análisis de susceptibilidad microbiana usan la difusión en agar.

Tabla 6: Recopilación de ensayos realizados con extractos fúngicos.

SOLVENTE USADO	FUENTE PROVENIENTE DEL EXTRACTO	MICROORGANISMOS PROBADOS EN CONTRA	MÉTODO UTILIZADO PARA LA EVALUACION	ENDÓFITOS IDENTIFICADOS	REFERENCIA
Acetato de etilo	<i>chilia elegans</i> A. Juss	Bacterias: <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Micrococcus luteus</i> Hongos: <i>M. luteus</i> , <i>E. hirae</i> y <i>Salmonella typhi</i> ,	Difusión en agar	(<i>Cordyceps</i> (<i>Phomopsis</i> (<i>Dothideomycete</i>	(Rhoden, Garcia, Bongiorno, Azevedo, & Pamphile, 2012)
Acetato de etilo	<i>Laguncularia racemosa</i> (L.) Gaertn	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,	Método de difusión en disco.	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Curvularia pallescens</i> , <i>Guignardia bidwellii</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> y <i>Mycelia</i>	(Silva, Almeida, Arruda, & Gusmão, 2011)
Metanol, cloroformo, hexano, éter dietílico y etanol	<i>Flourensia cernua</i>	<i>Alternaria Alternata</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	Difusión en agar	<i>Gliomastix murorum</i>	(Guerrero-Rodríguez <i>et al.</i> , 2007)
Acetato de etilo y metanol	<i>Bursera simaruba</i>	<i>Alternaria chrysanthemi</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Mycosphaerella fijiensis</i> y las bacterias <i>Erwinia carotovora</i> y <i>Xanthomonas campestris</i>	Bioensayo en microdilución.	<i>Fusarium sp.</i> <i>Bionectria ochroleuca.</i> <i>Fomitopsis meliae.</i>	(Moreno Perez <i>et al.</i> , 2016)
Acetato de etilo		Gram-positive bacteria (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>), tres bacterias Gram-negativas (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Shigella flexneri</i>) dos hongos patógenos (<i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i>).	Bioautografía	<i>Fusarium solani</i>	(Tayung, Barik, Jagadev, & Mohapatra, 2011)

Autoría : propia

El uso de la REMA es preferible sobre el método de difusión en disco en agar pues es más sensible y preciso. El medio RPMI es el recomendado por la CLSI para pruebas de susceptibilidad en hongos y bacterias.

1.6 Importancia del control de los fitopatógenos en la Agricultura

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y postcosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo éstos responsables de pérdidas económicas cuantiosas: el daño que ocasiona no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Agrios, 2005).

Los patógenos más importantes que causan elevadas pérdidas de frutas y hortalizas son normalmente las bacterias y los hongos, sin embargo, con mayor frecuencia son especies de hongos causantes del deterioro patológico de frutas, hojas, tallos y productos subterráneos (raíces, tubérculos, cormos, etc.).

Algunas fuentes estiman que dichas pérdidas son del orden de 5-25% en países desarrollados y 20-50% en países en desarrollo (FHIA, 2007).

Como es sabido, diversas especies de hongos Deuteromicetos que se incluyen entre los Ascomicetos, constituyen graves desequilibrios en plantas de cultivo o espontáneas de distintos países. Así pues, teniendo en cuenta el grado de agresividad y virulencia de los diferentes agentes causales, destacan las siguientes especies: *Alternaria*, *Botrytis*, *Dipodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor* (FHIA, 2007).

Las enfermedades de las plantas suelen ser una limitante en la producción de cualquier cultivo, por lo que un factor importante a considerar es su control (investigación y Desarrollo 2010). Existen diferentes métodos que pueden ser usados para el control de fitopatógenos, dentro de los que se pueden mencionar la aplicación de fungicidas químicos, tratamientos térmicos, aplicación de aceites esenciales, entre otros.

Se considera que existen más de 8 000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas. La mayoría de las plantas pueden ser atacadas por algún tipo de hongo (por uno o varios) y también se sabe que un mismo hongo fitopatógeno puede atacar uno o más tipos de plantas, aunque sean de diferentes familias. La mayor parte de los fitopatógenos pasan la mayoría de su ciclo de vida en la planta que les sirve de huésped (como parásitos) y otra parte en el suelo, en los residuos vegetales que se encuentran ahí (como saprófitos), aunque

algunos solo se desarrollan como parásitos. Generalmente, los cuerpos reproductores del hongo se forman en la superficie de los tejidos de la planta huésped (o muy cerca de ella), lo cual causa que las esporas se dispersen rápida y fácilmente. (García, 2004).

1.6.1 Morfología de hongos fitopatógenos.

La mayoría de los hongos tienen un soma vegetativo que consta de filamentos continuos más o menos alargados que pueden tener paredes tabicadas o transversales llamados septos. Al soma del hongo se le denomina micelio, y a las bifurcaciones individuales o filamentos del micelio se les denomina hifas. Las hifas de algunos hongos tienen un diámetro variado, existen algunas de 0.5 μm y otras de más de 100 μm , así como longitudes variadas que van desde unas cuantas micras los metros, dependiendo de la especie.

En el micelio se encuentran las células que contienen uno o varios núcleos. En otros el micelio es cenocítico, es decir contiene muchos núcleos y está constituido por una célula multinucleada continua que puede o no ramificarse, o bien puede estar dividida por varios septos, de ahí que cada septo represente una hifa multinucleada. El crecimiento del micelio se da en las puntas de las hifas.

1.6.2 Reproducción

Los hongos se reproducen mediante esporas, estructuras especializadas que constan de una o varias células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente (mediante la separación de pequeños fragmentos del micelio en esporas) o ser el resultado de un proceso sexual.

En los hongos inferiores, las esporas asexuales se forman en el interior de un saco denominado esporangio y son diseminadas en el momento en el que se rompe esta estructura o a través de una estructura que posee. Algunas de esas esporas se mueven mediante flagelos y se denominan zoosporas. Otros hongos producen esporas asexuales denominados conidios, que se desprenden de las células terminales o laterales de hifas especializadas denominadas conidióforos. En algunos hongos las hifas se alargan, entonces

las células están rodeadas por una pared densa y se separan para formar clamidiosporas. En la reproducción sexual, que se produce en la mayoría de los hongos, se fusionan un par de células (gametos) que producen un cigoto denominado zigospora. Cuando el tamaño del par de gametos fusionados es diferente uno del otro, el cigoto se denomina oospora.

1.6.3 Características de *Fusarium sp.*

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular. Son considerados principalmente como hongos de campo (Sumalan *et al.*, 2013), ya que causan un sinnúmero de enfermedades en cultivos. Sus daños desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas considerables (García *et al.*, 2007). Desde hace años, el control de las enfermedades fúngicas ha dependido, en gran medida, de los tratamientos con agroquímicos. Sin embargo, su uso representa un severo riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medioambiente (Abdel-Monahim *et al.*, 2011). Además, han dado lugar a la aparición de microorganismos altamente resistentes que conducen a enfermedades fúngicas con mayor incidencia que antes.

1.6.3.1 Interacción *Fusarium sp*-planta

Los hongos del género *Fusarium* son ampliamente conocidos alrededor del mundo, es el agente causal del marchitamiento vascular, una de las tantas enfermedades que provoca en una amplia variedad de cultivos (ajo, algodón, banano, brócoli, calabacita, cebolla, chile, fresa, linaza, melón, ornamentales-clavel, crisantemos, gladiolas, tulipanes, repollo, tomate, etc.), económicamente importantes alrededor del mundo y se ha convertido en un problema serio ya que producen metabolitos tóxicos que ponen en peligro la salud de los seres humanos y de los animales. Además, incluye muchos patógenos de plantas de importancia agrícola que en conjunto ocasionan enfermedades caracterizadas por marchitez, tizones, pudriciones en cultivos ornamentales y forestales en ecosistemas agrícolas y naturales (Ma *et al.*, 2013). Como otros fitopatógenos, este hongo emplea diversas estrategias de

infección, así también, la especificidad del hospedero depende de cada especie de *Fusarium*. El hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas en ausencia de sus anfitriones, y si se encuentra cerca una planta hospedera, la infección puede iniciar en las raíces, en partes de la planta por encima del suelo, a través del aire o el agua (Ma *et al.*, 2013). Para que la infección se logre con éxito, la interacción entre hongo-planta responde a un proceso donde se deben movilizar diferentes conjuntos de genes para la señalización temprana del hospedero, la adhesión a la superficie de este, la descomposición enzimática de barreras físicas, la defensa contra los compuestos antifúngicos del anfitrión, y la inactivación y la muerte de las células huésped por micotoxinas segregadas. (Agrios, 2005).

