



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en ciencias Biológicas

**MICROMICETOS DE CENOTES DE YUCATÁN
COMO FUENTE DE PRODUCTOS
ANTIMICROBIANOS**

Tesis que presenta

MARTÍN PABLO ANTONIO MORENO PÉREZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Ciencias biológicas: opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, Julio 2014





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Micromicetos de cenotes de Yucatán como fuente de productos antimicrobianos” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro. Atentamente,

Dr. Felipe Augusto A. Vázquez Flota
Director de Docencia
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

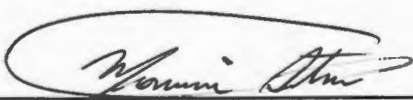
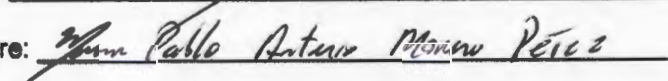
Mérida, Yucatán, México; a de de

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos experimentales, Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Firma: _____

Nombre: _____

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora de tesis, Dra. María Marcela Gamboa Angulo por su guía, consejos y durante mi estancia.
- A mi comité revisor: Dra. Gabriela Heredia Abarca, Dra. Blondy Canto Canché, Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García, Dra. Daisy Pérez Brito, Dr. Miguel Rosado Vallado y Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, a todos por sus sugerencias y consejos para enriquecer este documento de tesis.
- A la I.Q. Irma Leticia Medina Baizabal, al M.C. Miguel Tzec Simá y al Ing. Eduardo Balam Uc por su apoyo en las colectas; a Narcedalia Gamboa por el apoyo técnico en las búsquedas bibliográficas.
- A mis compañeros: Ángel, Dany, Karlita, Arely, Anita y Bella, y todos los que de alguna manera influenciaron en mi formación.
- A la Unidad de Biotecnología por las instalaciones proporcionadas para realizar el trabajo experimental y los cursos impartidos.
- Al CONACYT, por el financiamiento para el proyecto "Adiciones al estudio de hongos microscópicos tropicales con potencial biotecnológico en farmacia y agricultura (Proyecto No. 2009/CB131256)".
- Por el apoyo otorgado mediante la beca 020927311.

DEDICATORIA

A mi madre, Cristina Pérez Aguilar

A mi padre, Antonio Moreno González

A mi hermana Katinka Moreno Pérez

A mi cuñado Juan Manuel Núñez Alfonzo

Contenido

Índice.....	i
Índice de cuadros.....	iii
Índice de figuras.....	iv
ABSTRACT.....	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
REFERENCIAS.....	4
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS, OBJETIVO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	7
1.1 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS.....	7
1.2 HONGOS ACUÁTICOS.....	11
1.3 HONGOS MICROSCÓPICOS DEL SURESTE DE MÉXICO.....	13
1.4 LOS CENOTES DE YUCATÁN.....	16
1.5 METABOLITOS ANTIMICROBIANOS.....	18
1.6 BIOENSAYOS.....	19
1.7 FITOPATÓGENOS EVALUADOS.....	20
1.7.1 <i>Alternaria chrysanthemi</i> Simmons & Crosier.....	20
1.7.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	21
1.7.3 <i>Corynespora cassicola</i> (Berk. & M. A. Curtis).....	21
1.7.4 <i>Curvularia</i> sp.....	22
1.7.5 <i>Erwinia carotovora</i>	22
1.7.6 <i>Fusarium</i> sp.....	22
1.7.7 <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	23
1.7.8 <i>Xanthomonas campestris</i>	23
1.7.9 JUSTIFICACIÓN.....	24
II. HIPÓTESIS.....	25
III. OBJETIVO GENERAL.....	25
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
VI. REFERENCIAS.....	22
CAPITULO II. ASLAMIENTO Y CONSERVACION DE CEPAS FÚNGICAS.....	37
2.1 INTRODUCCIÓN.....	37
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	39
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.3.1 SITIO DE ESTUDIO.....	39
2.3.2 CONDICIONES MICROBIOLÓGICAS.....	41
2.3.3 TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA DETECCIÓN DE LOS HONGOS Y AISLAMIENTO DE CEPAS....	41
2.3.4 ASIGNACION DE CLAVES.....	42
2.3.5 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	43
2.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS.....	43
2.4.1 TAXONOMIA TRADICIONAL.....	43
2.4.1.1. MICROCULTIVO.....	43
2.4.2 TAXONOMIA MOLECULAR.....	44

2.4.3 MATERIAL BIOLÓGICO.....	44
2.4.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	44
2.4.6 PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	44
2.4.7 SECUENCIACIÓN.....	45
2.4.8 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....	45
2.4.9 CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	45
2.5 RESULTADOS.....	46
2.6 DISCUSIÓN.....	49
2.5 CONCLUSIONES.....	51
2.8 REFERENCIAS.....	52
CAPITULO III. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA.....	55
3.1 INTRODUCCIÓN.....	55
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	58
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.4 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA.....	58
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	59
3.6 RESULTADOS.....	60
3.7 DISCUSIÓN.....	68
3.8 CONCLUSIONES.....	71
3.9 REFERENCIAS.....	72
CAPÍTULO IV. Evaluación de extractos obtenidos de Micromicetos aislados de la Península de Yucatán contra microorganismos fitopatógenos	79
Resumen.....	80
Introducción.....	81
Materiales y métodos.....	82
Resultados.....	84
Discusión.....	85
Agradecimientos.....	87
Literatura citada.....	88
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	99
5.1 CONCLUSIONES.....	99
5.2. PERSPECTIVAS.....	101

Índice de cuadros

Cuadro 1.1	Hongos productores de metabolitos con aplicaciones en el control de enfermedades y plagas en la agricultura.....	9
Cuadro 1.2	Patentes de hongos con potencial aplicación en agricultura.....	10
Cuadro 1.3	Listado de aislados fúngicos obtenidos de muestras de cenotes del estado de Yucatán.....	14
Cuadro 2.1	Claves de las cepas fúngicas aisladas de los cenotes Oxola y Kikal	42
Cuadro 2.2	Aislados fúngicos purificados obtenidos de los cenotes Oxola y Kikal en Homún, Yucatán, México.....	48
Cuadro 3.1	Algunas especies de hongos reportadas con actividad tipo antagonista.....	57
Cuadro 3.2	Inhibición del crecimiento de cepas fitopatógenas confrontadas en un cultivo con cepas de micromicetos saprófitos. Datos correspondientes al sexto día de crecimiento en medio de cultivo PDA.....	65
Cuadro 4.1	Porcentaje de inhibición del crecimiento de hongos (2000 µg/ml) y bacterias (200 µg/ml) fitopatógenas causado por los extractos orgánicos de AcOEt y MeOH de hongos saprófitos aislados de cenotes de la Península de Yucatán.....	92
Cuadro 4.2	Evaluación antimicrobiana de los extractos fúngicos y sus particiones, obtenidos de hongos saprófitos aislados de cenotes de la Península de Yucatán contra hongos y bacterias fitopatógenos.....	96

Índice de figuras

Figura 1.1	a) Anillos apicales de las ascas de <i>Annulatascus biatriisporus</i> , b) Ascas de <i>Fluviatispora reticulata</i>	11
Figura 1.2.	Imágenes de los cuatro tipos de cenotes en la península de Yucatán. A) Cántaro, B) Cilíndrico, C) Aguada, D) Gruta.....	18
Figura 2.1	Municipio de Homún, Yucatán. República Mexicana.	40
Figura 2.2	Estrategia de aislamiento de los cenotes Oxola Y Kikal de la península de Yucatán.....	42
Figura 2.3	Cenotes seleccionados para el aislamiento de cepas fúngicas: A) Oxola, B) Kikal del municipio de Homún.....	46
Figura 3.1	Diferentes tipos de interacciones entre co-cultivos de hongos en medio agar papa dextrosa.....	55
Figura 3.2	Bioensayo de actividad antagónica por contacto entre hongos saprófitos y hongos fitopatógenos.....	59
Figura 3.3	Inhibición del crecimiento (%) del hongo fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> en PDA (disco inferior) confrontado con hongos saprófitos (disco superior) aislados de restos vegetales de dos cenotes del estado de Yucatán, al sexto día de cultivo.....	60
Figura 3.4	Inhibición del crecimiento (%) del hongo fitopatógeno <i>C. cassicola</i> en PDA (disco inferior) confrontado con hongos saprófitos (disco superior) aislados de restos vegetales de dos cenotes del estado de Yucatán, al sexto día de cultivo.....	61
Figura 3.5	Inhibición del crecimiento (%) del hongo fitopatógeno <i>Curvularia</i> sp. en PDA (disco inferior) confrontado con hongos saprófitos (disco superior) aislados de restos vegetales de dos cenotes del estado de Yucatán, al sexto día de cultivo.....	62
Figura 3.6	Inhibición del crecimiento (%) del hongo fitopatógeno <i>Fusarium</i> spp. en PDA (disco inferior) confrontado con hongos saprófitos (disco superior) aislados de restos vegetales de dos cenotes del estado de Yucatán, al sexto día de cultivo.....	63

RESUMEN

Con la finalidad de contribuir a la búsqueda de alternativas naturales en el control de hongos patógenos que afectan cultivos de importancia agrícola, en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, se están desarrollando investigaciones con hongos microscópicos nativos de la región peninsular. Estos microorganismos son ampliamente reconocidos como una fuente importante de metabolitos secundarios que tienen un considerable rango de actividad y diversidad estructural. Con estos antecedentes se planteó como objetivo del presente trabajo aislar cepas fúngicas de restos vegetales sumergidos en cenotes de la península de Yucatán para evaluar su potencial antagónico y el efecto antimicrobiano de sus extractos orgánicos en contra de bacterias y hongos fitopatógenos.

Se seleccionaron dos cenotes en los que se colocaron trampas y se recolectaron muestras de hojarasca sumergida, a partir de las cuales se aislaron y purificaron 49 cepas fúngicas. Éstas se evaluaron en un ensayo de actividad antagónica contra los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp., y *Fusarium* sp. En total se detectaron 15 cepas con capacidad para inhibir entre un 50–60% del crecimiento en al menos uno de los fitopatógenos evaluados. La cepa *Hypocrea lixii* OSN-37 presentó el mayor potencial antagónico al inhibir en rango del 61–77% el crecimiento de las cuatro cepas fitopatógenas evaluadas. Las cepas *Pestalotiopsis mangiferae* OH-02 y la cepa *Rhizoctonia solani* OSE-73 presentaron un potencial antagónico ligeramente menor al inhibir el crecimiento entre 59–64% de tres fitopatógenos.

Todas las cepas se cultivaron en arroz fermentado para obtener sus extractos en metanol, acetato de etilo y sus fracciones. En total 98 extractos fueron evaluados mediante un ensayo de dilución en microplaca contra los fitopatógenos *Alternaria chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis* y las bacterias *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris*. El 71% de los extractos tuvieron efecto antimicrobiano contra al menos uno de los fitopatógenos. Los extractos correspondientes a las cepas *Penicillium* sp. OSE-61, *Hypocrea lixii* OSN-37 y *Fusarium* OH2-30 presentaron los mayores efectos de inhibición de las cepas evaluadas. Esta investigación contribuye a subsanar el escaso conocimiento que se tiene en México sobre la actividad biológica de los micromicetos nativos de los restos vegetales sumergidos en los cenotes de Yucatán.

ABSTRACT

The Biotechnology Unit of the Scientific Research Center of Yucatan, in order to contribute to the search for natural alternatives for controlling pathogenic fungi affecting crops of agricultural importance, is conducting research with native microscopic fungi from peninsular region. These microorganisms are widely recognized as an important source of secondary metabolites that have a wide range of activity and structural diversity. With this background arose aim in this paper to isolate fungal strains from the sinkholes of the Yucatan Peninsula and evaluate their antagonistic potential and antimicrobial effect of the organic extracts against phytopathogenic microorganisms.

Two sinkholes were selected and submerged leaf litter was collected, from which were isolated and purified 49 fungal strains. These were evaluated in a test antagonist against the phytopathogenic fungi: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassicola*, *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp. The results detected 15 strains with the ability to inhibit growth between 50-60% against at least one of the phytopathogen evaluated. *Hypocrea lixii* OSN-37 strain showed the highest antagonistic potential to inhibiting the mycelia growth (61-77%) of the four plant pathogenic strains. *Pestalotiopsis mangiferae* OH-02 and *Rhizoctonia solani* OSE- 73 inhibited growth by 50 % over three challenged phytopathogens. Subsequently, all strains were grown in fermented rice to obtain the corresponding ethyl acetate extracts and methanol. The 98 extracts were tested in a microdilution assay against the phytopathogen *Alternaria chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Erwinia carotovora* and *Xanthomonas campestris*. A total of 71 % of the extracts showed antimicrobial activity against one or more pathogens. Strains corresponded to *Penicillium* sp. OSE-61, *Hypocrea lixii* OSN-37 and *Fusarium* OH2-30 which showed the highest inhibitory effects to plant pathogenic strains evaluate. This research contributes to improve our limited knowledge about the biological activity of native micromicetos from submerged plant debris in the sinkholes of Yucatan.

I. INTRODUCCIÓN

El aumento desmedido de la población mundial así como la demanda creciente de su alimentación, requiere elevar la producción y optimización de las actividades agrícolas. Sin embargo, a nivel mundial la producción agrícola se enfrenta a serias problemáticas debido a una gran variedad de factores. Entre los principales, se encuentran las enfermedades ocasionadas por microorganismos fitopatógenos, los cuales pueden ocasionar la pérdida parcial o total de los cultivos (Bajpai y Kang, 2010). Para controlar a los fitopatógenos comúnmente se emplean agroquímicos sintéticos, estos productos aun cuando tienen eficacia comprobada, pueden tener efectos secundarios adversos en la salud humana y el ambiente. Adicionalmente, muchos patógenos vegetales han desarrollado resistencia hacia determinadas moléculas, lo que ha incrementado la utilización de una mayor cantidad y diversidad de agroquímicos para su control, elevando así los costos de producción y ocasionando alteraciones nocivas para el ambiente.

Ante este panorama la búsqueda de productos naturales para la protección de cultivos agrícolas mediante la utilización de diversas especies fúngicas resulta una alternativa promisorio desde el punto de vista ambiental y económico. La utilización directa de los hongos como control biológico para el manejo de fitopatógenos (Molina Mercader *et al.*, 2006); así como el empleo de sus metabolitos secundarios ha sido motivo de múltiples investigaciones científicas las cuales se han incrementado notablemente en los últimos años (Lee, 2008; Prapagdee *et al.*, 2008; Gloer, 2007).

En particular, para los hongos microscópicos también llamados micromicetos, se ha documentado que son fuente de una gran cantidad y variedad estructural de metabolitos con propiedades biológicas (Gloer, 2007; Hawksworth, 2004). Por otra parte, los metabolitos fúngicos (MF) son ampliamente reconocidos como una importante fuente de productos naturales con aplicaciones en la industria farmacéutica y la agricultura (Geris *et al.*, 2008; Reino *et al.*, 2008; Gloer, 2007). Estos MF pueden ser fácilmente biodegradables, son de baja persistencia en el ambiente y frecuentemente tienen baja toxicidad en humanos y plantas (Dayan *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2007). Otra ventaja en el empleo de los MF reside en que fácilmente se pueden desarrollar métodos para su producción a gran escala, así mismo los micromicetos representan fuentes renovables y cuyo período de crecimiento es relativamente corto en comparación con los recursos vegetales (Gloer, 2007; Seo *et al.*, 2005). A pesar de que diversas investigaciones han demostrado la importancia de los productos

microbianos derivados de los micromicetos, el numero de especies estudiadas y empleadas comercialmente en agricultura, aún son escasas en comparación con la gran diversidad de especies fúngicas estimadas (Hawksworth, 2001). Esta situación es aun más crítica para los hongos que proliferan las regiones tropicales (Lee *et al.*, 2008) en donde prácticamente se desconoce la magnitud de su diversidad por lo tanto de su potencial biotecnológico.

En la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) se han realizado trabajos basados principalmente en la bioprospección de hongos de regiones tropicales del sureste de México. Reyes-Estebanez *et al.* (2011) aislaron 47 especies de hongos de restos vegetales, que se evaluaron contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas campestris*, los hongos fitopatógenos *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y el oomiceto *Phytophthora aphanizomenae*. Los resultados demostraron actividad antimicrobiana en 18 aislados contra al menos una cepa patógena evaluada y siete con actividad de amplio espectro, en dicho estudio la especie *Cylindrium elongatum* exhibió la más alta y amplia capacidad antimicrobiana. Posteriormente Gamboa-Angulo *et al.* (2012) a partir de 96 especies fúngicas aisladas de dos cenotes de Yucatán, encontraron que el 53% tuvo una actividad de amplio espectro contra diversos organismos fitopatógenos. Los autores mencionados reportan que los aislados identificados como *Acremonium pseudozealandicum*, *Beltrania rhombica*, *Fusarium incarnatum* y *Gliocladium penicilloides* fueron los mas activos.

Los estudios realizados, revelan el enorme potencial biológico y químico de la microbiota de ambientes tropicales. Con estos antecedentes se justifica continuar la búsqueda de micromicetos en ecosistemas dulceacuícolas tan peculiares como son los cenotes. En el presente trabajo los hongos aislados y sus extractos se evaluaron mediante un bioensayo de actividad antagónica y en un bioensayo de dilución en microplaca, ambos dirigidos hacia el control biológico de patógenos de alta importancia en cultivos agrícolas. De esta forma se pretende generar productos de origen natural, promoviendo el desarrollo de alternativas ecológicamente sostenibles.

I.1 REFERENCIAS

- Bajpai, V. y S.C. Kang (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. Journal of the American Oil Chemists Society. 87:327–336.
- Dayan, F.E., L. Charles., L. Cantrell. y O. S. Duke (2009). Natural products in crop protection. Bioorganic y Medicinal Chemistry 17 4022–4034.
- Dong, J., Y. Zhu., H. Song., R. Li., H. He., H. Liu., R. Huang., Y. Zhou., L. Wang., Y. Cao y K. Zhang (2007). Nematicidal Resorcylics from the Aquatic Fungus *Caryospora callicarpa* YMF1.01026. Journal Chemistry Ecology. 33:1115–1126.
- Gamboa-Angulo, M., S.C. De la Rosa-García, G. Heredia-Abarca y I. Medina-Baizabal (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatan peninsula, Mexico. African Journal of Microbiology. 6:2305–6:230. DOI: 10.5897/AJMR11.1129.
- Geris, R., E. Rodrigues-Fo., H.H García da Silva. y I. García da Silva. (2008). Larvicidal Effects of Fungal Meroterpenoids in the Control of *Aedes aegypti* L., the Main Vector of Dengue and Yellow Fever. Chemistry & Biodiversity. Vol. 5.
- Gloer, J.B. (2007). Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. Environmental and Microbial Relationships, 2nd Edition. The Mycota IV C.P. Kubicek. I. S. Druzhinina (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, 105:1422–1432.
- Hawksworth, D.L. (2004). Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. Studies in Mycology 50: 9–18.
- Lee, Y.K., M. Senthilkumar., J.H. Kim., K. Swarnalakshmi y K. Annapurna (2008). Purification and partial characterization of antifungal metabolite from *Paenibacillus lentimorbus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:3057–3062.
- Molina-Mercader, G., S. Zaldúa-Flores., G. González-Vargas y E. Sanfuentes-Von Stowasser (2006). Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque 27 (2) 126-134.

- Prapagdee, P., C. Kuekulvong y S. Mongkolsuk (2008). Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *International Journal of Biological Sciences*. 4(5):330-337.
- Reyes-Estebanez, M., E. Herrera-Parra., J. Cristóbal-Alejo., G. Heredia-Abarca., B. Canto-Canché.I. Medina-Baizabal y M. Gamboa-Angulo (2011). Antimicrobial and nematicidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in México. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5 (9), 1083-1089 pp.
- Seo, J., Y.G. Lee., S.D. Kim., C.J. Cha., J.H. Ahn y H. G. Hur (2005). Biodegradation of the Insecticide N,N-Diethyl-m-Toluamide by Fungi: Identification and Toxicity of Metabolites. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 48, 323–328.

CAPITULO I. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS, OBJETIVO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.1 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS

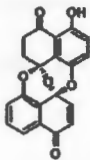
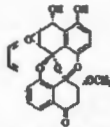
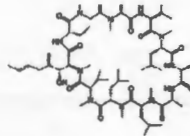
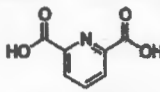
Los hongos se ubican dentro del Reino Fungi, el cual se agrupan organismos eucariontes, heterótrofos, cuya reproducción puede ser sexual y/o asexual, mediante la producción de una gran cantidad de propágulos o esporas. Los hongos pueden ser clasificados de acuerdo de acuerdo al substrato que colonizan y del que obtienen sus nutrimentos; de esta forma existen especies parásitas, saprobias y simbioses. Por su tamaño se distinguen especies macrosópicas y microscópicas, estas últimas se caracterizan por formar sus esporas en estructuras que miden menos de un milímetro, por lo que generalmente para observarlas en detalle se requiere del empleo de un microscopio, más del 60% de las especies de hongos conocidos son microscópicos (Heredia, 2008). Los cálculos conservadores sobre la magnitud de la biodiversidad sugieren que podrían existir más de 1.5 millones de especies de hongos, de las cuales sólo el 6 o 7% han sido descritas (Schneider *et al.*, 2008; Hawksworth, 2001).

Los hongos microscópicos, también denominados micromicetos, son fuente particularmente prolífica de productos naturales biológicamente activos. De ellos, se han obtenido compuestos que han sido usados de manera exitosa en la industria farmacéutica, obteniendo antiepilépticos, bactericidas, inmunosupresores, así como también enzimas inhibidor as contra importantes enfermedades como son al Alzheimer, cáncer y diabetes, entre otros, (Demain and Sánchez, 2009; Cienieka-Oslonkiewicz *et al.*, 2007). En la industria agropecuaria algunas especies han sido útiles y sus compuestos químicos (Cuadro 1.1), han sido aplicados como una alternativa a los productos químicos antimicrobianos, plaguicidas e insecticidas sintéticos (Geris *et al.*, 2008; Reino *et al.*, 2008; Gloer, 2007). A pesar de que estos organismos no han sido explorados de manera sistemática en diversos ecosistemas, existe evidencia en la literatura de su potencial químico y biológico. Como puede observarse en el Cuadro 1.2, la generación de patentes que involucran estos organismos está en auge; en tan sólo nueve años (1993-2001) se reportaron 718 referencias de metabolitos bioactivos en hongos (Gloer, 2007). Considerando que aproximadamente el 95% de los hongos no se han cultivado en laboratorio (Kaeberlein *et al.*, 2002), la posibilidad de descubrir nuevos metabolitos es muy alta. Además con

la utilización de herramientas relativamente recientes, como la bioinformática y la Ingeniería genética se puede incrementar el manejo, el conocimiento y la optimización de los cultivos fúngicos (Bhadury *et al.*, 2006).

La búsqueda de fuentes alternas de metabolitos secundarios bioactivos ha llevado a los investigadores a ampliar y direccionar las exploraciones hacia ambientes ignorados, tales como sedimentos marinos y dulceacuícolas, hongos asociados a hospederos específicos, especies endófitas, crípticas, entre otros (Hawksworth, 2001). Los ecosistemas acuáticos tanto salobres como dulceacuícolas representan una fuente de hongos escasamente estudiados, algunos de estos microorganismos tienen la capacidad para producir metabolitos secundarios únicos e inusuales debido a las condiciones ambientales particulares en que se desarrollan, tales como pH, temperatura y salinidad en que se desarrolla (Dong *et al.*, 2009; Junghanns *et al.*, 2008; Bhadury *et al.*, 2006).

Cuadro 1.1 Hongos productores de metabolitos con aplicaciones en el control de enfermedades y plagas en la agricultura.

Especie	Metabolito	Estructura	Actividad	Patógeno	Referencia
<i>Edenia gomezpompae</i>	Preusomerina EG1, Preusomerina EG2, Preusomerina EG3 Preusomerina EG4		Antifúngico	<i>Colletotrichum</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Guignardia mangifera</i>	Macías-Rubalcava et al. (2008)
<i>Trichoderma</i> sp.	Antraquinona 9,10-dioxoamtraceno		Agente biocontrol	<i>Nectria galligena</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Rhizoctonia solanii</i>	Reino et al. (2008)
<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ciclosporina		Agente biocontrol	<i>Cordyceps subsessilis</i>	Schneider et al. (2008)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Acido Dipicolínico		Bioinsecticida	<i>Bemisia tabaci</i> <i>B. argentifolii</i>	Asaff, (2005)

Cuadro 1.2 Patentes obtenidas de cepas de hongos con potencial aplicación en agricultura.

Especie	Actividad	Compuesto	Inventor (s)	**Dato bibliografico
<i>Arthrobotrys conoides</i>	Fitosanidad	N.E	Panchaud-Mirabel Elisabeth.	US2012020928 (A1) — 2012-01-26
<i>Aspergillus ustus</i>	Agente biocontrol	N.E	Coles, Robin Bruce.	AU2010237601 (A1) — 2011-11-03
<i>Epicoccum purpurascens</i>	Fungicida	Epipyrona A-C	Van Ginkel Roel*	US2012108526 (A1) — 2012-05-03
<i>Glomus claroideum</i>	Promotor del crecimiento vegetal	No especificado	Eom Ahn Heum*	KR20110125551 (A) — 2011-11-21
<i>Meira argovae</i>	Acaricida, bactericida y fungicida	4,5-Dihydroxyindan-I-uno	Sztejnberg, Abraham*	CA2774113 (A1) — 2011-03-24
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Bioplaguicida (entomopatògeno)	N.E	Stamets Paul.	US2012070414 (A1) — 2012-03-22
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Agente biocontrol	N.E	Davies, Peter Howard*	CA2766325 (A1) — 2010-12-29
<i>Muscodor albus</i>	Bactericida, fungicida y nematocida	N-metil-N nitrosoisobutyramida	Jimenez Jorge*	US2012058058 (A1) — 2012-03-08
<i>Muscodor sp.</i>	Bactericida, fungicida y nematocida	N.E	Strobel Gary* Gasich Elena Leonidovna*	US2012114610 (A1) — 2012-05-10
<i>Phoma complanata</i>	Mico-herbicida	N.E	Leonidovna*	RU2439141 (C1) — 2012-01-10
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Biorremediacion de micotoxinas	N.E	Tranquil Dennis*	US2012027747 (A1) — 2012-02-02
<i>Trichoderma sp.</i>	Promotor del crecimiento vegetal	N.E	Damar Lopez-Arredondo*	MX2011005282 (A) — 2011-09-06

N.E = no especificado. * Y colaboradores.

**Clave para acceder a la patente.

1.2 HONGOS ACUÁTICOS

Los ecosistemas acuáticos son una fuente prolífica de hongos, en los estratos superiores de los ríos, en los sedimentos del fondo, los humedales, las zonas de litorales, los estanques y los lagos albergan una importante cantidad de restos vegetales sumergidos, los cuales son sustratos que favorecen el desarrollo de una diversa comunidad de hongos microscópicos (Dong *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2007).

Los hongos acuáticos son definidos como aquellos que en una etapa o durante la totalidad de su ciclo de vida dependen del agua para su desarrollo, incluyen especies que crecen en sustratos que son predominantemente acuáticos o semi-acuáticos (Hao *et al.*, 2005). Debido a que la materia orgánica sumergida en agua se encuentra en proceso de descomposición, la proliferación de una gran diversidad de micromicetos es favorecida. Los hongos poseen la capacidad para descomponer materia orgánica y degradar microcontaminantes (Junghanns *et al.*, 2008). Algunas de las especies que habitan en los restos sumergidos presentan ornamentaciones y/o adaptaciones morfológicas para facilitar su adhesión al sustrato en el ambiente acuático, tales como estructuras tipo rizoides que permiten a los ascomas colgarse y facilitar la dispersión de sus ascosporas mediante vainas mucilaginosas, ascas con anillo apical (Fig. 1.1) que facilitan la expulsión de ascosporas en el aire o bajo el agua, entre otras (Hyde y Goh, 2003; Pinruan *et al.*, 2002). Estas adaptaciones les permiten colonizar materia orgánica como desechos herbáceos, hojas, plantas (Hao *et al.*, 2005) y madera sumergida (Vijaykrishna y Hyde, 2006).

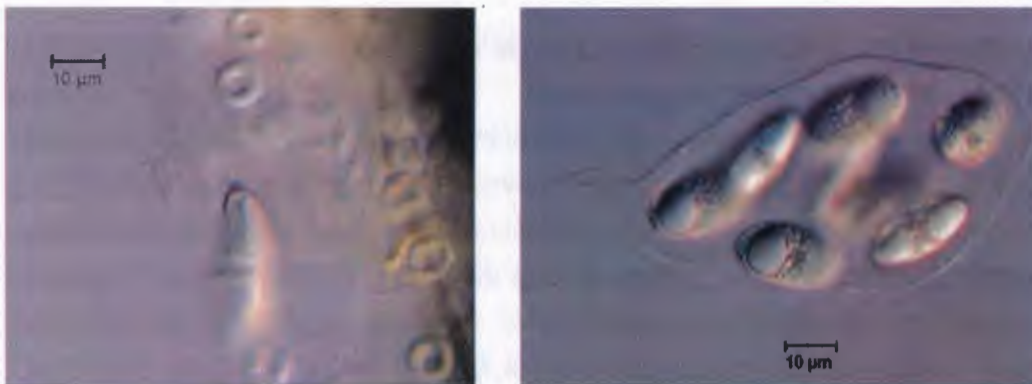


Figura 1.1 a) Anillos apicales de las ascas de *Annulatascus biatriisporus*, b) Ascas de *Fluviatisspora reticulata* (Fungi.life. 2014).

Los hongos son el segundo grupo de organismos eucariontes más diverso en especies, la mayoría ha sido estudiado en ambientes terrestres y son relativamente pocos los que han sido aislados de hábitats acuáticos (Chavarria *et al.*, 2010; Vijaykrishna *et al.*, 2006).

A partir de hongos de ambientes marinos se han aislado más de 272 compuestos con diversa actividad como antibacteriales, anticancerígenos, antiinflamatorios y antivirales (Bhadury *et al.*, 2006), entre los que se encuentra *Caryospora callicarpa* de la cual se han extraído compuestos con actividad nematocida (Dong *et al.*, 2007); de especies del género *Coniothyrium* se han detectado metabolitos anticancerígenos, antibacteriales, y antifúngicos (Damm *et al.*, 2008); de *Clavariopsis aquatica*, *Myrioconium* sp. y de especies del género *Phialophora* se han reportado moléculas biotransformadoras (Jugghanns *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2007); de *Glarea lozoyensis* se han obtenido moléculas con propiedades antifúngicas (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006). Adicionalmente, en otras especies sin ubicación taxonómica precisa se han detectado estructuras análogas a la preusomerina con actividad antibacterial, antifúngica y antiplasmódica (Dong *et al.*, 2008).