1.6.3.2. Interacción de *Alternaria sp* con la planta de tomate.

El hongo ataca los tallos, hojas y frutas del tomate. Este puede ahorcar las plántulas causando mal del talluelo (damping-off) en el semillero. En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo. Las manchas tienen la característica de tener anillos concéntricos de color oscuro. Usualmente las manchas aparecen en las hojas más viejas y de éstas suben al resto de la planta. A medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar los tallos y las frutas. Las manchas en las frutas son similares a las de las hojas con color café y anillos concéntricos oscuros. En los anillos concéntricos se producen esporas polvorientas y oscuras. Las esporas se pueden observar si a la lesión se le acerca un objeto de coloración clara.

1.6.4 Características de *Pythium sp*

El género *Pythium* consta de más de 120 especies (Dick, 1990), que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo. *Pythium* puede vivir como saprófito sobre restos de plantas muertas o puede ser patógeno. En sistemas de producción tales como invernaderos, viveros, campos agrícolas y bosques ocasiona pudrición de semillas, ahogamiento de plántulas, pudrición de raíces, frutos y otros órganos vegetales que se encuentran en contacto con el suelo (MacDonald *et al.*, 1994; Agrios, 2005). También se

asocia con una reducción en el vigor de plantas adultas, ya que daña la raíz; pero generalmente no las mata (Martin, 2009). Especies de *Pythium* como *P. aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *P. myriotylum* and *P. ultimum* causan ahogamiento, pudrición de la raíz, tizón de las plántulas y pudrición del tallo de muchas plantas

Algunas especies de *Pythium* atacan también a los órganos carnosos de las plantas, los cuales pudren durante su almacenamiento. Produce un micelio blanco, filamentoso, ramificado y de rápido crecimiento. El micelio produce esporangios que pueden ser de forma esférica o filamentosa. Los esporangios germinan y producen una o varios tubos germinales, o producen una hifa corta en el extremo de la cual se forma una vesícula. El protoplasma se difunde desde el esporangio hacia la vesícula y ahí forma más de cien zoosporas, cuando estas son liberadas nadan en el agua unos cuantos minutos; por eso aparecen en ambientes húmedos, entran en reposo y se enquistan al envolverse en una cubierta protectora y germinan al producir un tubo germinal.

El tipo de germinación, tanto de los esporangios como de las oosporas está determinado por la temperatura del medio; las temperaturas por arriba de 18°C favorecen la germinación de tubos germinales, mientras que las temperaturas entre 10-18°C inducen a la germinación por medio de zoosporas.

Las especies de *Pythium* se encuentran ampliamente distribuidas en los suelos y aguas de todo el mundo. Viven como organismos saprofitos, o bien como parásitos débiles atacando las raíces fibrosas de las plantas.

Capítulo II: DESARROLLO EXPERIMENTAL

2. Generalidades del estudio

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Control Ambiental del Departamento de Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Oaxaca y en las instalaciones del laboratorio de CICIMEBIO-2 de la Facultad de Medicina y Cirugía de la Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca

Las cepas de *Taxus globosa* S. fueron proporcionadas por la Dra. Claudia López Sánchez, encargada del Laboratorio de Control Ambiental, dichas cepas fueron seleccionadas de acuerdo a sus efectos en estudios anteriores. En la figura 1 se resume la metodología que se llevó a cabo, se incluyeron procesos secundarios que fueron necesarios para llegar al objetivo, por ejemplo el aislamiento e identificación de los fitopatógenos .para la evaluación de los extractos fúngicos se usaron.

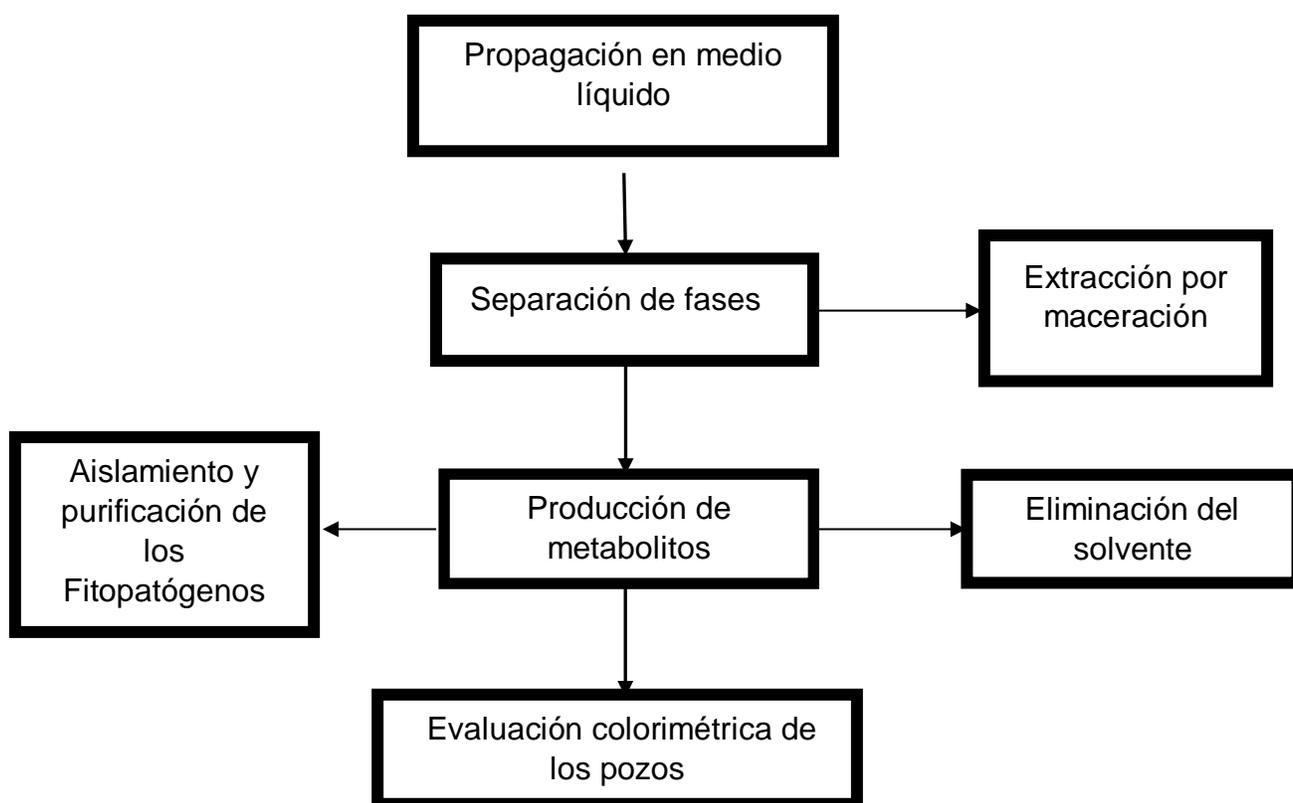


Figura 1: Diagrama de la metodología.

2.1 Activación de las cepas endófitas de *Taxus globosa* Schldt

Las 22 cepas de hongos endófitos de *Taxus globosa*, que anteriormente se habían elegido para este estudio; se resembraron en medio sólido (agar PDA) y se incubaron durante 21 días a una temperatura de 22°C y en completa oscuridad. Se rotularon con la clave KG las cepas obtenidas de la raíz y con CT las cepas obtenidas a partir del tallo.

2.2 Siembra en medio Líquido

Para la elaboración del medio líquido fue necesario preparar la infusión de 100 g de papa para un litro de medio y se agregaron 20 g de glucosa por cada litro, posteriormente se esterilizó el medio en autoclave durante 20 min a 15 psi. El crecimiento de las cepas en medio líquido se llevó a cabo durante 28 días en una agitadora de matraces (marca SEV AGO6040) a 70 rpm con 12 horas de Luz/oscuridad. En la figura 2 a) se muestran los cultivos en la primera semana de crecimiento de los endófitos en el medio PDB (caldo papa dextrosa), Transcurridas cuatro semanas se observó crecimiento del micelio; como se nota en la figura 2 b).



Figura 2: Resiembra de las 22 cepas en medio líquido, a) primera semana de propagación en medio líquido (PDB), b) cuarta y última semana de propagación.

2.3 Extracción por maceración

Se hizo la separación de fases de la biomasa y el caldo después del crecimiento hifal de los endófitos, por medio de filtración en un matraz kitasato y aplicando vacío. Determinando los volúmenes del caldo y el peso de la biomasa. Registrándose en el anexo D.

Al volumen de caldo de cada una de las 22 cepas se le agregan 50 ml de cloruro de metileno. Se dejó agitando a 70 rpm durante 22 horas a 22°C. Por otra parte la biomasa se rotuló y se guardó a -5°C durante un mes.

2.3.1 Extracción de metabolitos a partir del caldo-filtrado

La figura 3a) muestra cómo se formó una película superficial en el solvente, después de transcurridas 22 horas de agitación, Posteriormente se recuperó el solvente en la campana de extracción, con ayuda de un embudo de separación (Figura 3b).



Figura 3 : *Tratamiento posterior de las fases biomasa-caldo para la obtención de los metabolitos: a) extractos obtenidos del caldo después de 22 horas de maceración en cloruro de metileno. b) Separación mediante decantación del cloruro de metileno y la película superficial.*

Con la finalidad de concentrar los extractos, se pasaron al rotavapor para eliminar completamente al solvente a 20°C y a baja presión. Se realizó este proceso con cada una de las 24 cepas. Para almacenar los extractos se lavaron 24 viales de vidrio y se registraron sus pesos antes de ser utilizados para almacenar a los extractos. Al final se observó un pequeño cambio de color en los viales donde se encontraban los extractos.

Se pasaron los viales a una estufa de vacío (Precision Scientific PS mod.19008-V) (figura 4 a), cuidando que dentro de la cámara estuviera una T° de 20°C y 0.5 atm para continuar evaporando al solvente.

En la figura 4 b) se ha eliminado cualquier resto de cloruro de metileno y se pesaron los viales. Al final se registró el peso de cada vial en el anexo E y se dejaron guardando a 5°C en completa obscuridad.

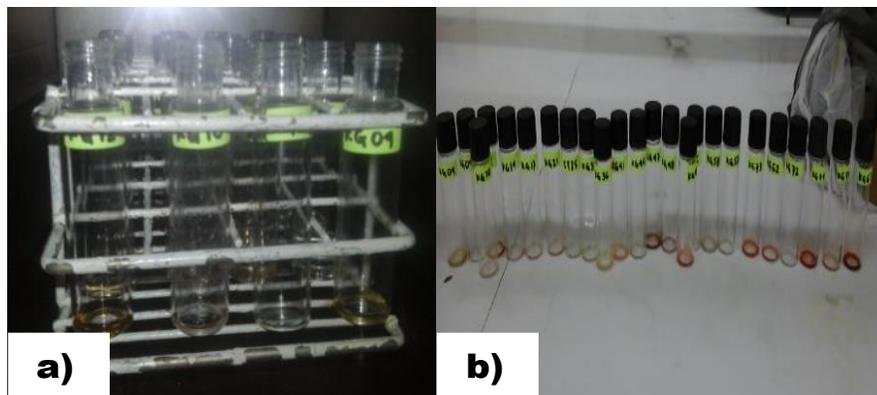


Figura 4: *Proceso de separación del solvente para la obtención de los metabolitos a partir del caldo: a) eliminación completa del cloruro de metileno en la estufa de vacío. b) viales que contienen a los metabolitos.*

2.3.2 Extracción de metabolitos a partir de la biomasa-micelio.

Para este procedimiento la biomasa se conservó a -5 °C y después de 21 días se trituró en frío (Fig.4a), se siguió el mismo procedimiento que el descrito para el caldo, la biomasa se agitó durante 24 horas (Fig.4b) las diferencias fueron la trituración en frío y la separación con un embudo de decantación (Fig.4c). Las mismas variables se manejaron para la maceración con cloruro de metileno y para la eliminación completa del solvente en el rotavapor a 20°C (Fig. 4d). Se almacenaron en viales, posteriormente se registró el peso neto de los metabolitos para su posterior evaluación, como se observa en el Anexo F.

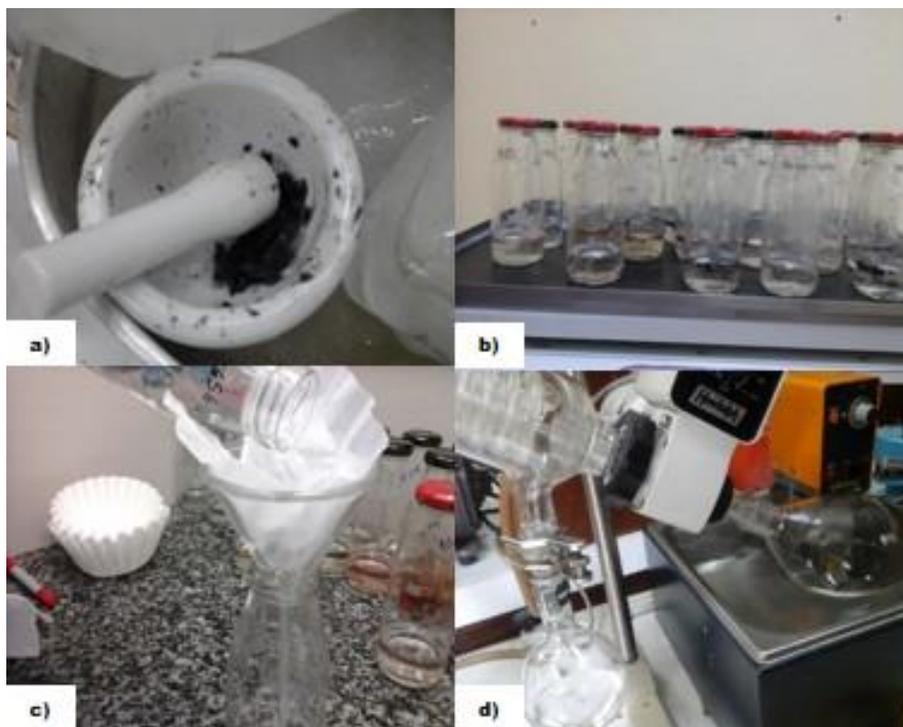


Figura 5: Obtención de los metabolitos secundarios a partir de la biomasa; a) trituración en frío de la biomasa, b) agitación y maceración de la biomasa con cloruro de metileno durante 24 h. c) separación del cloruro de metileno de la biomasa, d) eliminación del cloruro de metileno con rotavapor a 20°C.

2.4 Aislamiento de los fitopatógenos

a) *Alternaria sp* y *Fusarium sp*

El cultivo agrícola de donde se aislaron los fitopatógenos: *Alternaria sp* y *Fusarium sp* fue de un invernadero de tomate, se seleccionaron a las plantas que presentan los síntomas típicos de tizón temprano o tizón tardío. A partir del material vegetal recolectado se realizó una desinfección de los tejidos con el fin de disminuir la carga saprófita y así se aisló el agente patógeno de interés.

Las hojas y el tallo se lavaron con hipoclorito de sodio al 25 % (V/V) durante 5 minutos; se enjuagaron 3 veces con agua destilada, eliminando de esta forma el exceso de hipoclorito, luego se secaron con papel absorbente estéril, se introdujeron las muestras de la planta (hojas y tallo) en una caja Petri, esto con el fin de propiciar las condiciones de humedad requeridas para el desarrollo de las estructura reproductivas del hongo (Figura 6a). Posteriormente el recipiente se selló con cinta adhesiva para evitar la contaminación de la

muestra y mantener las condiciones de humedad necesarias que permitieran la esporulación de los microorganismos (French *et al.*, 1982).

Para obtener el microorganismo de interés; se cortó con bisturí 2 o 3 secciones de tejido vegetal de 8 mm de diámetro; se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2 % (V/V) por 5 min. Posteriormente se realizó un lavado con agua estéril y se secó el material con papel absorbente estéril y en condiciones de esterilidad se colocaron en cajas Petri con PDA (se selló con parafilm (Figura 6b) y se pusieron a incubar a 26 °C durante 6 días en una incubadora, hasta observar esporulación abundante, las colonias se resembraron para su aislamiento y posterior purificación en cajas de PDA. Otra técnica que se utilizó fue mediante diluciones seriadas a partir del suelo: se pesó un gramo de suelo procedente de la planta de tomate, posteriormente en 4 tubos que contenían 10 ml (a excepción del último) agua destilada esterilizada. Se realizaron diluciones tomando 0.1 ml del primer tubo al segundo tubo, sucesivamente hasta llegar al cuarto tubo. Inmediatamente se sembró por estriado con la varilla de vidrio en cajas Petri con PDA, se llevaron a sus condiciones óptimas de esporulación: para *Alternaria sp* y *Fusarium sp* se dejaron en una incubadora a 28°C en cambio para *Pythium ultimum var. ultimum* a 18 °C .

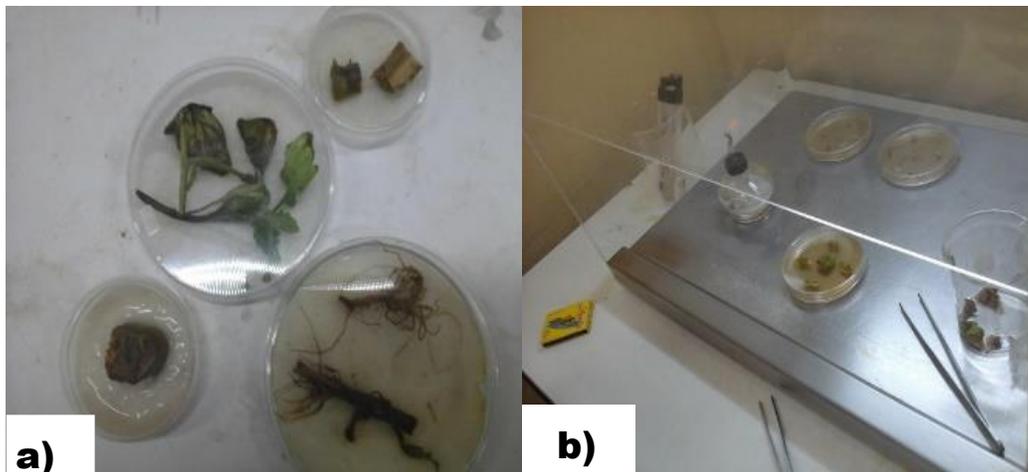


Figura 6: Inducción de los fitopatógenos en hojas y raíces de tomate, mediante esporulación y aislamiento de la lesión; a) Tratamiento de humedad para producir condiciones de esporulación en la planta enferma, b) Inducción del crecimiento de fitopatógenos obtenidas del tallo en agar PDA.

b) *Pythium ultimum* var. *ultimum*

La cepa se compró en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV. Con los siguientes datos generales:

CDBB: 1936

Género: *Pythium*

Especie: *ultimum*

Rango infra sub específico: var. *ultimum*

ACRÓNIMO: NBRC 100122

Descripción: Aislada de Remolacha, *Beta vulgaris*. Hokkaido, Japón.