Entre las 97,330 especies de hongos descritas, sólo se han registrado 3,047 de ambientes acuáticos de las cuales 1,384 especies son de agua dulce (Kirk *et al.*, 2008; Shearer *et al.*, 2007; Hawksworth, 2001; Hyde, 2001). Para México, prácticamente se desconoce la diversidad de estos organismos, entre los pocos registros publicados se encuentran ocho ascomicetos dulceacuícolas; tres de Xochimilco, Distrito Federal (González y Chavarria, 2005), dos de restos vegetales sumergidos en Veracruz (Castañeda *et al.*, 2005) y tres en la Laguna de las Ilusiones, Tabasco (Rosique *et al.*, 2008).

Una particularidad que se presenta en la península de Yucatán es la formación de pozos naturales o estanques de agua dulce denominados cenotes (del maya ts'onoót: caverna con agua), los cuales se originan debido a que la mayor parte de la superficie del territorio de la Península está constituida por piedra caliza altamente permeable (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Existe varios tipos de cenotes: a cielo abierto, semiabiertos y subterráneos o en gruta. Estos sistemas acuíferos son abundantes en la región y poco explorados desde el punto de vista microbiológico, debido a varios factores como su aislamiento, profundidad y difícil acceso (Schmitter - Soto *et al.*, 2002; MacSwiney *et al.*, 2007). Por las condiciones ambientales particulares que

prevalecen en los cenotes se ha comprobado que son ecosistemas promisorios para la búsqueda y el aislamiento de microorganismos con actividad biológica de interés biotecnológico (De la Rosa-García *et al.*, 2008).

1.3 HONGOS MICROSCÓPICOS DEL SURESTE DE MÉXICO

Las regiones tropicales son las que se encuentran entre las coordenadas 23° 27" N y 23° 27" S del planeta, con una temperatura media anual superior a 18° C y una precipitación total mayor que 700 mm. El trópico incluye tanto ambientes húmedos como sub-húmedos, correspondientes con la distribución de los tipos de clima "A", de acuerdo a la descrita por Köppen (1931). El trópico mexicano se distribuye en las áreas húmedas del país, que abarcan las llanuras costeras del Golfo de México y de la vertiente del pacífico, la plataforma yucateca y en el istmo de Tehuantepec. La región sureste incluye los estados de Campeche, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán (Alcocer *et al.*, 2010; Sánchez-Crispín y Propin-Frejomil, 2001).

En México, el estudio de los hongos microscópicos se encuentra en una fase primaria, la mayoría de las publicaciones sobre estos organismos se han enfocado al conocimiento de su diversidad y taxonomía (Heredia *et al.*, 2008). En particular, para la región Sureste son escasas las contribuciones que documentan la presencia de especies microscópicas en áreas naturales (Mercado *et al.*, 1997; Heredia y Mercado, 1998; Heredia *et al.*, 2000). Para el estado de Yucatán, en los últimos años se han descrito 2 nuevas especies y un género nuevo (Heredia *et al.*, 2012; Heredia *et al.*, 2013), este último denominado como *Minteriella cenotigena* fue colectado sobre material vegetal sumergido en un cenote. De igual forma, el número de publicaciones dirigidas al conocimiento del perfil biológico de estos hongos aun es precario y de reciente circulación.

Entre los pocos trabajos que han explorado el potencial biotecnológico de aislamientos provenientes de micromicetos del trópico mexicano, están los de Trigos *et al.* (2005), quienes evaluaron 14 micromicetos aislados de suelo y restos vegetales del estado de Veracruz contra cepas bacterianas de importancia en la salud humana.

Con material entomológico de la selva de Quintana Roo Torres-Barragán *et al.* (2004) aislaron varias especies de hongos, entre ellas *Fusarium oxysporum* que demostró

actividad para el control biológico de *Trialeurodes vaporariorum*, plaga de hortalizas de importancia económica. Posteriormente Macías-Rubalcava *et al.* (2008) reportaron el hongo endófito *Edenia gomezpompae* aislado de las hojas de *Callicarpa acuminata* de la reserva ecológica "El eden", el cual presentó actividad biológica significativa contra los fitopatógenos *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*.

En la Unidad de Biotecnología del CICY se han realizado aislamientos de hongos de Tabasco y Yucatán (Cuadro 1.3). Reyes-Estebanez *et al.* (2011) aisló 47 cepas de restos vegetales del sureste de México, de las cuales identificó 15 a nivel de especie y 22 a nivel género. Se evaluaron contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *E. carotovora*, *S. aureus*, *Xanthomonas campestris* y los hongos fitopatógenos *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *F. oxysporum*, así como contra el nemátodo *Meloidogyne incognita*. Los resultados mostraron actividad antimicrobiana en 18 aislamientos contra al menos uno de los patógenos evaluados, siete de ellos fueron de amplio espectro. La especie que presentó mayor actividad antimicrobiana fue *Cylindrium elongatum*, seguida de *Memnoniella* sp. MR33 con actividad moderada y *Selenosporella* sp. GH26 con actividad nematocida evidente.

Por otra parte, Gamboa-Angulo *et al.* (2011) evaluaron 96 especies fúngicas, obtenidas de dos cenotes de Yucatán, contra diversos organismos fitopatógenos; el 53% tuvo actividad de amplio espectro, destacándose las especies *Acremonium pseudozealandicum*, *Gliocladium penicilloides*, *Gliocladium* sp. y *Penicillium citrinum*, además de las especies *Beltrania rhombica*, *Fusarium* sp. y seis aislados con actividad antifúngica no identificados. Esta aportación junto con Gamboa-Angulo *et al.* (2013) son las únicas en las que se han estudiado cepas de micromicetos aislados de muestras de cenotes.

Cuadro 1.3 Listado de aislados fúngicos obtenidos de muestras de cenotes del estado de Yucatán.

Especie	Localidad	Especie	Localidad
<i>Acremonium kiliense</i> 1TZA31	3	<i>Pestalotiopsis maculans</i> 1XHH1A	2
<i>Acremonium pseudozealandicum</i> 1XHH3B	2	<i>Phaeoisariopsis bataticola</i> MR50	1
<i>Alternaria</i> sp. TH1	3	<i>Ramichloridium apiculatum</i> MR39	1
<i>Beltrania rhombica</i> 1TZH26	3	<i>Redbia</i> sp. MR34	1
<i>Beltrania</i> sp. TH12	3	<i>Spadicoides</i> sp. MR52	1
<i>Beltrania</i> sp. TH29	3	<i>Stagonospora</i> sp. TA34	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 1XHH1E	3	<i>Stachybotrys nephrospora</i> 1TZH10	3
<i>Cladosporium</i> sp. 2XHA10	2	<i>Verticillium</i> sp. TH18	3
<i>Clonostachys rosea</i> 1TZH27	3	<i>Verticillium</i> sp. TH28	3
<i>Colletotrichum</i> sp. 1XHH1G4	2	<i>Volutella</i> sp. TH22	3
<i>Cylindrocarpon congoense</i> 1XHH8A	2	<i>Volutella</i> sp. TH24	3
<i>Cylindrosyndonium</i> sp. MR38	1	<i>Volutella</i> sp. TH31	3
<i>Emericella varicolor</i> 1XHRp1A	2	<i>Zygosporium minus</i> 1TZH25	3
<i>Fusarium</i> sp. XH9A	2	No identificada MR30	1
<i>Fusarium</i> sp. XH9B	2	No identificada MR35	1
<i>Fusarium</i> sp. XH1F	2	No identificada TA11	3
<i>Fusarium</i> sp. XH1G3	2	No identificada TA13	3
<i>Fusarium</i> sp. XH1Ga	2	No identificada TA14	3
<i>Fusarium</i> sp. 2XA1	2	No identificada TA20	3
<i>Fusarium</i> sp. 2XA6	2	No identificada TA21	3
<i>Fusarium</i> sp. 2TA1	3	No identificada TA22	3
<i>Fusarium</i> sp. TA54	3	No identificada TA22	3
<i>Gliocladium penicillioides</i> 1TZH21	3	No identificada TA41	3
<i>Gliocladium</i> sp. TH16	3	No identificada TA53	3
<i>Glomastix</i> sp. MR37	1	No identificada 2XA11	2
<i>Myrothecium</i> sp. TH38	3	No identificada 2XA2	2
<i>Papulaspora pallidula</i> 1XHH3A	2	No identificada 2XA4	2
<i>Penicillium citrinum</i> 1XHRp1B	2		

1. Dzibilchaltun, Mérida, Yucatán, 2. Cenote X"kan ho ho che, 3. Cenote Temozón.
Reyes-Estebanez *et al.* (2011)

1.4 LOS CENOTES DE YUCATÁN

El suelo de tipo calizo cubre 20 millones de km², el 12% de la superficie terrestre (IUGS, 2007). Su distribución se encuentra en regiones del Caribe, Australia, Bélgica, Croacia, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estados Unidos de Norteamérica, Francia, Reino Unido, Suiza y Turquía, entre otros (Antigüedad *et al.*, 2007; Brinkmann, 2010; Özkan *et al.*, 2010). En México alrededor de 467, 978 km², están cubiertos por suelo calizo, equivalentes a 23.9% de la superficie nacional y en el estado de Yucatán ocupan más de 80% de su superficie (INEGI, 1997); la mayor parte se encuentra en el noroeste de la península de Yucatán, donde la capa subyacente es de roca exclusivamente calcárea (Mejía-Ortíz *et al.*, 2007), constituida por varios cientos de metros de espesor sub-horizontal (Šafanda *et al.*, 2005). El suelo de piedra caliza es altamente permeable, lo que permite que el agua de las precipitaciones fluviales se filtre rápidamente dentro del acuífero o se pierda por evapotranspiración, ocasionando que la superficie esté ausente de ríos (Carruthers *et al.*, 2005; Hodell *et al.*, 2005). En algunos casos bajo tierra se encuentra un extenso sistema de cuevas y cavernas que se intercomunican entre sí; estas características geomorfológicas se deben a la combinación de mecanismos de construcción, disolución del carbonato y colapso de la piedra caliza (MacSwiney *et al.*, 2007; Mejía-Ortíz *et al.*, 2007). Este efecto es más notorio en áreas donde se encuentra una capa mayor de tierra, ya que el CO₂ puede incrementar la capacidad de disolver las rocas (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Por sus características topográficas en la península de Yucatán se favorecen la formación de cenotes, cuya profundidad varía desde unos cuantos metros hasta más de 100 metros (Šafanda *et al.*, 2005). Los cenotes son los principales cuerpos de agua para humanos y animales en la región (MacSwiney *et al.*, 2007; Mejía-Ortíz *et al.*, 2007). Se estima que en la Península de Yucatán se encuentran aproximadamente 7,000 formaciones geológicas con estas características (Steinich *et al.*, 1996). Sus ubicaciones no son precisas, debido a que por lo general se encuentran rodeados de una densa capa de vegetación heterogénea, esta característica es más notoria en los estados de Campeche y Quintana Roo (Beddows *et al.*, 1999; MacSwiney *et al.*, 2007) donde la vegetación es más abundante.

La clasificación de los cenotes (Figura 1.3), distingue cuatro tipos característicos: A) cántaros (*ch'e'n* en maya) en los cuales la conexión con la superficie es más estrecha que el diámetro del cuerpo de agua, B) cilíndrico (*ts'onot*) con paredes verticales y la abertura equivale al diámetro del cuerpo de agua, C) aguadas (*ak'al che'*) que son

depósitos de aguas superficiales azolvadas, D) grutas (*aktun*) que tienen una entrada horizontal y sección seca (Schmitter-Soto *et al.*, 2002; Mejía-Ortíz *et al.*, 2007). Los cenotes lóticos tienen un flujo de agua continuo con aguas transparentes debido a la baja disponibilidad de fuentes de nitrógeno y fósforo, limitando la fotosíntesis de fitobentos y de plantas epífitas en los bordes del cenote. Los cenotes lénticos (intercambio de agua menor con el acuífero) son ricos en nutrientes y fitoplancton (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). La cadena alimenticia es relativamente simple, con pocos niveles tróficos, que se puede clasificar en tres grupos, basados en la concentración del contenido de clorofila *a* (*ch*) del fitoplancton: oligotróficos ($< 3 \text{ mg/ch m}^3$), mesotróficos ($> 3\text{--}20 \text{ mg/ch m}^3$) y eutróficos ($> 20\text{--}150 \text{ mg/ch m}^3$), siendo los mesotróficos los más comunes (Carlson, 1977).

En el estado de Yucatán se han registrado 2,241 cenotes. Estos se encuentran en mayor número en los municipios de Tizimín (235), Tecoh (128), Homún (114), Buctutz (106), Valladolid (99), Chocholá (88), Temozón (70), Tunkás (69), Cuzamá (68), Kopomá (54) y Hunucmá con 51 (SEDUMA, 2014). Aunque los cenotes de la Península de Yucatán son numerosos han sido escasamente explorados en cuanto a su microflora nativa y al potencial biotecnológico que representan.



Figura 1.2 Imágenes de los cuatro tipos de cenotes existentes en la península de Yucatán. A) Cántaro, B) Cilíndrico, C) Aguada, D) Gruta. (SEDUMA, 2014).

1.5 METABOLITOS ANTIMICROBIANOS

Los microambientes son estructuras ecológicamente complejas, en donde coexiste una vasta cantidad de microorganismos procariontes y eucariontes que establecen interacciones como antibiosis, comensalismo, parasitismo y simbiosis, las cuales pueden ser perjudiciales o benéficas para su desarrollo y crecimiento, todos ellos influenciados por los factores bióticos del medio.

Para sobrevivir, algunos microorganismos producen compuestos que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de otros microorganismos competidores. Estos compuestos son conocidos como antimicrobianos, los cuales tienen un modo de acción único que pueden causar daños a la célula microbiana competidora a través de diversos mecanismos de acción (Palacios-López *et al.*, 2011). En bacterias, estos mecanismos de acción son diversos y pueden actuar sobre la membrana celular,

inhibiendo la formación de la pared celular mediante el bloqueo de la síntesis de péptidoglicanos, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, como lo hacen la tetraciclina, minociclina y doxiciclina, las cuales se unen a la subunidad 30S del ribosoma y bloquean la adherencia del ARN de transferencia (ARNt).

Por su parte, los compuestos antimicóticos fúngicos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas. Se pueden clasificar basados en su estructura en polienos, azoles y alilaminas; por su origen y de acuerdo a su espectro de acción (Arenas, 2005; Diomedi, 2004). Su mecanismo de acción se enfoca básicamente en tres sitios: membrana celular, pared celular y núcleo de la célula fúngica. Los que actúan sobre la membrana celular. Eventualmente forman poros que alteran la permeabilidad ya sea uniéndose al ergosterol o mediante la inactivación de enzimas como la C-14- α -dimetilasa, lo que provoca una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes, causando la muerte celular. Los lipopéptidos, que actúan sobre la pared celular del hongo e inhiben la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La carencia de glucanos en la pared celular la debilita y la expone al estrés osmótico, provocando la muerte celular. Los antimetabolitos, los cuales actúan sobre el núcleo de la célula fúngica, tales como la 5-fluorocitosina, la cual impide la síntesis de proteínas de la célula y la griseofulvina, que inhibe la mitosis al destruir el huso mitótico (Arenas, 2005; Gregori-Valdés, 2005).

1.6 BIOENSAYOS

Los bioensayos son pruebas ampliamente utilizadas, se realizan de manera convencional con organismos vivos, con el fin de detectar el efecto de una o más sustancias tóxicas o inhibitorias (antimicrobianos, nematocidas, insecticidas, etc.) y permite evaluar el límite de tolerancia de los organismos a dichas sustancias. Los resultados obtenidos por estos métodos deben ser consistentes con los experimentos en campo (Li *et al.*, 2009). En general, estas técnicas se emplean para determinar la magnitud y naturaleza del riesgo, empleando los escenarios más críticos y de mayor exposición (Lannacone y Dale, 1999; Lannacone *et al.*, 2001). Los organismos evaluados no necesariamente son los destinatarios del control químico, pero pueden servir para poder determinar si existen efectos negativos sobre el uso de plaguicidas en el ambiente (Vargas y Ubillo, 2001). Aunque se han desarrollado diferentes protocolos de bioensayos sobre distintos componentes biológicos (Werner *et al.*,

2000), el parámetro de toxicidad aguda más comúnmente empleado es la de concentración letal media (CL₅₀) (en mg o mg L⁻¹) o la dosis letal media (DL₅₀) (mg o mg kg⁻¹). También se utiliza el tiempo letal medio (TL₅₀) en horas, y estiman el porcentaje de mortalidad de una concentración o dosis a través del tiempo (Vargas y Ubillo, 2001).