2.5 Determinación del inóculo por escala McFarland

Para la especie del género *Fusarium* sp se trabajó con una colonia de 72 h a 35 °C y posteriormente a 25-28 °C hasta completar catorce días, en PDA, en cambio para *Pythium ultimum* var. *Ultimum* se utilizó un cultivo de siete días a 22°C desarrollado en agar-avena.

Para la especie de *Alternaria* sp se partió de un cultivo de crecimiento de 7 días a 27°C en PDA. Los tres fitopatógenos se hicieron crecer en tubos inclinados.

Se usó una concentración aproximada de $0.4-1 \times 10^5$ UFC/ml, el día del ensayo se agregó la cantidad suficiente de solución salina estéril (al 0.85%); para recoger las UFC se raspó toda la superficie del agar con un hisopo estéril, enseguida se transfirieron a tubos estériles, procurando tener el volumen de 2 ml por cada inóculo. Se usó la escala McFarland seleccionando el tubo 0.5 con la suspensión de hongos.

Se usó el medio RPMI como medio de cultivo para los tres fitopatógenos, se obtuvo una microdilución 1:50, agregando 100 µL por cada 20 ml.

Todo este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar, Nuair clase II-A2, modelo NU425400.

2.6 Preparación de los extractos

Se diluyeron con Dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% v/v; a una razón 1:1 m/V en los viales, tomando como referencia que siempre se trabaja con masa mínima y difícil de manipular; Se trabajaron con tres concentraciones para el caldo y la biomasa: 60, 20, 10. Cada vial se le adicionó cierto volumen (Anexo G y H) de DMSO para tener una concentración de 1 mg/ml de extracto que fue probada durante el experimento.

2.7 Preparación de la Resazurina

Para el ensayo se preparó una solución de resazurina (Sigma-Aldrich) al 0.002% luego fue esterilizada por filtración con un microfiltro de la marca Millex-GV de 0.22 μm se tomó esta concentración debido a que se ha reportado la comparación de está con la concentración de 0.001% dando mejores resultados la concentración de 0.002%.(Monteiro *et al.*, 2012).

2.7.1 Preparación del medio.

La solución de Resazurina se diluyó en el medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich). Se trabajó diluyendo 0.1 ml de resazurina por cada 20 ml de suspensión microbiológica. En total se prepararon 20 ml para cada fitopatógeno.

2.8 Pozos control.

Se prepararon tres controles Uno diluyendo 90 μL de RPMI y la suspensión de esporas sin la Resazurina. El segundo el control negativo fue 90 μL de RPMI +90 μL de Resazurina sin la suspensión de esporas y el tercero se usó Fluconazol (Pfizer) solución de Resazurina al 0.002% y los fitopatógenos. Usando como punto de corte la concentración recomendada por Ghannaum para los tres fitopatógenos, que es de 750 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.8.1 Procedimiento de la prueba

Se distribuyeron de la siguiente manera: en microplacas de 96 pozos estériles, de 200 μ L de fondo en forma de U, se usó como guía la Figura 7, para la primera mitad de las cepas. El total de las 22 cepas a evaluar para cada fitopatógeno necesitó de dos microplacas.

Un volumen del metabolito (60,20 ó 10 μ L) con la concentración de 1mg/ml, más 90 μ L de suspensión de fitopatógenos suspendidos previamente en RPMI ajustados a la escala 0.5 y la Resazurina estéril con una concentración final de 0.002% (P/V).

	1 KG09	2 KG12	3 KG17	4 KG19	5 KG25	6 KG32	7 KG36	8 KG41	9 KG44	10 KG47	11 KG48	12
A	60 μ L	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	RPMI+Hongo
B	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	RPMI+Hongo
C	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	RPMI+Hongo
D	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	RPMI+Hongo
E	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	RPMI+Hongo
F	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	RPMI+Hongo
G	Fluco	Fluco	Fluco	Fluco	Fluco	Fluco	Fluco	Fluco	Fluco	Fluco	Fluco	RPMI+Hongo
H	RPMI + RE	RPMI +RE	RPMI + RE	RPMI + RE	RPMI + RE	RPMI + RE	RPMI +RE	RPMI +RE	RPMI + RE	RPMI +RE	RPMI +RE	RPMI+Hongo

Figura 7: Procedimiento y distribución de la prueba en las microplacas de 96 pozos.

A1-A11 y D1-D11 se colocaron las muestras de los extractos con 60 μ L+90 μ L de suspensión de Fitopatógenos. Fila A para la biomasa y la fila D para el caldo.

B1-B11 y E1-E11 se colocaron las muestras con 20 μ L +90 μ L de suspensión de fitopatogenos. Fila B para la biomasa y la fila E para el caldo

C1-C11 y F1-F11 se colocaron las muestras con 10 μ L + 90 μ L de suspensión de fitopatogenos. Fila C para la biomasa y la fila F para el caldo

G1-G11 sirvieron como control positivo; conteniendo Fluconazol 90 μ L con []= 750 μ L

H1-H11 sirvieron como control Negativo; conteniendo medio RPMI con resazurina.

Columna A12-H12 sirvieron como control, 90 μ L de RPMI con extracto

Capítulo 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Identificación macro y microscópica de los fitopatógenos

Para la caracterización de los hongos se realizaron microcultivos en cámara de humedad que se observaron en el microscopio para comparar su morfología con la bibliografía consultada (Barnett *et al.*, 1972). Verificando que las características descritas en dicho manual coincidieran con los fitopatógenos buscados

Se examinaron las cajas Petri diariamente para verificar que los microorganismos fueran los fitopatógenos que se necesitaban para el ensayo: para *Pythium*, se buscaron estructuras como esporangios y zoosporas. En la figura 8 a) la cepa de *Pythium ultimum* var. *Ultimum* usó como medio de crecimiento Agar-avena, en cambio, el desarrollo del esporangio se presenta en la figura 8b)

Fusarium sp y *Alternaria* sp deben desarrollar estructuras como micro y macro conidios, así como las clamidiosporas. En la figura 8c), se exhibe el desarrollo micelial de *Fusarium* sp en PDA, y sus estructuras microscópicas se contrastan en la figura 8 d). Para la identificación de *Alternaria* sp se incubó en PDA (Figura 8 e), por otra parte en la figura 8 f) se muestran los conidios.

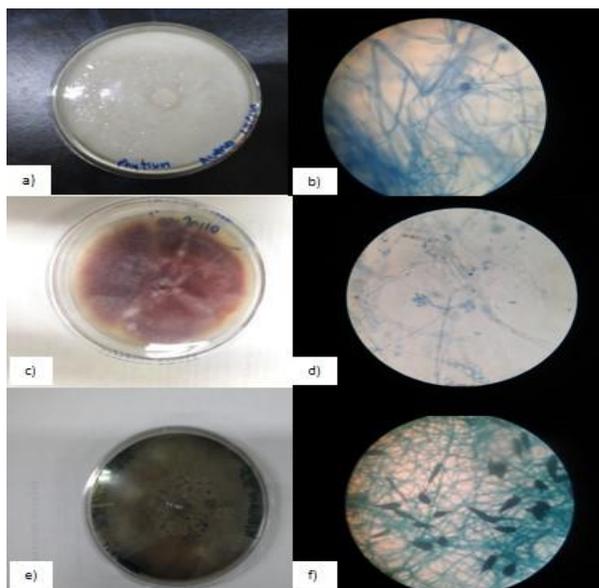


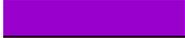
Figura 8 : Observación macro y microscópica de los hongos fitopatógenos de estudio; a) observación macroscópica de *Pythium ultimum* var. *Ultimum*; b) esporangio e hifa de *Pythium ultimum* var teñidas de con azul algodón de lactofenol con objetivo 40x, c) observación macroscópica de *Fusarium* sp, d) observación microscópica de *Fusarium* sp, objetivo 40x, e) observación macroscópica de *Alternaria* sp, f) Tinción de conidios de *Alternaria* sp con azul algodón de lactofenol, con objetivo 40x

3.2 Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos fúngicos en los fitopatógenos .