El bioensayo de actividad antagónica se realiza en un cultivo dual, en el cual se confrontan dos cepas para detectar si alguna de ellas tiene actividad biológica. Hay diversos mecanismos de acción, como competencia por el sustrato, micoparasitismo y la antibiosis. Este ensayo se valida calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de la especie del hongo en estudio (Reyes *et al.*, 2008). La actividad de competencia entre diversas especies de hongos ha sido ampliamente reportada en condiciones naturales, así como también bajo condiciones de laboratorio (Gloer, 2007).

Los bioensayos de actividad antimicrobiana se realizan para valorar la capacidad bactericida o bacteriostática de algún producto u organismo. Se pueden emplear diferentes técnicas, la más común es el cálculo de la concentración mínima bactericida (CMB), cuyo objetivo es determinar la menor concentración de un antimicrobiano capaz de matar una cepa bacteriana y se estima enfrentando bacteria-antimicrobiano en un medio de cultivo. Se puede obtener empleando el procedimiento de macrodilución en tubo o microdilución en placa. En general, la CMB y la concentración mínima inhibitoria (CMI) en los antibióticos considerados bactericidas, están próximas, difiriendo en una o dos diluciones (Seimc, 2014).

1.7 FITOPATÓGENOS EVALUADOS

1.7.1 *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier

Alternaria chrysanthemi es una especie fitopatógena de cultivos de importancia agrícola como *Chrysanthemum maximum* y *Citrus sinensis* cuya distribución es cosmopolita. Produce conidios de color marrón de forma ovalada multicelulares, geniculados y septados transversal y longitudinalmente (Fernández, 2005), son sumamente resistentes y toleran un amplio rango de temperaturas. Causa la destrucción del tejido foliar de la planta hospedera ocasionando lesiones necróticas, las cuales generan una reducción del potencial fotosintético. Es un parásito facultativo

que sobrevive en suelo o en plantas (Rotem, 1997), el mecanismo de infección en las plantas es a través de sus estomas o directamente en la superficie de las hojas, principalmente en tejidos senescentes o bajo estrés (Thomma, 2003). Para su control, se utilizan fungicidas sistémicos como el azoxystrobin, carbendazim y los de contacto clorotalonil y captan (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005).

1.7.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides es un fitopatógeno causante de la antracnosis en diversos cultivos del mundo, tales como *Annona muricata*, *Carica papaya*, *Coffea arabica*, *Fragaria vesca*, *Lycopersicum esculentum*, *Mangifera indica*, *Persea americana* y *Vitis vinifera* (Beltrán-Cifuentes y García-Jaramillo, 2006). Presenta conidios ovalados con ambos extremos redondeados. La forma de sus ascas es oblonga o claviforme, de ápice engrosado, con ocho ascosporas hialinas, unicelulares, fusiformes o arqueadas (Sermeño *et al.*, 2005). El género *Colletotrichum* cuenta con más de 700 especies (www.indexfungorum.org). Durante el proceso de infección, en la fase inicial (biotrófica), el fitopatógeno asegura su establecimiento sin causar daños severos en el tejido vegetal, coloniza los tejidos y se provee de nutrimentos a partir de las células del hospedero apareciendo los síntomas de la antracnosis, para su control se utiliza una gran variedad de fungicidas químicos (Bailey *et al.*, 1992., Cerón-Rincón *et al.*, 2006., Alarcón-Restrepo y Chavarriaga-Montoya, 2007).

1.7.3 *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis)

El género *Corynespora* cuenta con más de 170 especies (www.indexfungorum.org). En particular *C. cassiicola* ha sido encontrado en más de 530 especies y 350 géneros de plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas (Smith *et al.*, 2008). Crece en hojas, tallos y raíces aunque también en quistes de nemátodos y piel humana (Mathiyazhagan *et al.*, 2004). Forma conidios solitarios o en cadena de dos a seis, cuya forma es variable de claviforme a cilíndrica, de color hialino a café pálido (Mendoza, 1999). Esta especie causa pérdidas económicas en cultivos de interés económico, como *Carica papaya*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, y *Solanum lycopersicum* en más de 70 países (Dixon *et al.*, 2009). Las plantas enfermas presentan manchas color café oscuro de 1 a 2 mm de diámetro, que coalescen hasta formar grandes lesiones irregulares rodeadas por un halo amarillo (Shimomoto *et al.*, 2008). Para su control se utiliza fungicidas comerciales como mancozeb, captafol y chlorothalonil (Mendoza, 1999).

1.7.4 *Curvularia* sp.

El género *Curvularia* agrupa un gran número de especies entre las que se encuentran parásitos facultativos de plantas y de habitantes del suelo. Se caracterizan por que sus estructuras son oscuras (Álvarez *et al.*, 2011). Los conidios son ovalados, cilíndricos, no sigmoides, a veces encorvados, de un color castaño claro; por lo general con tres septas transversales, siendo la segunda célula de tamaño mayor que las restantes (Malaguti y Subero, 1971). Se han registrado más de 110 especies (www.indexfungorum.org), y se encuentra ampliamente distribuido en áreas tropicales y subtropicales. En su mayoría, son fitopatógenos y afectan una gran variedad de cultivos, muchos de ellos de importancia económica como *Zea mays* y *Oryza sativa* (Trujillo *et al.*, 2007). Puede causar diferentes tipos de daños en hojas, tallos, flores y semillas, que abarcan desde pequeñas manchas hasta lesiones mayores (Jin, 1991). Para su control se utiliza fungicidas sistémicos como el Procloraz (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2013).

1.7.5 *Erwinia carotovora*

Erwinia carotovora (Jones) es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es de forma bacilar, Gram negativa y anaeróbica facultativa; es oportunista de infección latente y puede convertirse en activa cuando la planta se estresa bajo condiciones de temperatura y humedad. Es una bacteria fitopatógena causante de la pudrición blanda y mal olor en tallos y raíces de muchos cultivos económicamente importantes en regiones tropicales y subtropicales (Pérombelon y Kelman 1980). Esta enfermedad se caracteriza por la destrucción del tejido vegetal por la secreción de enzimas del patógeno que degradan la pared celular. Los síntomas causados por esta bacteria son la pudrición húmeda en tubérculos y raíces, emergencia errática de las plántulas, caída de las mismas y el colapso del pedúnculo de la flor cortada en poscosecha. No existe control efectivo de este patógeno una vez que la enfermedad se ha establecido (Nissen *et al.*, 2008).

1.7.6 *Fusarium*

El género *Fusarium* es a nivel mundial uno de los principales causantes de enfermedades en granos y cultivos se han registrado más de 1,400 especies (www.indexfungorum.org), siendo las más frecuentes *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides* (Lionakis y Kontoyiannis, 2004). Son hongos filamentosos, hialinos,

septados, reconocidos como saprófitos del suelo y algunas especies como patógenos de *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Musa acuminata*, *Lycopersicum esculentum*, *Mangifera indica* y *Triticum aestivum* (Pasquali *et al.*, 2010., Summerell y Leslie, 2011). Su control se realiza con fungicidas comerciales como benomyl y captán (Sandoval-Chávez *et al.*, 2011).

1.7.7 *Mycosphaerella fijiensis*

Mycosphaerella fijiensis, es el agente causal de la Sigatoka negra, la cual es la principal enfermedad foliar de *Musa* spp. en el mundo (Chuc-Uc *et al.*, 2011; Mourichon *et al.*, 2000), frutal que se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo y que es un componente importante de la dieta humana. Este patógeno forma conidios alargados, septados, hialinos y aciculares. (Castaño y del Río, 1994). Los síntomas de la Sigatoka negra corresponden a estrías finas color marrón, visibles en el envés a partir de la parte apical de las hojas, la estría evoluciona a mancha marrón oscura para finalmente tornarse negra de forma irregular y finalmente a lesión necrótica (Gasparotto, 2006), *M. fijiensis* reduce la asimilación neta de la luz, llevando a un decremento de la capacidad fotosintética, tanto por la acción del patógeno así como sus toxinas difundidas (El-Hadrami *et al.*, 2005). Para su control se utilizan fungicidas sistémicos como benzimidazoles y triazoles (Orozco-Santos, 1998).

1.7.8 *Xanthomonas campestris*

El género *Xanthomona* incluye especies bacterianas de gran importancia epidemiológica en las zonas tropicales del mundo porque ataca cultivos comestibles como *Phaseolus vulgaris* L., ornamentales como *Anthurium andreanum* L. y forrajeras en el Reino Unido, Noruega y Bélgica (Zapata y Gaud, 2002). *Xanthomonas* es una bacteria aeróbica, saprófita facultativa, por lo que los cambios ambientales pueden afectar directamente su sobrevivencia y provocar cambios genéticos permanentes. Se ha descrito como Gram-negativa, aeróbica obligada, pueden ser móviles por un flagelo polar y pueden producir un pigmento amarillo llamado xantomonadina (Schaad, 1988). Es agente causal de la marchitez bacteriana, los síntomas inducidos por este género son manchas foliares necróticas irregulares, rodeadas por un delgado halo amarillento, en vainas y semillas son pequeñas manchas rojizas irregulares, con exudados amarillos cuando hay humedad relativa alta

(Prudencio-Sains *et al.*, 2008). Su control es con fungicidas a base de cobre (Tarnowski *et al.*, 2009).

1.7.9 JUSTIFICACION

La diversidad aún inexplorada de los hongos saprófitos nativos de cenotes de la Península de Yucatán y la importancia de conocer su potencial biotecnológico como agentes de control biológico o la utilización de sus metabolitos secundarios, como agentes antimicrobianos contra patógenos de cultivos comerciales económicamente importantes, requiere una investigación profunda de sus compuestos activos y sus diversos mecanismos de acción, para promover la utilización de productos naturales como una alternativa para el manejo de la agricultura en forma ecológicamente sostenible.

II. HIPÓTESIS

Los micromicetos de los cenotes de Yucatán producen metabolitos secundarios antimicrobianos con potencial biotecnológico

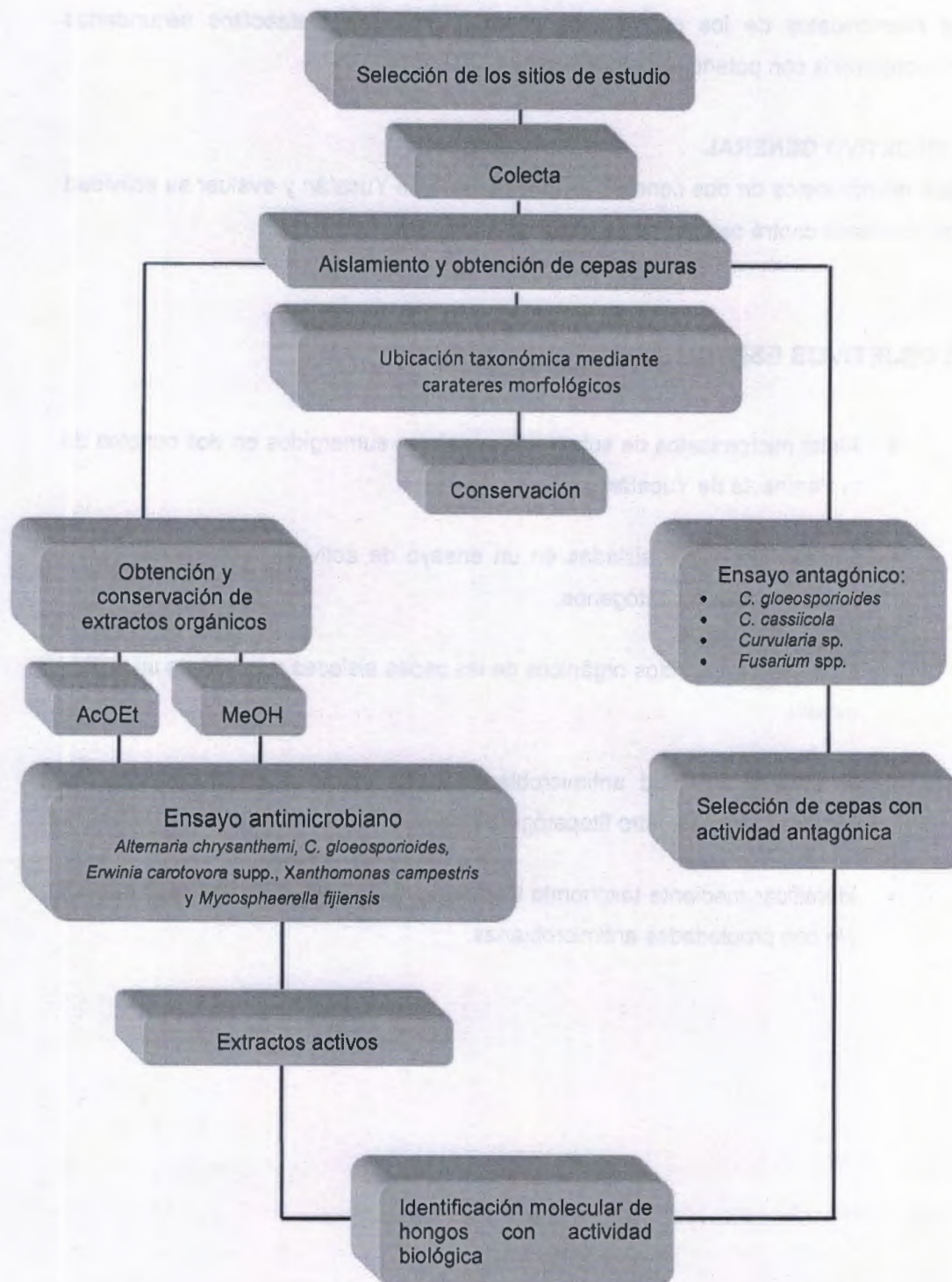
III. OBJETIVO GENERAL

Aislar micromicetos de dos cenotes de la Península de Yucatán y evaluar su actividad antimicrobiana contra patógenos de importancia agrícola.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar micromicetos de sustratos vegetales sumergidos en dos cenotes de la Península de Yucatán.
- Evaluar las cepas aisladas en un ensayo de actividad antagónica contra cuatro hongos fitopatógenos.
- Obtener los extractos orgánicos de las cepas aisladas a través de su cultivo *ex situ*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos fúngicos contra al menos cuatro fitopatógenos.
- Identificar mediante taxonomía tradicional y molecular las especies nuevas y/o con propiedades antimicrobianas.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. REFERENCIAS

- Alarcón-Restrepo, J.J. y W. Chavarriaga-Montoya (2007). Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz & Sacc. en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agronomía*. 15(1): 89 – 102.
- Alcocer, J. y F. W. Bernal-Brooks (2010). Limnology in México. *Hydrobiologia*. 644:15-68.
- Álvarez, V.C., L. Guelfanda., J.C. Pidonea., R. Soloagaa., P. Ontivero., A. Margari y G. López-Daneri (2011). Rinosinusitis alérgica fúngica causada por *Curvularia* sp. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28.: 104-106.
- Antigüedad, I., T. y J. Morales. T y A. Uriarte (2007). Los acuíferos Kársticos. Casos del País Vasco. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*. 15: 325-332.
- Arenas E. (2005). Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un laboratorio de Micología. *Revista de Ciencia y trabajo*. 15: 52-67.
- Asaff, A., C. Cerda-García-Rojas y M. De la Torre (2005). Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 542-547.
- Bailey, J.A., R.J. O'connell., R.J. Pring y C. Nash (1992). Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. En: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (Bailey JA y Jeger MJ, Eds.). CAB International Wallingford. 88-120.
- Beddows, P. (1999). Conduit hydrogeology of a tropical coastal carbonate aquifer: Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, M.S. Thesis, McMaster University, 76 pp.
- Bhadury. P., T. Balsam., P. Mohammad y C. Wright (2006). The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33: 325-337.
- Beltrán-Cifuentes, M.C. y D.J. García-Jaramillo (2006). *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 13: 73-80.
- Brinkmann, R. (2010) Sinkhole distribution based on pre-development mapping in urbanized Pinellas County, Florida, USA. *Geography/Geology Faculty Publications*.
- Carlson, R. (1977). A trophic state index for lakes. *Limnology and Oceanography*. 22: 361-368.
- Carruthers, T.J.B., B.I. van Tussenbroek y W.C. Dennison (2005). Influence of submarine springs and wastewater on nutrient dynamics of Caribbean seagrass meadows. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 64: 191-199.

-
- Castañeda, R. F., G. P. Heredia, R. M. Arias, M. Stadler y D. W. Minter (2005). Two hyphomycetes from submerged material of México. *Mycotaxon*. 91: 333-337.
- Castaño, Z.J. y L. Del Río (1994). Sigatocas del banano. En: Guía Para el Diagnóstico y Control de Enfermedades en Cultivos de Importancia Económica. 3a Edición. Zamorano Academic Press, Honduras. Pp. 217-218.
- Cerón-Rincón, L.E., B.L. Cerón-Rincón., M. Higuera., J. Sánchez., S. Bustamente y G. Buitrago (2006). Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* durante su cultivo en medios líquidos. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11 No. 1, 101.
- Chuc-Uc, J., L. Brito-Argáez., B. Canto-Canché., M. Tzec-Simá., C. Rodríguez-García., L. Peraza-Echeverría., S. Peraza-Echeverría., A. James-Kay., C.A. Cruz-Cruz., L.M. Peña-Rodríguez y I. Islas-Flores (2011). The *in vitro* secretome of *Mycosphaerella fijiensis* induces cell death in banana leaves. *Plant Physiology Biochemistry*. 49: 572-8.
- Cieniecka-Roslonkiewicz, A., A. Sas., E. Przybysz., B. Morytz., A. Syguda y J. Pernak (2007). Ionic Liquids for the Production of Insecticidal and Microbicidal Extracts of the Fungus *Cantharellus cibarius*. *Chemistry and Biodiversity*, Vol. 4. Issue 9, 2218-2224.
- Cristóbal-Alejo, J., Navarrete-Mapen, Z., Herrera-Parra, E., Mis-Mut,M., Tun-Suárez, J.M y M. Ruiz-Sánchez (2013). Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: Identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. *Revista de Protección Vegetal*. Vol. 28 No. 2: 138-144.
- Damm, U., G.J. Verkley., M. Crous., H. Fourie., A.H. Haegi y A. Riccioni (2008). Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia*. 20: 9-17.
- De la Rosa-García, S.C., A.A. Muñoz-García., L.F. Barahona-Pérez y M.M. Gamboa-Angulo (2008). Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 289-294.
- Demain, A. L. y S. Sanchez (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*. 62: 5-16.
- Diomedi, A. (2004). Nuevos antifúngicos: las equinocandinas. *Revista Chilena de Infectología*. 21: 89-101.
- Dixon, L.J., R. L. Schlub., K. Pernezny y L.E. Datnoff (2009). Host Specialization and Phylogenetic Diversity of *Corynespora cassicola*. *Mycology*. Vol. 99, No. 9.
-

-
- Dong, J., Y. Zhu., H. Song., R. Li., H. He., H. Liu., R. Huang., Y. Zhou., L. Wang., Y. Cao y K. Zhang (2007). Nematicidal Resorcylics from the Aquatic Fungus *Caryospora callicarpa* YMF1.01026. *Journal of Chemical Ecology*. 3: 1115-1126.
- Dong, J.I., H. C. Song., J. H. Li., Y. S. Tang., R. Sun., L. Wang., Y. P. Zhou., L. M. Wang., K. Z. Shen., C. R. Wang y K.Q. Zhang (2008). Ymf 1029A-E, Preussomerin Analogues from the Fresh-Water-Derived Fungus YMF 1.01029. *Journal of Natural Products*. 71: 952-956.
- Dong, J.Y., H.C. Song., Li, J.H., Wang, C.R., Sun, R., Tang, Y.S., Shen, K.Z., Wang, L., Wang, L.M., Zhou, Y.P., L. Li y K.Q. Zhang (2009). Two Unusual Naphthalene-Containing Compounds from a Freshwater Fungus YMF 1.01029. *Chemistry y Biodiversity* – Vol. 6.
- El-Hadrami, A. Kone, y D. Lepoivre (2005). Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to Black Leaf Streak Disease. *European Journal of Plant Pathology*. 113: 241-254.
- FAO (2002). Food and Agriculture Organization of the United Nations. [En Línea]. <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture&language=ES> [18/02/14].
- Fernández, G.J. (2005). Incidencia y caracterización: Morfológica, patogénica y genética de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla del sur de Puerto Rico. Tesis de maestría. Universidad de Puerto Rico. 167 p.
- Fungi.life.illinois.edu. (2014). Freshwater ascomycetes and their anamorphs. [En Línea]. http://fungi.life.illinois.edu/species_monograph_images/472 [18/02/14].
- Gamboa-Angulo, M., S.C. De la Rosa-García., G. Heredia-Abarca., I. Medina-Baizabal (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatán peninsula, México. *African Journal of Microbiology*, 6: 2305 – 2312.
- Gamboa-Angulo, M., G.M. Molina-Salinas., M. Chan-Bacab., S.R. Peraza-Sánchez., G. Heredia., S.C. De la Rosa-García y M. Reyes-Estebanez (2013). Antimycobacterial and antileishmanial effects of microfungi isolated from tropical regions in México. *Journal of Parasitology Research*. 112:559-566. DOI 10.1007/s00436-012-3167-4
- Gasparotto, L., Pereira, J.C.R., Hanada, R.E y A.V.V. Montarroyos (2006). Sigatoka-negra da bananeira. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. 177 p.
- Geris, R., E. Rodrigues-Fo., H.H. Garcia da Silva y I. Garcia da Silva (2008). Larvicidal Effects of Fungal *Meroterpenoids* in the Control of *Aedes aegypti* L., the Main Vector of Dengue and Yellow Fever. *Cemistry & Biodiversity*. Vol. 5.
-

-
- Gloer, J.B. (2007). Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. Environmental and Microbial Relationships, 2nd Edition. The Mycota IV C.P. Kubicek and I. S. Druzhinina (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- González, M. C. y A. Chavarría (2005). Some freshwater ascomycetes from México. Mycotaxon. 91: 315-322.
- Gregori-Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Revista Cubana de Farmacología. 39: (2).
- Hao, Y., M. Mo., H. Su y K. Zhang (2005). Ecology of aquatic nematode-trapping hyphomycetes in southwestern China. Aquatic Microbial Ecology. Vol. 40: 175-181.
- Hawksworth, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research. 105: 1422-1432.
- Heredia-Abarca, G., M. Mena-Portales., A. Mercado-Sierra y M. Gómez-Columna (2013). Nuevos registros de hongos anamorfos tropicales asociados a restos vegetales para México. Revista Mexicana de Micología. 37: 69-81.
- Heredia-Abarca, G., R. Castañeda-Ruiz., C.I. Becerra-Hernández y R.M. Arias-Mota (2006). Contribución al conocimiento de los hongos anamorfos saprobios del estado de Tabasco I. Revista Mexicana de Micología. 23: 53-62.
- Heredia, G., R.M. Arias-Mota., R.F. Castañeda-Ruiz y M. Gamboa-Angulo (2012). New species of *Hughesinia* and *Stachybotryna* and new records of anamorphic fungi from the Yucatan Península, México. Mycological Progress. 11:927-935.
- Heredia, G. (2008). Tópicos sobre diversidad, ecología y uso de los hongos microscópicos en Iberoamérica. Programa Iberoamericano de ciencia y ecología y uso de los hongos microscópicos. Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED) e Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver. México. 386 pp.
- Heredia, G., R.M. Arias y M. Reyes (2000). Contribución al conocimiento de los hongos Hyphomycetes de México. Acta Botánica Mexicana. 51: 39-51.
- Heredia, G. y A. Mercado-Sierra. 1998. Tropical hyphomycetes of Mexico. III. Some species from the Calakmul biosphere reserve, Campeche. Mycotaxon 68: 137-143.
- Hodell, D.A., M. Brenner., J.H. Curtis., R. Medina-González., E.I. Chan Can., A. Albornaz-Pat y T.P. Guilderson (2005). Climate change on the Yucatan Peninsula during the Little Ice Age. Quaternary Research. 63: 109-121.
- Hyde, K. D. (2001). Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers? Mycological Research. 105: 1514-1518.
-

-
- Hyde, K.D. y T.K. Goh (2003). Adaptations for dispersal in filamentous freshwater fungi. *Fungal Diversity Research Series*. 10: 231-258.
- Indexfungorum, (2014). Names [En Línea]
<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> [18/02/14].
- INEGI (2014). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Geo/contenidos [En Línea]
<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/imgpercepcion/imgsatelite/espaciomapas.aspx> [23/02/14].
- IUGS (2007) International Union of Geological Sciences. Geoindicators. [Online]
<http://www.lgt.lt/geoindex/index.php>. [17/02/2014].
- Jin, M. Z. (1999). Preliminary Study of Discolored Rice Grain Caused by *Curvularia*. Seed Pathology and Microbiology, CAB Abstracts, 2 (295):33.
- Junghanns, C., G. Krauss y D. Schlosser (2008). Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresource Technology*. 99: 1225-1235.
- Kaeberlein, T., K. Lewis y S.S. Epstein (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*. 296: 1127-1129.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon., D. W. Minter y J. A. Stalpers (2008). Dictionary of the fungi, décima edición. CAB International, Wallingford. 784 p.
- Köppen, W. 1931. *Grundriss der Klimakunde*. De Gruite. Berlin.
- Lannacone, J.A., M. Alayo, M. Abanto, J. Sánchez y E. Zapata (2001). *Porcellio laevis* Latreille, 1804 (Isopoda: Porcellionidae) como bioindicador para evaluación de plomo. *Revista peruana de Entomología*. 42:175-183.
- Lannacone, J.A. y W. Dale (1999). Protocolo de bioensayos ecotoxicológicos para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el río Rímac, Lima, Perú. *Revista peruana de Entomología*. 41: 111-120.
- Li, B., A.B. Huizhu-Yuan., A.C. Jichao-Fang., A.D. Liming-Tao., A.E. Qingchun-Huang., A.F. Xuhong-Qian y A.G. Zhijin-Fan (2009). Recent progress of highly efficient *in vivo* biological screening for novel agrochemicals in China. *Pest Management Science*. 66: 238-247.
- Lionakis, M. y D. Kontoyiannis (2004). *Fusarium* infections in critically ill patients. *Seminars Respiratory and Critical Care Medicine*. 25: 159-69.
-

- MacSwiney, G.M.C., L.P. Vilchis., F.M. Clarke y P.A. Racey (2007). The importance of cenotes in conserving bat assemblages in the Yucatan, Mexico. *Biological Conservation*. 136: 499-509.
- Malaguti, G. y L.J. Subero (1971). Manchas foliares del maíz causado por *Curvularia* en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 21 (2): 119-128.
- Martin, C., M. Moeder., X. Daniel., G. Krauss y D. Schlosser (2007). Biotransformation of the Polycyclic Musks HHCB and AHTN and Metabolite Formation by Fungi Occurring in Freshwater Environments. *Environmental Science & Technology*. 41: 5395-5402.
- Macías-Rubalcava, M.L., B.E. Hernández-Bautista., M. Jiménez-Estrada., M. C. González., A. E. Glenn., R. T. Hanlin., S. Hernández-Ortega., A. Saucedo-García., J. M. Muria-González y A. Luisa Anaya (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*. 69: 1185-1196.
- Mathiyazhagan, S., K. Kavitha., S. Nakkeeran., G. Chandrasekar., K. Manian., P. Renukadevi., A.S. Krishnamoorthy y W.G.D. Fernando (2004). PGPR mediated management of stem blight of *Phyllanthus amarus* (Schum and Thonn) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 37: 183-199.
- Mejía-Ortiz, L.M., G. Yáñez., M. López-Mejía y E. Zarza-González (2007). Cenotes (Anchialine Caves) on Cozumel Island, Quintana Roo, México. *Journal of Cave and Karst Studies*, volumen. 69, no. 2, p. 250-255.
- Mendoza, Z. C. (1999). Diagnóstico de enfermedades fungosas de las hortalizas. Departamento de Parasitología Agrícola, Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, estado de México, 1999.
- Mortensen S.R., K.A. Johnson, C.P. Weisskopf, M.J. Hooper, T.E. Lacher y R.J. Kendall (1998). Avian exposure to pesticides in Costa Rican banana plantations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60:562-568.
- Mourichon, X., P. Lepoivre y J. Carlier (2000). Host-pathogens interactions. Chapter 2. Fungal disease of the foliage. Pp. 67-72 in *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. (D.R. Jones, ed.). CABI. publishing, Wallingford, Oxford, UK.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

-
- Nissen, J. M., J. Carrión., L.P. Ciampi., M.L. Costa., R.P. Fuentes y R.Y. Schöbitz (2008). Biocontrol de *Erwinia carotovora* en Cala (*Zantedeschia* sp). Agro Sur Vol. 36 (2).
- Orozco-Santos, M. (1998). Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. Folleto técnico No. 1. División Agrícola. 95pp.
- Özkan, K., S. Gulsoy., A. Mert., M. Ozturk y B. Muys (2010). Plant distribution-altitude and landform relationships in karstic sinkholes of Mediterranean region of Turkey. Journal of Environmental Biology. 31: 51-60.
- Palacios-López, O.A., M. González-Rangel., B.E. Rivera-Chavira y G.V. Nevárez-Moorillón (2011). El papel de los antimicrobianos en la estructura de las comunidades microbianas en la naturaleza. Technociencia Chihuahua. V. No. 1.
- Pasquali, M., Giraud, F., Brochot, C., Cocco, E., L. Hoffmann y T. Bohn (2010). Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. International Journal of Food Microbiology. 137: 246-253.
- Pérombelon, M. C. M. y A. Kelman (1980). Ecology of the soft rot *erwinias*. Annual Reviews Phytopathology 18: 361-387.
- Pinruan, U., E.B.G. Jones y K.D. Hyde (2002). Aquatic fungi from peat swamp palms. *Jahnula appendiculata* sp. Sydowia. 54: 242-247.
- Prudencio-Sains, J.M., R. Navarrete-Maya., J. Navarrete-Maya y J.A. Acosta-Gallegos (2008). Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el valle de México. Agricultura Técnica en México. Vol. 34 Núm. 2. p. 201-212.
- Reino, J. L., R.F. Guerrero., R. Hernández-Galán y I.G. Collado (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews. 7: 89-123.
- Reyes, Y., B. Martínez y D. Infante (2008). Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. Revista de Protección Vegetal. Vol. 23 No. 2: 112-117.
- Reyes-Estebanez, M., E. Herrera-Parra., J. Cristóbal-Alejo., G. Heredia-Abarca., B. Canto-Canché., I. Medina-Baizabal y M. Gamboa-Angulo (2011). Antimicrobial and nematocidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in México. African Journal of Microbiology Research Volumen. 5(9), pp.
-