La CMI se define como la concentración más baja, registrada en mg / L o µg / mL de un agente antifúngico que inhibe el crecimiento de un hongo. El MIC informa sobre la susceptibilidad o resistencia del organismo al agente antifúngico y puede ayudar en las decisiones de tratamiento. En el presente trabajo se registraron las lecturas de los micropozos después de 22 horas.

La medición colorimétrica a simple vista fue sencilla, ya que el color del pozo se podía distinguir claramente entre azul y púrpura. El color púrpura se consideró como un resultado final, donde algunas actividades metabólicas y un tiempo de incubación más largo causarían que este color cambiara a rosado (Monteiro *et al.*). En la tabla 5 se asigna una tonalidad de color para un porcentaje de inhibición. Después del tiempo de incubación se llevaron a cabo las lecturas en cada placa.

Tabla 7: Porcentajes de inhibición asignadas a cada tonalidad de las placas con resazurina.

COLOR	VIRAJE	ACTIVIDAD	CMI	% de inhibición
	Azul	Nula	0	0
	Violeta púrpura	Poco sensible	500 a 1000 µg/MI	41-10
	Morado	Sensible	100 a < 500 µg/MI	70-40
	rosa	Altamente sensible	< 100 µg/MI	71-100

Autoría: propia.

En el caso de *Alternaria sp* después de 24 hrs el color seguía siendo púrpura, por lo que sugerimos que la actividad inhibitoria fue poco sensible; en cambio con *Fusarium sp* el cambio fue a las 18 hrs, considerándolo como altamente sensible a los extractos.

El uso de Resazurina como un indicador colorimétrico en adición con el protocolo del CLSI para el ensayo de microdiluciones fue descrito por Tiballi, He, Zarins, Revankar y Kauffman en 1995 y fue encontrado como simple, sensible, rápido y rentable en pruebas antimicrobianas para productos naturales. El método colorimétrico es el más rentable en laboratorios donde no está disponible un lector de microplacas,

Cualquier cambio de color púrpura a rosado o incoloro se registró como positivo. La concentración más baja a la que no se encontró crecimiento fúngico se le consideró la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.3 Actividad biológica de los extractos fúngicos sobre *Alternaria sp.*

La mayor parte de los pozos sólo alcanzaron un color púrpura sin actividad evidente, a pesar que se les dejó más tiempo, la figura 9 a) y 9 b) muestran las lecturas que se registraron a las 18 horas de incubación de las 22 cepas para la evaluación de la susceptibilidad microbiana, tanto de la biomasa como del filtrado. El Fluconazol no tuvo viraje.

En contraparte los pozos con extractos obtenidos de la biomasa de las cepas KG47, KG61, KG74 y KG76 fueron las que alcanzaron un color rosa pálido transparente, que demostró actividad antifúngica. En el caso de los extractos del caldo de cultivo de las cepas KG73 y KG74 y KG76 se consideraron como positivas al cambiar a color violeta pálido. En la figura 9 se grafican las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para *Alternaria sp.*

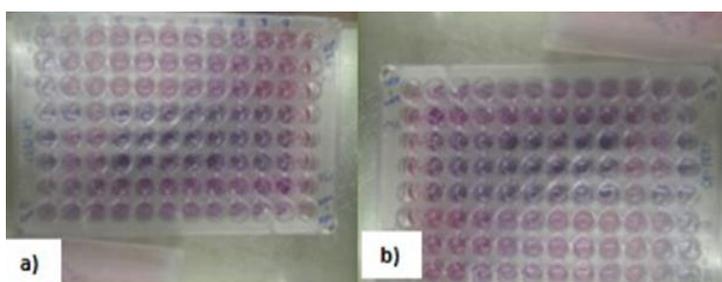


Figura 9 : Viraje de los micropozos de *Alternaria sp.*, a) Tinción de los pozos con las primeras veintidos cepas obtenidas de la biomasa y el caldo con *Alternaria sp.*, b) tinción de los pozos con las últimas veintidos cepas obtenidas de la biomasa y el caldo con *Alternaria sp.*

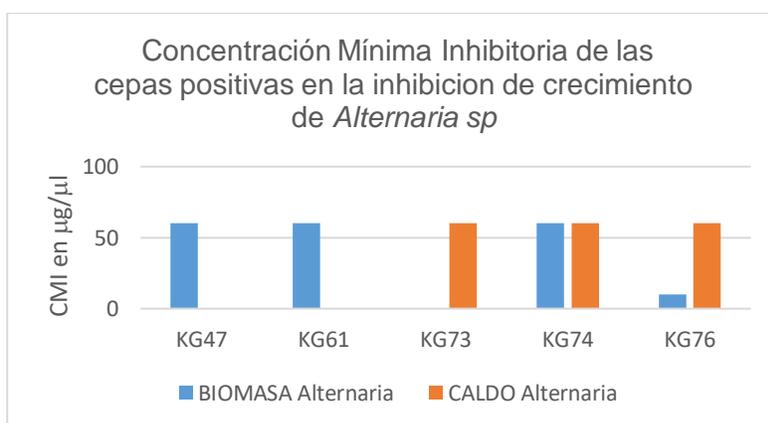


Figura 10 : Concentraciones Mínimas Inhibitorias seleccionadas de las cepas positivas contra *Alternaria sp.* después de 18 hrs de reacción.

3.4. Actividad biológica de los extractos fúngicos sobre *Fusarium sp*

En lo que respecta al ensayo de este fitopatógeno, extractos obtenidos de la biomasa de ocho cepas: KG10, KG21, CT25, KG36, KG44, KG47, KG61 y KG76; mostraron resultados positivos, mientras tanto los extractos del caldo de cultivo de doce cepas; KG09, KG21, CT25, KG36, KG47, KG56, KG61, KG62, KG72, KG73, KG74 y KG76 tuvieron actividad transcurridas 18 hrs. Los pozos que alcanzaron un color rosa intenso, se consideraron como positivas, los restantes también viraron de color, pero después de 40 horas, por lo que ya no fueron consideradas. Como se muestra en la figura 11a) y 11b). Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de todas las cepas positivas que se seleccionaron después de 18 horas de reacción quedaron registradas en la figura 12.

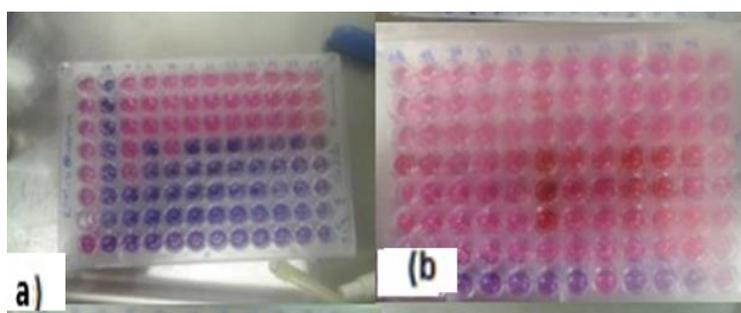


Figura 11: Viraje de las placas en las pruebas de susceptibilidad de *Fusarium sp*, a) tinción de los pozos con las primeras veintidos cepas obtenidas de la biomasa y el caldo con *Fusarium sp* después de ocho hrs. b) tinción de los pozos con las últimas veintidos cepas obtenidas de la biomasa y el caldo con *Fusarium sp*.

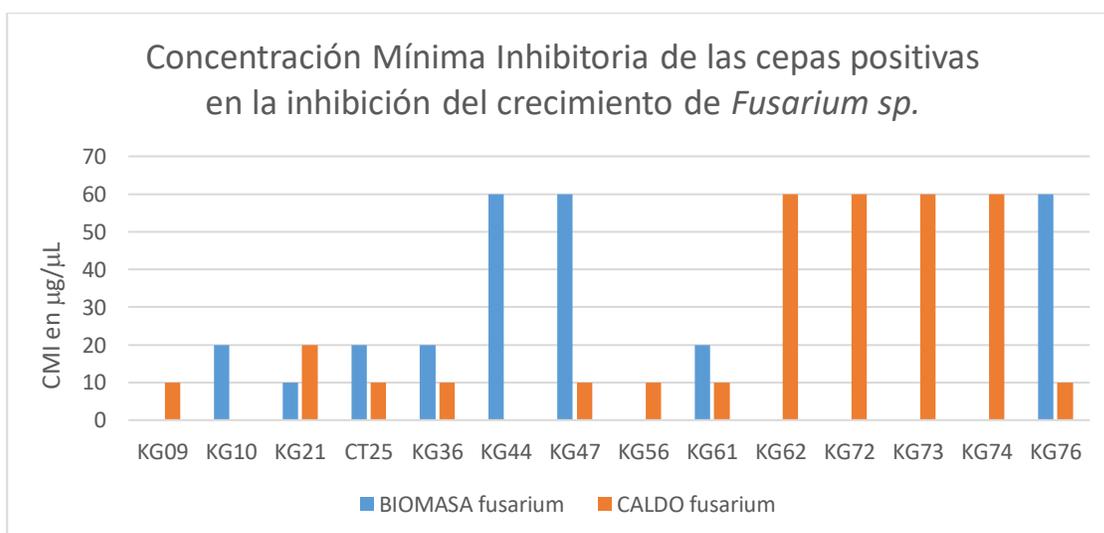


Figura 12: Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) seleccionadas de las cepas positivas contra *Fusarium sp* después de 18 hrs de reacción

3.5 Actividad biológica de los extractos fúngicos Sobre *Pythium ultimum* var. *Ultimum*.

Se obtuvieron tres cepas positivas de la biomasa: KG10, KG12, y KG21, entretanto, del filtrado reaccionaron las siguientes ocho cepas positivas: KG14, KG17, KG47, KG48, KG72, KG73, KG74 y KG76. Las figuras 13a) y 13 b) muestran cómo fue la actividad después de dieciocho horas de interacción de la resazurina con todos los extractos provenientes del caldo y del filtrado; mientras que en la figura 14 se observa cuáles fueron las CMI, pero de la parte inferior de las microplacas muestran la actividad de los endófitos.

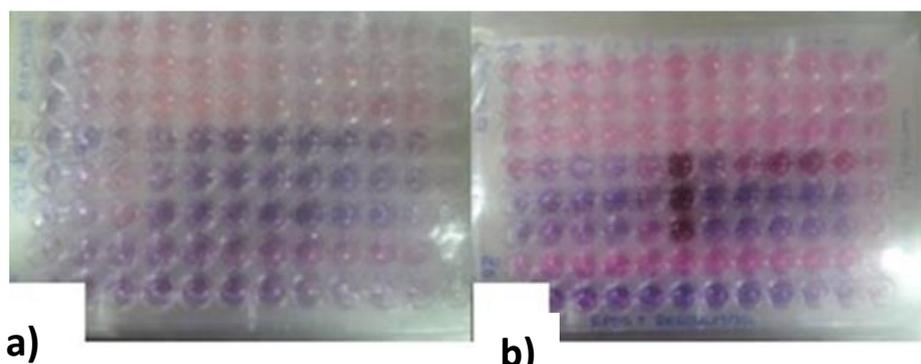


Figura 13: Viraje de las placas en las pruebas de susceptibilidad de *Pythium ultimum* var. *Ultimum*, a) tinción de los pozos con las primeras veintidos cepas obtenidas de la biomasa y el caldo con *Pythium ultimum* var. *Ultimum*, b) tinción de los pozos con las últimas veintidos cepas obtenidas de la biomasa y el caldo con *Pythium ultimum* var. *Ultimum*.

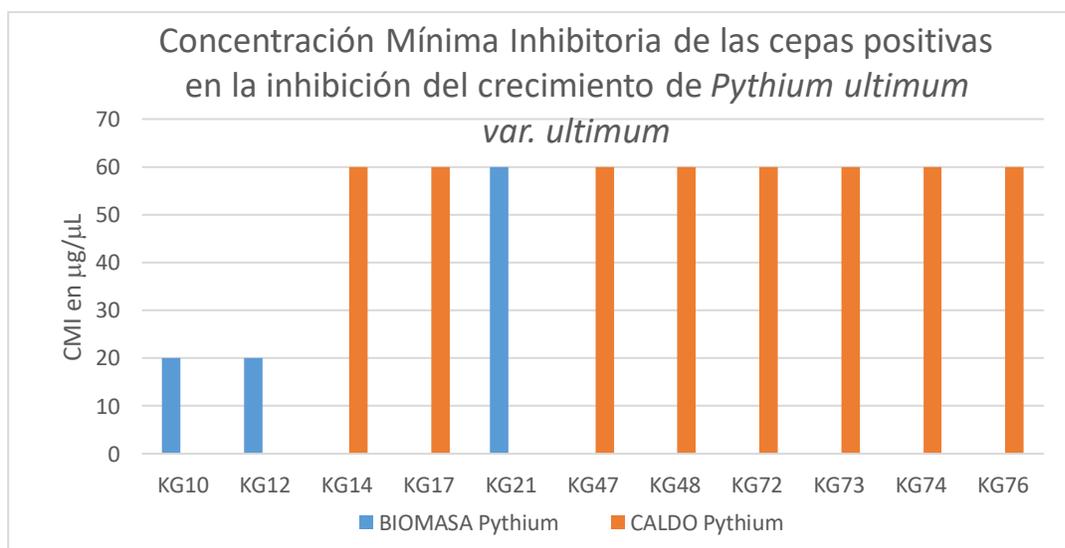


Figura 14 : Concentraciones Mínimas Inhibitorias seleccionadas de las cepas positivas contra *Pythium ultimum* var. *Ultimum* después de 18 hrs de reacción

3.6 Análisis Estadístico de la susceptibilidad de los fitopatógenos.

Para determinar si existe diferencia significativa entre el tipo de Fitopatógeno y la fuente de extracto, se sometieron a una prueba ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo, usando el programa Excel. Se consideró un total de cuarenta y cuatro extractos, de los cuales veintidós eran provenientes del caldo-filtrado y la otra mitad proveniente de la biomasa-micelio. Para cada uno de los tres fitopatógenos se probaron tres concentraciones (10,20 y 60 µg/µl).

El análisis estadístico tomó a consideración dos factores, Factor 1: fuente del metabolito (caldo ó biomasa) y Factor 2: tipo de fitopatógeno (*Alternaria sp*, *Fusarium sp* ó *Phytium ultimum var. ultimum*,). Así como la interacción entre éstos, para analizar la posibilidad de que actúen de modo independiente o que la acción combinada de ambos factores potencie o inhiba la acción de cada uno por separado, para eso se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: La fuente del metabolito no tiene efecto significativo durante la evaluación de la actividad biológica.

Ho: el tipo de fitopatógeno no tiene efecto significativo durante la evaluación de la actividad biológica.

Ho: La fuente del metabolito y el tipo de fitopatógeno no tienen efecto significativo durante la evaluación de la actividad biológica.

Tabla 8 : Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	1093.939394	1	1093.93939	2.35690968	0.127236334	3.91632464
Columnas	586.3636364	2	293.181818	0.63166485	0.533381052	3.06810027
Interacción	2192.424242	2	1096.21212	2.36180631	0.098410115	3.06810027
Dentro del grupo	58481.81818	126	464.141414			
Total	62354.54545	131				

Con los resultados de la prueba ANOVA se aceptó que:

Ho: La fuente del metabolito no tiene efecto significativo durante la evaluación de la actividad biológica.

Ho: el tipo de fitopatógeno no tiene efecto significativo durante la evaluación de la actividad biológica.

Ho: La fuente del metabolito y el tipo de fitopatógeno no tienen efecto significativo durante la evaluación de la actividad biológica.

Capítulo 4 CONCLUSIONES

El 35 % de los extractos obtenidos del medio de cultivo líquido presentaron actividad en la inhibición de crecimiento de al menos un hongo fitopatógeno en cambio un 22 % de los extractos obtenidos de la biomasa con las mismas variables condicionales, presentaron actividad antifúngica; particularmente la actividad contra *Fusarium Sp*, que fue el fitopatógeno más sensible a los extractos. La fuente del metabolito y el tipo de fitopatógeno no tuvieron un efecto significativo en el control de la actividad biológica. Se recomienda para estudios posteriores hacer análisis fitoquímico para identificar cuáles son las moléculas responsables en los extractos fúngicos que tuvieron actividad fúngica. De igual manera identificar la ubicación taxonómica de los endófitos presentes en *Taxus globosa* Schltd del estado de Oaxaca, para este estudio las cepas que tuvieron un 75 % de actividad contra al menos dos fitopatógenos fueron las cepas con clave KG47 y KG76, y que fueron obtenidas de la biomasa y el caldo después del tiempo de propagación. Interpretamos que la MIC, al ser menor a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fue eficiente para cada uno de los ensayos. Los extractos de hongos de *Taxus globosa* Schltd mostraron resultados positivos como fuentes de agroquímicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Monaim, M. F.; Abo-Elyousr K. A. M., y Morsy, K. M. 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop protection*, 30(2), 185–191.
- Agrios, G. N. 2008. Fitopatología. Traducido por: Guzmán, O.M. segunda edición. Editorial LIMUSA. México, D. F. p 205 .
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Quinta edición. Editorial Academic Press. México. 922
- Alarcón, A., M. C. A. González-Chávez, R. Ferrera-Cerrato, 2006. Aspectos ecológicos y aplicación de hongos micorrízicos arbusculares en agroecosistemas. In: Fuentes-Dávila, G.
- Barnett, H. L. and B. Hunter B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing. USA. 241 p
- Calvo, A.M., Wilson, R.H., Bok, J.W., Keller, N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447-459.
- Catalina, D., & Parra, P. (2006). Selección de extractos fúngicos extracelulares (efe) con potencial para el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)
- Dick, W. M. 1990. Keys to *Pythium*. Ed. Dick, M. W.. Department of Botany. School of Plant Sciences. University of Reading. Reino Unido. 64 p.
- Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H. in The discovery of natural products with therapeutic potential (ed. Gullo, V.P.) 49-80 (Butterworth-Heinemann, London, UK, 1994)
- Elad, Y., Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 105: 177–189.
- Elvira Sánchez-Fernández, R., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., & Lydia Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Típ*, 16(2), 132–146.