-
- Rosique, E. (2008). Evaluación de la diversidad de los hongos microscópicos dulceacuícolas del estado de Tabasco, México. Tesis, doctorado. Instituto de Biología. UNAM, México, D.F. 256 p.
- Rotem, J. (1997). The genus *Alternaria*, biology, epidemiology and pathogenicity. Ed. APS Press. Minnesota, Estados Unidos. 83 p.
- Šafanda, J., P. Heidinger., H. Wilhelm y V. Cermák (2005). Fluid convection observed from temperature logs in the karst formation of the Yucatán Peninsula, México. *Journal of geophysics and engineering*. 2: 326-331.
- Sánchez-Crispín, A. y E. Propin-Frejomil (2001). Cambios en la orientación funcional de las ciudades medias del trópico Mexicano. *Cuadernos Geográficos*. 31: 69-85.
- Sandoval-Chávez, R.A., R.A. Martínez-Peniche., M. Hernández-Iturriaga., M. Fernández-Escartín., S. Arvizu-Medrano y L. Soto-Muñoz (2011). Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*capsicum annum* L.) en poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 17(2):161-172.
- Schaad, N.W. Ed. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2 ed. St Paul, Minnesota, APS.
- Schmitter-Soto, J.J., E.F.A. Comin., J. Escobar-Briones., J. Herrera-Silveira., E. Alcocer., M. Suárez-Morales., V. Elías-Gutiérrez., L.E. Díaz-Arce y B. Steinich (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico) *Hydrobiologia*. 467: 215-228.
- Schneider, P., M. Misiek y D. Hoffmeister (2008). *In Vivo* and *In Vitro* Production Options for Fungal Secondary Metabolites. *Molecular Pharmaceutics*, 5 (2), 234-242.
- SEDUMA, (2014). Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente. Cenotes y grutas [En Línea] <http://www.seduma.yucatan.gob.mx/cenotes-grutas/censo-cenotes.php> [17/02/2014].
- SEIMC, (2014). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Documentos científicos [En Línea] <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap12.htm> [18/02/2014]
- Sermeño, J.M., A.W. Rivas y R.A. Menjivar (2005). Guía técnica de las principales plagas artrópodas y enfermedades de los frutales. 1ª ed. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador. p. 40-42.
- Shearer, C. A., E., B. Descals., J. Kohlmeyer., L. Kohlmeyer., D. Marmanová., D. Padgett., H.A. Porter., P.J. Raja., H.A. Schmit., A. Thorton y H. Voglymayr (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*. 16: 49-67.
-

-
- Shimomoto, Y.; R. Adachi; Y. Morita; K. Yano; A. Kiba; Y. Hikichi y S. Takeuchi (2008). *Corynespora* Blight of Sweet Pepper (*Capsicum annuum*) Caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. Journal of General Plant Pathology. 74:335-337.
- Smith, L.J., L.E. Datnoff., K.L. Pernezny., J.A. Rollins y R.L. Schlub (2008). Phylogenetic analyses of diverse *Corynespora cassiicola* isolates indicate an evolutionary correlation with host not geography. In: Meeting Abstracts, 9th Eur. Conference on Fungal Genetics.
- Steinich, B., G. Velázquez-Olimán., L. E. Marín y E. Perry (1996). Determination of the ground water divide in the karst aquifer of Yucatan, Mexico, combining geochemical and Hydrogeological data. Geofísica Internacional. 35: 153-159.
- Summerell, B.A. y J.F. Leslie (2011). Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? Fungal Diversity. DOI 10.1007/s13225-011-0132-y
- Tarnowski, T., A.J. Palmateer., I. Maguire y J.H. Crane (2009). Florida plant disease management: "Tahiti" lime (*Citrus latifolia*). University of Florida. IFAS Extensión. Pp.24 9.
- Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology. 4: 225-236.
- Torres-Barragán, A., A.L. Anaya, R. Alatorre y C. Toriello (2004). Entomopathogenic fungi from "El Edén" Ecological Reserve, Quintana Roo, México. Mycopathologia. 158: 61-71.
- Trigos, A., G. Mendoza, G.M. Luna, G. Heredia y R.M. Arias (2005). Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. Revista Mexicana de Micología. 20: 89-92.
- Trujillo, I., A. Díaz, A. Hernández y M. Heydrich (2007). Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Revista de Protección Vegetal. Vol. 22 No. 1: 41-46.
- Werner, I., L.A. Deanovic, V. Connor, V.D. Vlaming, H.C. Bailey y D.E. Hinton (2000). Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) in the Sacramento-San Joaquín River Delta, California, USA. Environmental Toxicology & Chemistry. 19: 215-227.
- Vargas, R.M. y A.F. Ubillo (2001). Toxicidad de pesticidas sobre enemigos naturales de plagas agrícolas. Agrícola Técnica (Chile). 61: 35-41.
- Vijaykrishna, D. y K.D. Hyde (2006). Inter- and intra-stream variation of lignicolous freshwater fungi in tropical Australia. Fungal Diversity. 21: 203-224.
-

-
- Vijaykrishna, D., R. Jeewon y K.D. Hyde (2006). Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity*. 23: 351-390.
- Villanueva-Couoh, E., M.A. Sánchez-Briceño., J. Cristóbal-Alejo., E. Ruiz-Sánchez y J.M. Tún-Suárez (2005). Diagnóstico y Alternativas de Manejo Químico del Tizón Foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier) del Crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*. Pp.49-56.
- Zapata, M. y R. Gaud (2002). Estrategias para diferenciar *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli con sales inorgánicas. *Agronomía Mesoamericana*. 12 (1).

CAPITULO II. ASLAMIENTO Y CONSERVACION DE CEPAS FÚNGICAS

2.1 INTRODUCCIÓN

Como resultado de su metabolismo los micromicetos como otros microorganismos, animales y plantas, son capaces de producir productos naturales (Demain y Sánchez, 2009), con potencial uso biotecnológico. Hasta 2005 se habían reportado aproximadamente 50,000 productos naturales derivados de microorganismos; 45% producidos por actinomicetos, 38% por hongos y 17% por bacterias (Berdy, 2005). Debido al creciente uso y búsqueda de estos compuestos, se ha incrementado la necesidad de aislar y conservar los cultivos microbianos *ex situ*, manteniendo sus características biológicas y químicas estables (Weng-Alemán *et al.*, 2005). Por otra parte, el agotamiento continuo de los recursos naturales originados principalmente por actividades antropogénicas, genera una creciente valoración de la biodiversidad y la conservación de microorganismos (OCDE, 2007; OCDE, 2001).

De manera general, los procedimientos para aislamientos microbiológicos se clasifican en directos e indirectos. El primero es un método económico que consiste en incubar el material en estudio (generalmente restos vegetales) en cámaras húmedas para favorecer el desarrollo y esporulación de los micromicetos. Posteriormente, mediante revisión microscópica se detectan las estructuras fúngicas, se extraen mediante agujas microbiológicas y se inoculan en diferentes medios de cultivo. Este método requiere cierta habilidad y conocimiento para detectar y transferir las esporas al sustrato nativo y al medio nutritivo (Reyes-Estebanez, 2009). Para los métodos indirectos aplica un tratamiento previo como es el lavado de partículas del sustrato, para posteriormente transferirlas a cajas de Petri con medios de cultivo (Parkinson, 1994). Los medios de cultivo pueden ser naturales, semisintéticos o sintéticos; los primeros pueden utilizarse en extracto e infusión, a los segundos se les adiciona sales y fuentes de carbono y a los sintéticos se les añaden altas concentraciones de carbono (sacarosa, dextrosa) y extractos orgánicos como factores de crecimiento en concentraciones conocidas para ambos tipos es factible su preparación en forma sólida o líquida (Jong y Birminham, 2001).

La preservación eficaz de cultivos microbiológicos requiere del conocimiento de las características y propiedades de los microorganismos, así como el conocimiento de

sus potenciales aplicaciones (WFCC Guidelines, 2010). El método de conservación a elegir debe garantizar la supervivencia de al menos el 70% de la colonia por un período considerable de tiempo (Parra-Huertas *et al.*, 2006; Weng- Alemán *et al.*, 2005). Aunque se encuentra disponible una gran variedad de métodos de preservación, el criterio de selección se puede basar en la cantidad del cultivo requerido, costos del proceso, frecuencia de uso, pureza y viabilidad. Sin embargo, para reducir la posibilidad de pérdida de cada cepa, ésta debe de mantenerse en al menos dos métodos diferentes de conservación (WFCC, Guidelines; 2010; Uzunova-Doneva y Donev, 2005; Weng-Alemán *et al.*, 2005).

Los métodos de conservación pueden dividirse en tres tipos básicos: de corto, mediano y largo plazo. El primero comprende periodos de tiempo de meses hasta dos años, como la resiembra, la cual se basa en transferencias periódicas a un medio de cultivo nuevo. Con esto se proporciona a las cepas las condiciones óptimas de crecimiento, no obstante la probabilidad de contaminación y variabilidad de sus características por este método es elevada. A mediano plazo, la viabilidad de los cultivos es de 2 a 5 años, entre los que están los métodos de desecación. Este consiste en la inhibición del crecimiento por la eliminación del agua disponible, se utilizan diversos sustratos como: arena, parafina líquida, sílice, tierra y la suspensión en agua estéril, destilada o marina, mantenida de 4-8 °C (Morgan *et al.*, 2006; García y Uruburu, 2000). Por último, los métodos a largo plazo, comprenden periodos de 10 años o más, como la ultracongelación (-70 °C) nitrógeno líquido (-196 °C) y la liofilización, estas técnicas tienen la ventaja de minimizar el riesgo de cambios genéticos (Uzunova-Doneva y Donev, 2005; Smith *et al.*, 2000).

La detección, aislamiento y conservación de los micromicetos que habitan en ecosistemas naturales con condiciones ambientales especiales como los cenotes, es fundamental para conocer la magnitud de la diversidad de estos microorganismos e investigar su potencial biotecnológico.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Aislar micromicetos de substratos vegetales sumergidos en dos cenotes de la Península de Yucatán.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 SITIO DE ESTUDIO

El siguiente trabajo se realizó en el estado de Yucatán, México, el cual se encuentra localizado en la Península de Yucatán, rodeado por el Golfo de México y el mar Caribe entre 19° 30" y 21° 37" latitud norte y 87° 30" y 90° 26" longitud oeste del meridiano de Greenwich, (INEGI, 2014). Su clima es Aw (cálido sub-húmedo), con una temperatura media anual de 26 °C, con periodos estacionales marcados: vientos fuertes con lluvias escasas (noviembre-febrero), caliente y seco (marzo-mayo) y temporada de lluvias que comprenden los meses de junio a octubre (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). La precipitación pluvial anual fluctúa entre 500 mm en la región noroccidental a 1,000 mm en la región suroriental, siendo los meses de septiembre y octubre los de mayor precipitación (Hodell *et al.*, 2005).

La elección del sitio de la colecta de la micoflora se basó en la accesibilidad de los cenotes, así como su estado de conservación ante las perturbaciones humanas, como presencia y accesibilidad a la población local y actividades agrícolas y ganaderas. De esta manera y con el apoyo de un habitante oriundo del municipio de Homún (Sr. Elmer) se seleccionaron los cenotes Oxola y Kikal ubicados aproximadamente a 3 y 6 km del poblado respectivamente y a 90 minutos de la ciudad de Mérida (Figura 2.1), ambos sitios son de difícil acceso y tienen características tipo grutas, ya que tienen una entrada horizontal y sección seca (Mejía-Ortiz *et al.*, 2007).

República Mexicana



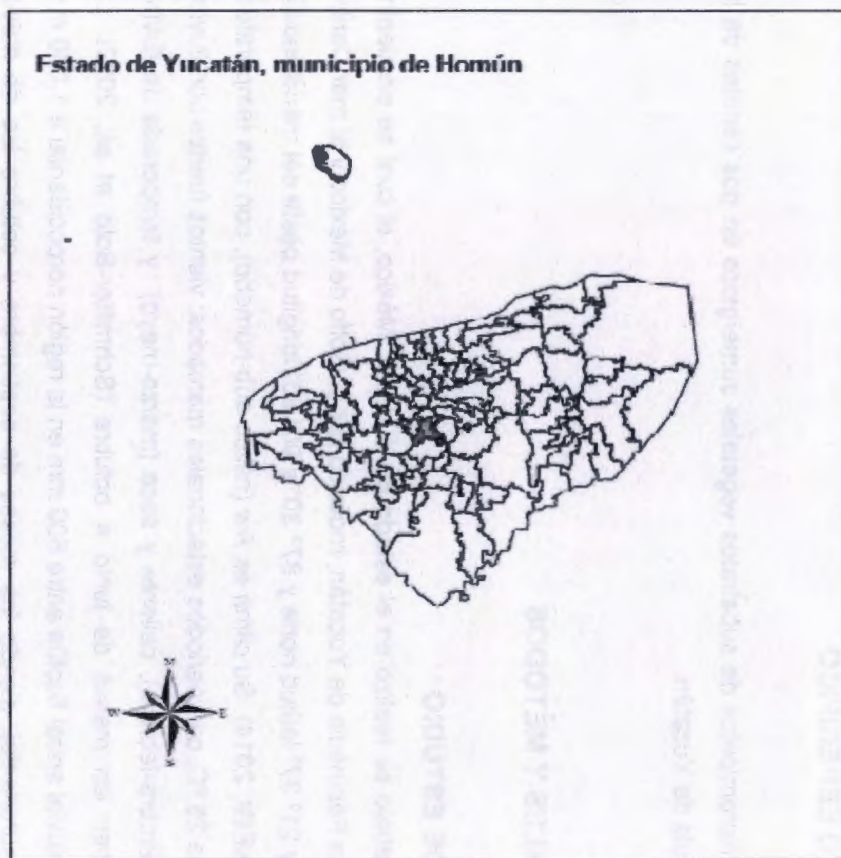
0 150 300 600 900 Miles

Península de Yucatán



0 75,000,000 300,000 400,000 600,000 Meters

Estado de Yucatán, municipio de Homún



0 24,500,000 98,000 147,000 196,000 Meters

Figura 2.1.- Municipio de Homún, Yucatán. República Mexicana

2.3.2 CONDICIONES MICROBIOLÓGICAS

Los medios de cultivo utilizados se esterilizaron a 121 °C, 15 lb·in⁻² de presión por 15-20 minutos. Todo el trabajo microbiológico se realizó en condiciones asépticas, utilizando una campana de flujo laminar vertical marca Veco®.

2.3.3 TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA DETECCIÓN DE LOS HONGOS Y AISLAMIENTO DE CEPAS

El estudio se efectuó en los cenotes Oxola y Kikal, ambos se localizan en el municipio de Homún, sur-este de la ciudad de Mérida, Yucatán. Para la detección de los hongos se emplearon tres estrategias (Figura 2.2):

A) Análisis directo de restos vegetales sumergidos o en descomposición en la orilla de los cenotes. Se recolectaron hojas y ramas, se colocaron en bolsas y se transportaron al laboratorio cubiertas de la luz a baja temperatura. El material se lavó con agua de la llave, con flujo lento durante una hora (para eliminar restos de suelo, esporas de especies contaminantes ambientales y microfauna asociada), se escurrió y se eliminó el exeso de agua con papel esterilizado, posteriormente se colocó en cámaras húmedas, elaboradas con cajas de Petri de diez cm de diámetro. Cada tercer día el material se revisó con ayuda de un microscopio estereoscópico. Todas las estructuras fúngicas detectadas fueron transferidas a cajas con medio de cultivo. Las colonias emergentes se purificaron y resembraron en tres medios de cultivo diferentes (Reyes-Estebanez, 2009).