- Farr, D. F., G. F. Bills, G. P. Chamuris, A. Y. Rossman, 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press. St. Paul, Minnesota
- Ferrera–Cerrato, R. (eds.). Ecología de la raíz. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Ciudad Obregón, Sonora. 27–46.
- FHIA, 2007. Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias .4:2-5.
- Flor, H. H., 1947. Host parasite interactions in flax rust. Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680–685.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 26:75-91.
- French, E. 1982. *Metodos de investigacion fitopatologica*. Instituto Americano de Cooperación para la agricultura. Costa Rica. 209
- García, J. M. D.; Shagarodsky, T.; Fresneda, J. A.; Fundora, Y. H., y González, J. 2007. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología* 32 (11), 63–66.
- García, C.V. 2004. *Introducción a la microbiología, segunda edición*. Editorial EUNED. Costa Rica. 103-107
- Glauert, A. M., J. T. Dingle, J. A. Lucy, 1962. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* 196: 953-955.
- Guerrero-Rodríguez, E., Solís Gaona, S., Hernández-Castillo, F. D., Flores-Olivas, A., Sandoval-López, V., & Jasso-Cantú, D. (2007). D . C . en Patógenos de Postcosecha : *Alternaria alternata* (Fr .: Fr .) Keissl ., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz .) Penz . y *Sacc .* y *Penicillium digitatum* (Pers .: Fr .) Sacc . *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 48–53.
- Hawksworth, D. C., and A. Y. Rossman. 1987. Where are the undescribed fungi? *Phytopathology* (abstract) 87: 888-891.
- Juarez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., & Lopez-Malo, a. (2010). Hongos Fitopatógenos

de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.

Knoblock, K., A. Pauli, B. Ibler, H. Weigand, N. Weiss, 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential*

Koitaababashi, R., T. Suzuki, T. Kawazu, A. Sakai, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa, 1997. 1,8- cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research* 110:

Lucini, E. I., Zunino M. P., López M. L., A. Zygadlo, 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology* 154: 441-446

Ma, L. J.; Geiser, D. M.; Proctor, R. H.; Rooney, A. P.; O'Donnell, K., Trail, F. y Kazan, K. 2013. *Fusarium Pathogenomics*. *Annual review of microbiology*, 67, 399–416.

MacDonald, J. D.; Ali-Shtayed, M. S.; Kabashima, J. and Stites, J. 1994. Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. *Plant Dis.* 78:607-611.

Martin, F. 2009. *Pythium* Genetics, *In: oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools*. Lamour, K. and Kamoun, S. (eds.). Wiley Blackwell. Estados Unidos de América. 213-239

Monteiro, M. C., De La Cruz, M., Cantizani, J., Moreno, C., Tormo, J. R., Mellado, E., ... Vicente, F. (2012). A new approach to drug discovery: High-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *Journal of Biomolecular Screening*, 17(4), 542–549.

Montes-Belmont, R. (1995). Chemical diversity in plants against phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Micología*, 29, 73–82.

Moreno Perez, P., Gamboa Angulo, M., Heredia, G., Canto Canche, B., Rodriguez Garcia, C. M., Medina Baizabal, I. L., & Peraza Echeverria, L. (2016). Antimicrobial evaluation of extracts obtained from tropical micromycetes against phytopathogens. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 85(130), 7–14.

Murphy, C. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.

- Pepeljnjak S., I. Kosalec, Z. Kalodera, D. Kustrak, 2003. Natural antimycotics from Croatian plants. In: Rai, M., D. Mares (eds.), Plant- derived antimycotics. Current trends and future prospects. Hartworth Press.
- Pirozynski, K.A., D.L.Hawksworth, 1988. Coevolucion of fungi with plants and animals. Academic Press. London.
- Rhoden, S. A., Garcia, A., Bongiorno, V. A., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2012). Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Trichilia elegans* a. Juss. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(8), 57–59.
- Schlösser, F. W., 1980. Preformed internal chemical defenses. In: Horsfall, J. G. and G. Cowling. (eds.). Plant Disease. Vol. V. Academic Press. NY. 161-177.
- Silva, M. R. O., Almeida, A. C., Arruda, F. V. F., & Gusmão, N. (2011). Endophytic fungi from brazilian mangrove plant *Laguncularia racemosa* (L .) Gaertn . (Combretaceae): their antimicrobial potential. *Science against Microbial Pathogens*, 1260–1266.
- Strobel G., Daisy B., Castillo U., y Harper J. 2004. "Natural products from endophytic microorganisms," *Journal of Natural Products*. 67: 257-268.
- Sumalan, R. M.; Alexa, E., y Poiana, M. A. 2013. Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–12.
- Swain, T., 1978. Plant–animal coevolution; a synoptic view of the Paleozoic and mezozoic. In: Harborne, J. B. (ed.). *Biochemical aspects of plant and animal coevolution*. Academic Press, London.
- Tayung, K., Barik, B. P., Jagadev, P. N., & Mohapatra, U. B. (2011). Phylogenetic investigation of endophytic *Fusarium* strain producing antimicrobial metabolite isolated from Himalayan Yew Bark. *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(1), 1–6.
- Tiballi RN, He X, Zarins LT, Revankar SG, Kauffman CA. Use of a colorimetric system for yeast susceptibility testing. *J Clin Microbiol*. 1995 Apr;33(4):915–917
- Tiznado-Hernández, M. E., R. Troncoso-Rojas, 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates.

ANEXO A: Composición de los medios.

Composición del medio agar Papa-Dextrosa

Almidón de papa	4 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g

Composición del Medio agar avena

Avena triturada	20 g
Dextrosa	10 g
Agar	16 g
Extracto de levadura	2 g

Composición del medio RPMI 1640

AMINOÁCIDOS	Mg/L
L-arginina.HCL	200
L-asparigina.H2O	50
L-acido aspártico	20
L-cistina	65,20
L-acido glutámico	20
L-glutamina	300
Glicina	10
L-histidina.HCl.H2O	15
Hidroxiprolina	20
L-Isoleucina	50
L-Leucina	50
L-lisina.HCl	40
L-Metionina	15
L-fenilalanina	15
L-Triptofano	5
L-Prolina	20
L-Tirosina	28.33
L-serina	30
L-valina	20
L-treonina	20

VITAMINAS	Mg/L
Biotina	0.2
Pantotenato de calcio	0.250
Cloruro de colina	3
Acido fólico	1
Inositol	35
Nicotinamida	1
Acido p-aminobenzóico	1
Piridoxina HCl	1
Riboflavina	0.20
Tiamina HCl	1,00
Vitamina B12	0.005

SALES INORGÁNICAS	Mg/L
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	100
KCl	400
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	100
NaCl	6000
NaHCO ₃	200
Na ₂ HPO ₄	800

Otros componentes	Mg/L
Glucosa	2000
Glutationa	1
Rojo de fenol	5

ANEXO B: Fórmula molecular del colorante Resazurina.

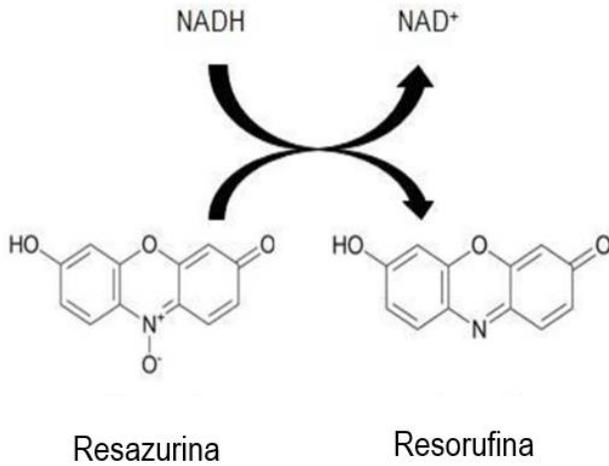


Fig. B1: cuando el compuesto se encuentra en forma oxidada recibe en el nombre, de resazurina (izquierda) y cuando se encuentra en su forma reducida recibe el nombre de resorufina (derecha).