B).- Análisis de restos vegetales colectados en los cenotes, confinados en trampas de hojarasca sumergidas en los cenotes. Se colocaron trampas (bolsas de 20 × 30 cm de malla de mosquitero) con restos vegetales (hojas y ramas), las cuales permanecieron semi-sumergidas en el agua de 7 a 21 días. Para su procesamiento se siguió el procedimiento descrito en el inciso A.

C).- Análisis de restos vegetales colectados en jardín botánico del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), esterilizados y confinados en trampas de hojarasca sumergida en los cenotes por un periodo de 7 a 21 días como se describe en el inciso B. Ramas y hojas del jardín botánico del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) se esterilizaron a 121°C, 15 lb·in⁻² de presión por 15 - 20 minutos y se colocaron en las trampas como se describe en el inciso B. Para su procesamiento

se siguió el procedimiento descrito en el inciso A.

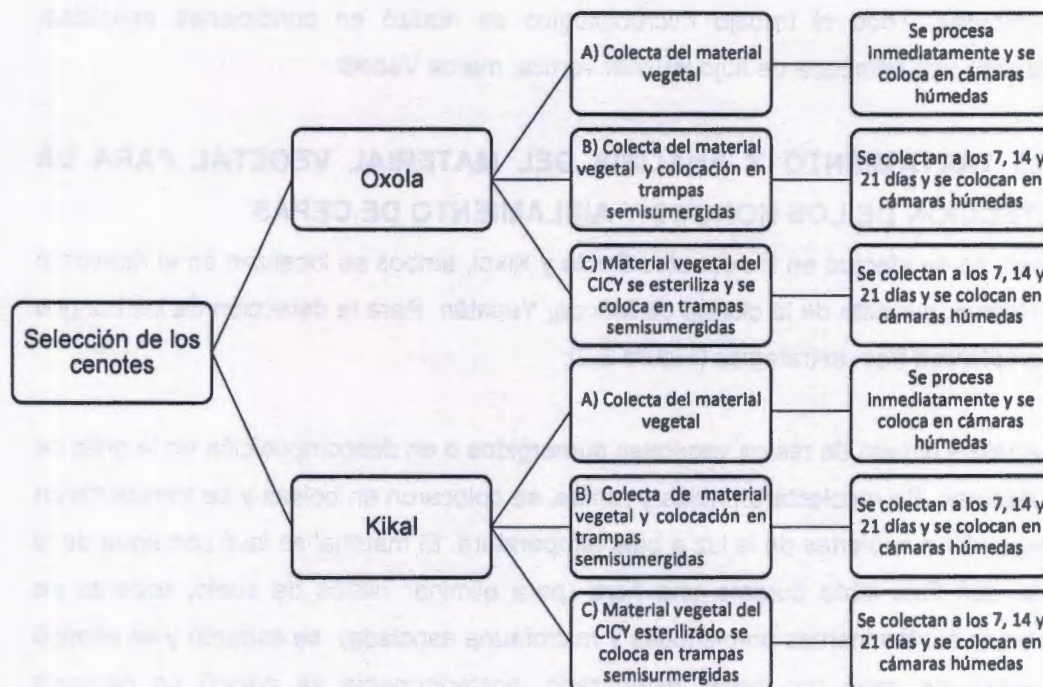


Figura 2.2 Estrategia de aislamiento de micromicetos de restos vegetales de los cenotes Oxola y Kikal de la Península de Yucatán.

2.3.4 ASIGNACION DE CLAVES

Los aislados se registraron de acuerdo al lugar de aislamiento y al tipo de sustrato (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Claves de las cepas fúngicas aisladas de los cenotes Oxola y Kikal

Substrato	Cenote Kikal	Cenote Oxola
Hoja	KH	OH
Rama	KR	OR
Sumergido	KS	OS
Estéril	KSE	OSE
No estéril	KSN	OSN

2.3.5 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Agar papa-dextrosa (PDA), el medio PDA Bioxon® (39 g) en un litro de agua destilada, se mantuvo en ebullición durante un minuto. Agar maíz (AM), en un litro de agua destilada se adicionó maíz congelado Del Huerto® (200 g) y se calentó a ebullición durante un minuto. Posteriormente los sólidos del maíz se filtraron y nuevamente se calentaron a ebullición durante un minuto con 16 g de agar-agar Bioxon®. Agar extracto de malta (AEM), En un litro de agua destilada se depositaron 20 g de extracto de malta y 20 g de agar-agar Bioxon® y se calentó a ebullición durante un minuto. Todos los medios después de prepararlos se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos a 15 lb de presión en una autoclave y se transfirieron a cajas Petri.

2.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS

2.4.1 TAXONOMIA TRADICIONAL

Las características morfológicas de las colonias consistentes en aspecto, color, tamaño y forma en los diferentes medios de cultivo fueron documentadas. También se analizaron las características morfológicas microscópicas de preparaciones permanentes y semi-permanentes de estructuras extraídas de las colonias desarrolladas en los tres medios de cultivo y en los microcultivos elaborados con medio PDA. La identificación final de las cepas se realizó con asesoría de la Dra. Gabriela Heredia Abarca del Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Veracruz, México. Para la ubicación a nivel de género se consultaron las obras de Barnett y Hunter (1972) y Carmichel et al. (1980).

2.4.1.1 MICROCULTIVOS

En cajas de Petri de vidrio (10 cm ø) se colocaron en su interior tubos acodados de vidrio y sobre ellos un portaobjetos con un cubo de PDA (5 × 10 × 10 mm), en el cual se inculó la cepa a identificar y posteriormente se cubrió con un cubre-objetos. Para mantener un ambiente húmedo en la base de la caja de petri se adicionó agua destilada estéril. Las cajas se mantuvieron en incubación a 25 °C hasta que se observó el crecimiento micelial. Para el análisis microscópico, el cubre-objeto se extrajo y se transfirió a un portaobjeto y se adicionó una gota de alcohol polivinílico y se observó bajo el microscopio (Johnson, 1946).

2.4.2 TAXONOMIA MOLECULAR

2.4.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

El ADNg de cultivos fúngicos fue extraído por el método de Conde-Ferráez (2008), modificado por el grupo de trabajo de la Dra. Blondy Canto Canché. De 0.1 -0.5 g de tejido micelial fue molido con pistilos de plástico (Sigma) en tubos Eppendorf de 1.5 ml en presencia de un amortiguador de extracción, se realizaron tres cambios frío-caliente congelando y descongelando en nitrógeno líquido-baño María 65 °C, posteriormente la muestra se incubó a 65 °C a baño María durante 25 min y después se agregaron 600 µl de fenol-cloroformo 1:1, se centrifugó por 20 min., 4 °C a 12000 rpm. Al sobrenadante se le agregaron 650 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó nuevamente por 10 min. Posteriormente el ADN del sobrenadante se precipitó con acetato de sodio (1/10 vol) y etanol absoluto (1 vol). La pastilla obtenida después de centrifugar se lavó 3 veces con etanol al 70%. Por último, la pastilla de ADN se resuspendió en 10-30 µl de agua ultrapura.

2.4.5 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El ADNg de cada hongo fue utilizado como molde para cada reacción de PCR. Se utilizaron cebadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3') que amplifican fragmentos de ADNr (White, *et al.*, 1990). Los cebadores universales ITS (Internal Transcribed Spacer), han sido utilizados para sistemática molecular debido a que presentan mayor grado de variación que otras regiones génicas. Las condiciones de corrida de la PCR fueron: desnaturalización inicial 94 °C durante 5 min, seguida de: desnaturalización (94 °C, 40 s), hibridación (53 °C, 1 min) y extensión (72 °C, 40 s) por 35 ciclos, seguido de una extensión final a 72 °C por 8 min. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis, la cual se realizó en agarosa al 1% y los fragmentos amplificados se visualizaron en un fotodocumentador de geles (Gel Doc-Biorad). Posteriormente se purificaron siguiendo las instrucciones del proveedor (Gene Clean II Kit, cat ROCHE 1001-400, Roche).

2.4.6 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para purificar las bandas se realizó una electroforesis en gel preparativo de agarosa al 1%. Con ayuda del trasiluminador UV se cortaron con bisturí las bandas de los fragmentos amplificados y se colocaron de manera independiente en tubos Eppendorf.

Las bandas se purificaron mediante el kit Gene Clean II (cat ROCHE 1001-400, Roche), siguiendo las instrucciones del proveedor. La concentración de las muestras purificadas se midió en un espectrofotómetro (Nanodrop).

2.4.7 SECUENCIACIÓN

Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar a MACROGEN, Inc., Korea, siguiendo las instrucciones para el envío de muestras para secuenciación (<http://www.macrogen.com>).

2.4.8 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. Con base a la mayor homología presentada para cada secuencia se determinó género y/o especies a la que corresponde.

2.4.9 CONSERVACIÓN DE CEPAS

Una vez que las colonias emergentes fueron purificadas, se procedió a su conservación mediante los siguientes métodos:

a) Inoculación en tubos con medio de cultivo

Las cepas puras se conservaron por quintuplicado en tubos con PDA, los cuales se incubaron a 25 °C hasta que el micelio cubrió la superficie del agar, posteriormente se refrigeraron a 4°C, en la oscuridad.

b) Inoculación en viales con agua destilada esterilizada

Varios fragmentos de agar (5 mm aprox.) del micelio fúngico se depositaron en viales con agua destilada estéril y se refrigeraron a 4 °C (Smith y Onions, 1994).

c) Ultracongelación.

En criotubos de 2 ml con glicerol al 10% se depositaron 0.5 ml de una suspensión de esporas/hongo y después de una hora se almacenaron en ultracongelación a -70 °C.



Figura. 2.3 Cenotes seleccionados para el aislamiento de cepas fúngicas: A) Oxola, B) Kikal del municipio de Homún.

2.5 RESULTADOS

En total se obtuvieron 116 aislados fúngicos de hojarasca sumergida colectada en los dos cenotes seleccionados. Estos aislados se purificaron, en total se obtuvieron 49 cepas diferentes, las cuales se cultivaron en diferentes medios para inducir la esporulación, paralelamente se elaboraron microcultivos con el objeto de observar caracteres importantes para su identificación morfológica como la conidiogénesis y la forma de las esporas.

De los diversos sustratos recolectados (Cuadro 2.2) del cenote Kikal se obtuvieron 19 cepas (39%) de las cuales 13 fueron aisladas de material de las trampas elaboradas con los sustratos nativos, cinco de materiales vegetales esterilizados y uno de materiales no esterilizados. Respecto al cenote Oxola se aislaron 30 cepas (61%), 15 provenientes de los sustratos nativos, ocho de materiales esterilizados y siete de los no esterilizados.

Un total de 17 cepas (35%) se determinaron taxonómicamente a nivel de género y cuatro a nivel especie (8%). Las 28 cepas restantes no fueron identificadas (57%) debido a que no desarrollaron estructuras reproductivas, las cuales son esenciales para su ubicación taxonómica bajo criterios morfológicos. En el cenote Oxola se identificaron cinco cepas del género *Fusarium* y sólo una de los géneros *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Hypocrea*, *Monodictys*, *Nectria*, *Penicillium* y *Pseudorobillarda*, dos se clasificaron a nivel de especie, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*. En el cenote Kikal se encontraron dos cepas del género *Fusarium*, una de los géneros *Cladosporium*,

Penicillium y *Scopulariopsis*, dos fueron clasificadas a nivel especie correspondiendo a *Fomitopsis meliae* y *Fusarium solani*.

Cuadro 2.2 Aislados fúngicos purificados obtenidos de los cenotes Oxola y Kikal en Homún, Yucatán, México.

No.	Micromiceto	Clave	Substrato	Cenote	No.	Micromiceto	Clave	Substrato	Cenote
1	<i>Aspergillus</i> sp.	OH-03	N	1	26	N.I	KH-10	N	2
2	<i>Bionectria ochroleuca</i>	OE-81	N	1	27	N.I	KH-11	N	2
3	<i>Cladosporium</i> sp.	KH-09	N	2	28	N.I	KH-13	N	2
4	<i>Clonostachys</i> sp.	OSE-79	N	1	29	N.I	KR-14	N	2
5	<i>Fomitopsis meliae</i>	KSE-64	E	2	30	N.I	OSN-55	N/E	1
6	<i>Fusarium solani</i>	OSN-54	N/E	1	31	N.I	KS-17	N	2
7	<i>Fusarium solani</i>	OE-80	E	1	32	N.I	KS-19	N	2
8	<i>Fusarium solani</i>	KSE-82	E	2	33	N.I	OH-22	E	1
9	<i>Fusarium</i> sp.	OH-04	N	1	34	N.I	OH-23	N	1
10	<i>Fusarium</i> sp.	KS-15	N	2	35	N.I	OH-27	N	1
11	<i>Fusarium</i> sp.	OH-28	N	1	36	N.I	OSN-33	N	1
12	<i>Fusarium</i> sp.	OH2-30	N	1	37	N.I	OSN-35	N/E	1
13	<i>Fusarium</i> sp.	OSN-32	N/E	1	38	N.I	OSN-38	N/E	1
14	<i>Fusarium</i> sp.	KSN-65	N/E	2	39	N.I	OSE-41	E	1
15	<i>Hypocrea lixii</i>	OSN-37	N/E	1	40	N.I	OSE-43	E	1
16	<i>Monodictys</i> sp.	OSE-75	E	1	41	N.I	KSE-45	E	2
17	<i>Penicillium</i> sp.	OSE-61	E	1	42	N.I	KSE-47	E	2
18	<i>Penicillium</i> sp.	KSE-83	N	2	43	N.I	OSE-52	E	1
19	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	OH-02	N	1	44	N.I	OSE-53	E	1
20	<i>Pseudorobillarda sojiae</i>	OSN-36	N/E	1	45	N.I	KSE-59	E	2
21	<i>Rhizoctonia solani</i>	OSE-73	N/E	1	46	N.I	KSE-62	E	2
22	<i>Scopulariopsis</i> sp.	KS-18	N	2	47	N.I	OSE-76	E	1
23	N.I	OR-05	N	1	48	N.I	OSN-78	N/E	1
24	N.I	OS-07	N	1	49	N.I	KE-85	E	2
25	N.I	KH-08	N	2					

N.I. no identificada. N = nativo, E = estéril, N/E = no estéril. 1.- Cenote Oxola. 2.- Cenote Kikal

2.6 DISCUSIÓN

De los 116 hongos obtenidos de la hojarasca sumergida de los dos cenotes, se seleccionaron 49, eliminándose aquellos que presentaron características macroscópicas similares, o bien aquellos que no pudieron ser aislados debido a la presencia de microorganismos contaminantes ocasionada por la abundante cantidad de materia orgánica en donde se encontraban los substratos seleccionados.

Del cenote Oxola se aisló una mayor cantidad de cepas (30) que en el cenote Kikal (19), esto pudo deberse a las condiciones propias del cenote, ya que las estrategias de aislamiento y recolección fueron las mismas (Cuadro 2.4). Cabe mencionar que el área circundante al cenote Oxola presenta mayor vegetación arbórea por lo que es constante el aporte de material vegetal, así mismo, por lo difícil de su acceso, este cenote está más protegido de la intervención humana, por lo que muy probablemente estos factores contribuyen al desarrollo de una mayor diversidad microbiológica en los restos vegetales que se acumulan en las orillas y en las que quedan sumergidas.

En cuanto a la metodología empleada para la detección de los micromicetos, para ambos sitios se aisló el mayor número de cepas en el material que fue colectado en las orillas de los cenotes e incubado directamente en cámaras húmedas. Este método, si bien permite obtener cepas de especies que están esporulando en el sustrato, requiere de experiencia para detectar las estructuras fúngicas emergentes de los tejidos vegetales además de destreza para transferir las esporas al medio de cultivo. Para complementar la información recabada en este estudio se sugiere la realización de más muestreos en diferentes épocas del año.