INFORMACIÓN ADICIONAL DE LA RESAZURINA

7-Hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-lum-3-ona

Contenido de humedad: 20%

pH3.8(anaranjado)-ph 6.5(violeta)

Fórmula condensada: C₁₂H₆NO₄Na

Peso molecular: 251. 2

ANEXO C: Clasificación taxonómica de los fitopatógenos estudiados

Clasificación taxonómica de *Alternaria sp*

Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Euscomycetes</i>
Orden	<i>Pleosporales</i>
Familia	<i>Pleosporaceae</i>
Genero	<i>Alternaria</i>
Especies	<i>A.alternata, a.dauci</i>

Clasificación taxonómica de *Fusarium sp*

Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycete</i>
Orden	<i>Hipocreales</i>
Familia	<i>Hypocreaceae</i>
Género	<i>Fusarium</i>
Especies	<i>f. oxisporum, solani, verticillioides</i>

Clasificación taxonómica de *Pythium*

Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Stramenophiles</i>
Clase	<i>Oomycota</i>
Orden	<i>Pythiales</i>
Familia	<i>Pythiaceae</i>
Genero	<i>Pythium</i>
Especie	<i>Pythium ultimum var. Ultimum</i>

ANEXO D: masa y volumen obtenidos del micelio y del filtrado de los 22 hongos endófitos.

CEPAS	Numero de Repeticiones de la Cepa	peso de la biomasa (g)	volumen del caldo (ml)	Vol. de solvente agregado
KG04	2	2.834	16	50 ml
KG09	1	0.760	19	50 ml
KG10	2	2.966	24.5	50 ml
KG12	2	3.695	45.5	50 ml
KG14	2	4.599	37	50 ml
KG17	2	1.195	47.2	50 ml
KG21	2	1.187	50	50 ml
CT25	2	2.892	47.5	50 ml
KG32	2	1.833	42	50 ml
KG36	2	3.509	45	50 ml
KG41	1	3.539	15	50 ml
KG44	1	1.203	21	50 ml
KG47	2	3.033	42	50 ml
KG48	1	1.732	16	50 ml
KG49	2	1.908	49	50 ml
KG56	1	0.785	15	50 ml
KG57	1	0.754	18.5	50 ml
KG58	2	3.122	40	50 ml
KG61	2	1.185	48	50 ml
KG62	2	3.277	40.5	50 ml
KG72	2	4.104	40.5	50 ml
KG73	2	2.636	49	50 ml
KG74	2	1.085	48	50 ml
KG76	2	4.712	40.5	50 ml

ANEXO E: peso de los viales (obtenidos del caldo) antes y después de la eliminación completa del cloruro de metileno.

CEPAS	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso neto del extracto (g)
KG04	12.920	13.074	0.154
KG09	12.861	12.869	0.008
KG10	13.103	13.153	0.050
KG12	12.991	13.058	0.067
KG14	13.178	13.218	0.040
KG17	12.930	12.983	0.053
KG21	13.087	13.117	0.030
CT25	12.893	12.946	0.053
KG32	12.975	13.004	0.029
KG36	13.062	13.177	0.115
KG41	12.930	13.053	0.123
KG44	13.117	13.145	0.028
KG47	13.002	13.063	0.061
KG48	13.050	13.080	0.030
KG49	12.941	13.013	0.072
KG56	12.989	13.042	0.053
KG57	13.050	13.063	0.013
KG58	13.038	13.114	0.076
KG61	12.862	12.911	0.049
KG62	13.049	13.094	0.045
KG72	12.978	13.006	0.028
KG73	12.921	12.971	0.050
KG74	12.978	13.045	0.067
KG76	12.981	13.015	0.034

ANEXO F: peso de los viales (obtenidos de la biomasa) antes y después de la eliminación completa del cloruro de metileno

CEPAS	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso neto del extracto (g)
KG04	12.678	12.687	0.009
KG09	11.008	11.161	0.153
KG10	13.110	13.186	0.076
KG12	12.949	13.005	0.056
KG14	12.974	13.028	0.054
KG17	13.056	13.161	0.105
KG21	10.679	10.725	0.046
CT25	12.644	12.674	0.030
KG32	12.731	12.836	0.105
KG36	10.787	10.815	0.028
KG41	12.691	12.700	0.003
KG44	13.053	13.176	0.123
KG47	12.965	13.024	0.059
KG48	10.847	10.926	0.079
KG49	13.027	13.050	0.023
KG56	12.657	12.679	0.008
KG57	13.068	13.071	0.003
KG58	12.976	13.210	0.234
KG61	11.073	11.119	0.046
KG62	10.784	10.834	0.050
KG72	10.866	10.959	0.093
KG73	13.120	13.148	0.028
KG74	10.920	10.978	0.058
KG76	12.998	13.133	0.135

ANEXO G: Tabla guía para realizar las diluciones del caldo.

CEPAS	Peso neto del extracto (mg)	Vol. adicionado para obtener []=1mg/ml	Vol. a repartir para c/ inóculo		
			<i>Pythium</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Fusarium sp</i>
KG04	154	1540	90	90	90
KG09	8	80µL	-	-	-
KG10	50	500 µL	90	90	90
KG12	67	670 µL	90	90	90
KG14	40	400 µL	90	90	90
KG17	53	530 µL	90	90	90
KG21	30	300 µL	90	90	90
CT25	53	530 µL	90	90	90
KG32	29	290µL	90	90	90
KG36	115	1150 µL	90	90	90
KG41	123	1230µL	90	90	90
KG44	28	280 µL	90	90	90
KG47	61	610 µL	90	90	90
KG48	30	300 µL	90	90	90
KG49	72	720 µL	90	90	90
KG56	53	530 µL	90	90	90
KG57	13	130 µL	-	-	-
KG58	73	730 µL	90	90	90
KG61	49	490 µL	90	90	90
KG62	45	450 µL	90	90	90
KG72	28	280 µL	90	90	90
KG73	50	500 µL	90	90	90
KG74	67	670 µL	90	90	90
KG76	34	340 µL	90	90	90

**"- Volumen insuficiente para preparar soluciones con la concentración deseada.

ANEXO H: Tabla guía para realizar las diluciones de la biomasa

CEPAS	Peso neto del extracto (mg)	Vol. adicionado para obtener []=1mg/ml	Vol.a repartir para c/ inóculo		
			<i>Pythium</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Fusarium sp</i>
KG04	9	90	-	-	-
KG09	153	1530µL	90	90	90
KG10	76	760 µL	90	90	90
KG12	56	560 µL	90	90	90
KG14	54	540 µL	90	90	90
KG17	105	1050 µL	90	90	90
KG21	46	460 µL	90	90	90
CT25	30	300 µL	90	90	90
KG32	105	1050µL	90	90	90
KG36	28	280 µL	90	90	90
KG41	3	30µL	-	-	-
KG44	123	1230 µL	90	90	90
KG47	59	590 µL	90	90	90
KG48	79	790 µL	90	90	90
KG49	72	720 µL	90	90	90
KG56	8	80 µL	-	-	-
KG57	3	30 µL	-	-	-
KG58	234	2340 µL	90	90	90
KG61	46	460 µL	90	90	90
KG62	50	500 µL	90	90	90
KG72	93	930 µL	90	90	90
KG73	28	280 µL	90	90	90
KG74	58	580 µL	90	90	90
KG76	135	1350 µL	90	90	90

**"- Volumen insuficiente para preparar soluciones con la concentración deseada.

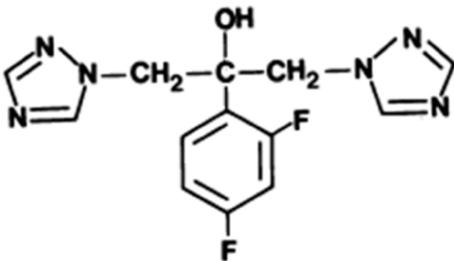
ANEXO I: Propiedades y usos del fluconazol.

Es de bajo peso molecular, soluble en agua, un bis-triazol fungistático, que ha demostrado poseer muchos usos clínicos contra dermatófitos, levaduras y hongos dimórficos. El fluconazol tiene una actividad comparada a la del ketoconazol en la inhibición de la enzima 14 alfa- demetilasa en hongos pero es mucho menos inhibitoria contra la demetilasa en mamíferos.

Este compuesto actúa mediante la inhibición de la enzima lanosterol 14-a demetilasa en el complejo citocromo P-450 de los hongos. El resultado es la inhibición de la conversión de lanosterol a ergosterol, con la consecuente depleción de ergosterol, acumulación de precursores y una pérdida de la integridad de la membrana fúngica.¹ Los imidazoles y en grado variable los triazoles, también interactúan con el complejo P-450 de la especie humana, provocando interferencias metabólicas con ciertas hormonas o interacciones con fármacos metabolizados bajo este sistema.

Farmacocinética: muchas de las ventajas de este compuesto están relacionadas con su perfil farmacocinético, la cual es distinta a los otros azoles. Está disponible en forma oral e intravenosa, y estas propiedades farmacocinéticas son independientes de ambas rutas de administración y formulación.

Uno de los mayores usos del fluconazol, es como profilaxis en pacientes inmunocomprometidos que están en riesgo de infecciones invasivas y superficiales de *Candida albicans*.



Estructura química del Fluconazol.