De las cepas aisladas del cenote Kikal, 13 fueron de los substratos nativos, cinco del sustrato que fue esterilizado y uno del no esterilizado. Respecto al cenote Oxola se aislaron 30 cepas, 15 fueron aisladas de los substratos nativos, ocho del sustrato esterilizado y siete del no esterilizado. Todos los aislados se conservaron en agua, tubo inclinado y ultra congelación por quintuplicado, para que la población pudiera conservar sus propiedades bioquímicas, genéticas y fisiológicas, reduciendo al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que el cultivo permanezca puro e inalterable (Weng- Alemán *et al.*, 2005).

A pesar de que se realizaron resiembras periódicas en tres medios diferentes (AM, EM y PDA), 28 cepas no desarrollaron estructuras reproductivas. Por esta situación no fue posible realizar su determinación taxonómica mediante caracteres morfológicos.

La identificación molecular se realizó para obtener y complementar una aproximación taxonómica sobre todo para los aislamientos en los cuales no se desarrollaron estructuras reproductivas. Los resultados obtenidos y comparados con la base de datos de GenBank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), y los datos obtenidos en el nucleotide Blast, sirvieron como referencia para asignar cinco aislados a nivel género y cuatro a nivel especie. La cepa OSE-53 con un porcentaje de identidad de 99% con un hongo endófito, corresponde a una especie aún no identificada.

Uno de los principales géneros detectados en el presente estudio fue *Fusarium*, con nueve aislados. Resultados similares fueron reportados por Gamboa-Angulo *et al.* (2012) también en materiales biológicos de cenotes de Yucatán. El género *Fusarium* tiene una distribución cosmopolita y es considerado un fitopatógeno, porque algunas especies producen micotoxinas en diversos hospedadores no especie-específicos, tanto en plantas silvestres como cultivadas (Rubini *et al.*, 2005; Rudgers *et al.*, 2004). En hongos filamentosos, la manipulación basada en la experiencia es la opción más directa para inducir cambios en la expresión de las características del cultivo, así como de sus compuestos (Gross, 2007; Schroeder *et al.*, 2007). Todos los aislados se cultivaron en tres medios diferentes (PDA, AM, EM), con la finalidad de promover su crecimiento e inducir la esporulación (Scherlach y Hertweck, 2006), para facilitar su identificación taxonómica mediante caracteres morfológicos. El empleo de diferentes tipos de medios puede favorecer la producción de diversas estructuras morfológicas (Bills *et al.*, 2008; Gloer, 2007; Schroeder *et al.* 2007). Sin embargo, la mayoría de los aislados no presentaron esporulación, esto puede ser debido a que son micelio estéril o bien a que las condiciones de los cultivos, incluyendo factores ambientales (luz, temperatura, Ph) no fueron los adecuados para promover la formación de estructuras reproductoras.

2.7 CONCLUSIONES

- Se purificaron un total de 49 aislados fúngicos
- Un total de 17 aislados fueron identificados a nivel de género
- Cuatro aislados fueron identificados a nivel de especie
- El género más frecuente fue *Fusarium* sp. con nueve aislados
- Del cenote Oxola se obtuvieron más aislados que del cenote Kikal
- De las estrategias de aislamiento utilizadas, la que resultó más eficiente fue la colocación de trampas con substratos nativos.
- El medio de PDA fue el más eficiente para favorecer el aislamiento y crecimiento de los hongos

2.8 REFERENCIAS

- Barnett, H.L. y B.B. Hunter (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota. 241 p.
- Beishir, L. (1983). Microbiology in Practice: individualized instruction for the health sciences. 3th edn. Harper and Row Publications. New York, U.S.A.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. A personal view. *Journal of Antibiotics*. 58: 1-26.
- Bills, G.F., G. Platas., A. Fillola., M.R. Jiménez., J. Collado., F. Vicente., J. Martín., A. González., J.R. Bur-Zimmermann., R. Tormo y F. Peláez (2008). Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. *Journal of Applied Microbiology*. 104:1644-1658.
- Carmichael, J.W., W.B. Kendrick, L. Conners y L. Sigler (1980). Genera of Hyphomycetes. University of Alberta Press, Canada. 386 pp.
- Conde-Ferráez., R. Grijalva-Arango y A.C. James-Kay (2008). A rapid DNA extraction method from mycelium which is suitable for PCR. *Revista latinoamericana de microbiología*. 50: 3-4.
- Demain, A.L. y S. Sanchez (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*. 62: 5-16.
- Gamboa-Angulo, M., S.C. De la Rosa-García., G. Heredia-Abarca y I.L. Medina-Baizabal (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatán peninsula, México. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(10), pp. 2305-2312. DOI: 10.5897/AJMR11.1129
- García, M.D. y F. Uruburu (2000). La conservación de cepas microbianas. *Act SEM*. 30: 12-6.
- Gloer, J.B. (2007). Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. Environmental and Microbial Relationships, 2nd Edition. The Mycota IV C.P. Kubicek. I. S. Druzhinina (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gross, H. (2007). Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 267-277.
- Hodell, D.A., M. Brenner., J.H. Curtis., R. Medina-González., E.I. Chan Can., A. Albornaz-Pat y T.P. Guilderson (2005). Climate change on the Yucatan Peninsula during the Little Ice Age. *Quaternary Research*. 63: 109-121.

-
- INEGI, (2014). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [En Línea]. <http://www.inegi.org.mx/> [23/02/14].
- Johnson, E.A. (1946). An improved slide culture technique for the study and identification of pathogenic fungi. *Journal of Bacteriology*. 51: 689-694.
- Jong, S.C. y J.M. Birminham (2001). "Cultivation and preservation on fungi in culture", in *The Mycota Systematics and evolution VII*, McLaughlin, D.J., E.G. McLaughlin and Lemke, P.A. (eds). Springer-Verlag. Berin, Heidelberg. pp. 193-202.
- Mejía-Ortíz, L.M., G. Yáñez, M. López-Mejía y E. Zarza-González (2007). Cenotes (anchialine caves) on Cozumel Island, Quintana Roo, México. *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 69, no. 2, p. 250-255.
- Morgan, C.A., N. Herman., P.A. White y G. Vesey (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*. 66: 183-193.
- OECD (2001). *Biological Resource Centres: Underpinning the future of life sciences and biotechnology*. OECD. Publications, Paris, France. pp 66.
- OECD, (2007). *Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres* [En línea] http://www.oecd.org/document/36/0,3343,en_2649_34537_38777060_1_1_1_1,00.html [19/02/2014]
- Parkinson, D. (1994). "Filamentous fungi", in *Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America (ed). Book Series, No 5.
- Reyes-Estebanez María Manuela de Jesús (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Mérida, Yucatán, México.
- Rubini, M., R. Silva., A. Pomilla., C. Maki., W. Araújo., D. Santos y J. Azebedo (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. Journal of Biological Sciences*. 1: 24-33.
- Rudgers, J., M. Koslow y K. Clay (2004). Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters*. 7: 42-51.
- Scherlach, K. y C. Hertweck (2006) Discovery of aspoquinolones A–D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 4: 3517-3520.
-

- Schmitter-Soto, J.J., E.F.A. Comin., J. Escobar-Briones., J. Herrera-Silveira., E. Alcocer., M. Suárez-Morales., V. Elías-Gutiérrez., L.E. Díaz-Arce y B. Steinich. (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico) *Hydrobiologia*. 467: 215-228.
- Schroeder, F.C., D.M. Gibson., A.C.L. Churchil.I., P. Sojikul., E.J. Worsthorn., S.B. Krasnoff y J. Clardy. (2007). Differential analysis of 2D NMR spectra: New natural products from a pilot-scale fungal extract library. *Angewandte Chemie*. 119: 919-922.
- Smith D., P. Green y J. Day (2000). Management and maintenance of culture collections. Presentado en: Curso Taller Internacional sobre gerencia y mantenimiento de colecciones de cultivos. Instituto de Sueros y Vacunas. La Habana. 22.
- Smith, D. y A.H.S. Onions (1994). The preservation and maintenance of living fungi. International Mycological Institute. CAB International Second edition. United Kingdom. 122 pp.
- Uzunova-Doneva, T. and T. Donev (2005). Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of culture collections*. Volume 4, pp. 17-28.
- White, T.J., T. Bruns., S. Lee y J. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal 6 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis et al. (eds). Academic Press Inc, 7 New York, pp. 315-322.
- Weng-Alemán, Z., O.R.E. Díaz y I. Álvarez-Molina (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 43 (3).
- WFCC, Guidelines (2010). World Federation for Culture Collections. For the Establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. 3rd Edition. International Cooperation Officer Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms c/o BelSPO avenue Louise, 231 Brussels B-1050, Belgium.

CAPITULO III. ENSAYOS SOBRE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

3.1 INTRODUCCIÓN

La capacidad antagónica de un microorganismo hacia los hongos fitopatógenos está relacionada con su potencial para destruir total o parcial de las poblaciones de patógenos (Cook, 2000); ya sea mediante la inhibición del fitopatógeno o bien limitando su desarrollo (Whipps y Lumsden, 2001; Paul, 1999a; 1999b). Estas interacciones de competencia y/o antagonismo entre especies de hongos y sus efectos son frecuentes en la naturaleza (Santander *et al.*, 2003; Shearer, 1995). La competencia entre especies de hongos se ha utilizado como control biológico para el manejo de enfermedades de plantas de importancia agrícola (Molina Mercader *et al.*, 2006; Sempere y Santamarina, 2008) y ha sido ampliamente reportada en condiciones naturales, así como en laboratorio (Gloer, 2007); en consecuencia una considerable cantidad de especies fúngicas con actividad antagónica hacia microorganismos fitopatógenos han sido reportadas, algunos ejemplos se mencionan en la cuadro 3.1.

La respuesta antagónica en los hongos se puede presentar mediante mecanismos relacionados con la competencia, el micoparasitismo y la antibiosis. Esta última se puede definir como la respuesta de dos o más organismos que resulta en el perjuicio de uno de ellos, generalmente es causado por la secreción de enzimas y/o de metabolitos secundarios (Benítez *et al.*, 2004; Benhamou y Brodeur, 2000), los cuales están íntimamente ligados a factores bióticos y abióticos (Poinar y Buckley, 2007). Bertrand *et al.* (2013) plantean básicamente cuatro tipos de interacciones: inhibición a distancia (antibiosis), zona de confrontación, inhibición por contacto y sobrecrecimiento (Figura 3.1).

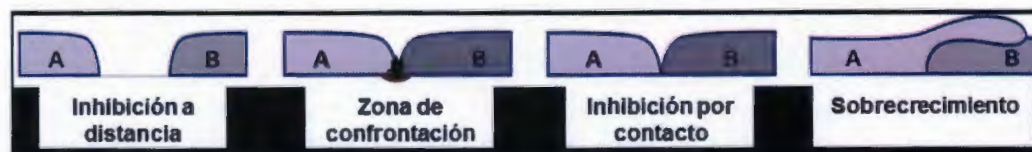
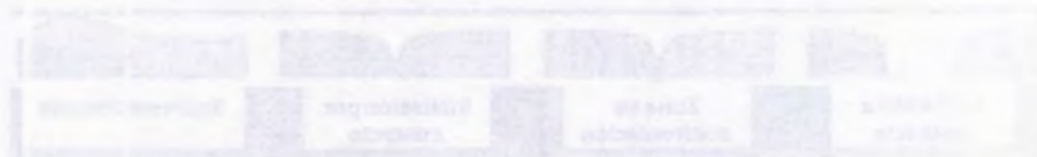


Figura 3.1 Diferentes tipos de interacciones entre co-cultivos de hongos en medio agar papa dextrosa (Bertrand *et al.*, 2013).

La relaciones antagonicas en el Reino Fungi son muy variadas, los mecanismos y las respuestas son dependientes de las especies implicadas y de las condiciones bióticas y abióticas. Por ejemplo Prada *et al.* (2009) aislaron el hongo endófito *Diaporthe* sp. de *Espeletia* sp. y lo evaluaron contra el patógeno *Phytophthora infestans* de la papa, en tres medios diferentes, en este caso el mecanismo antagonico fue mediante antibiosis ya que no hubo contacto físico entre los dos hongos y se le atribuye a la producción de compuestos secretados en el medio, como enzimas de tipo amilasa caseinasas, endoglucanasas, exoglucanasas lacasas y peroxidasas. Por otra parte, Quiroz-Sarmiento *et al.* (2008) reportaron que las respuestas antagonicas entre *Aspergillus nidulans*, *ochraceus*, *wenti*, *niger* y dos cepas del género *Trichoderma* sp. y los hongos fitopatógenos *Penicillium* sp. y *Fusarium* spp., fueron por antibiosis, competencia y micoparasitismo.

En el presente estudio los aislados fúngicos de los cenotes Oxola y Kikal (Cap. II) fueron confrontados contra cuatro hongos fitopatógenos aislados de campo, lo anterior con el objeto de conocer su potencial como organismos antagonicos y seleccionar cepas con posibilidades para ser empleadas en las futuras pruebas. Las especies fitopatógenas fueron *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. (CICY-05), *Corynespora cassicola* Berk. & M. A. Curtis, *Curvularia* sp. y *Fusarium* spp.



Cuadro 3.1 Algunas especies de hongos reportadas con actividad tipo antagonista.

Antagonista	Fitopatógeno	Mecanismo	Referencia
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>R. solani</i>	Micoparasitismo, competencia	Asran-Amal <i>et al.</i> (2010)
<i>Cephalosporium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	No reportado	Li <i>et al.</i> (2010)
<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Phytophthora nicotianae</i> , <i>F. solani</i>	No reportado	Li <i>et al.</i> (2010)
<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. ochraceus</i>	<i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> spp.	Micoparasitismo, antibiosis,	Quiroz-Sarmiento <i>et al.</i> (2008)
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Micoparasitismo, antibiosis,	Reyes <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	Competencia	Suárez-Estrella <i>et al.</i> (2007)
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Rhizoctonia solani</i>	Micoparasitismo	Hernández <i>et al.</i> (2006)
<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Reducción de la esporulación	Molina-Mercader <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus giganteus</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Micoparasitismo, antibiosis,	Moreno <i>et al.</i> (2003)
<i>Trichoderma</i> , <i>Gliocladium</i> sp.	<i>Attamyces</i> sp.	Micoparasitismo	Ortiz y Orduz, (2000)

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Evaluar las cepas fúngicas saprófitas aisladas de dos cenotes de Yucatán en un ensayo de actividad antagónica contra cuatro hongos fitopatógenos.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

La actividad antagónica de los aislados saprófitos se evaluó con la metodología propuesta por Asran-Amal *et al.* (2010). La prueba se realizó contra los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. (CICY-05), aislado de *Carica papaya* L.; *Corynespora cassicola* Berk. & M. A. Curtis (ITC-03) de *Capsicum anuum* L.; *Curvularia* sp. (ITC-01) de *Zea mays* y *Fusarium* spp. (CICY-04) de *Lycopersicum esculentum*.

Las cepas de hongos saprófitos y fitopatógenos se cultivaron en cajas de Petri (10 cm $\varnothing$) con PDA. A los siete días de cultivo un disco micelial del saprófito se depositó en un extremo de una caja de Petri (6 cm $\varnothing$) conteniendo PDA. En el extremo opuesto se transfirió un disco con la cepa fitopatógena bajo las mismas condiciones de crecimiento (Fig. 3.2). Todas las cajas se incubaron a 25 ± 2 °C, con luz continua. Como control negativo se utilizó un disco con micelio del fitopatógeno más un disco estéril de PDA al otro extremo de la caja. Como control positivo se aplicó un disco del micelio del fitopatógeno más un disco con medio sin hongo y con el antifúngico Mirage® (200 μ l/ml) al otro extremo de la caja. El radio de crecimiento del micelio se midió al tercer y al sexto día, a partir del borde exterior del disco con el patógeno en dirección al borde del crecimiento del antagonista; se empleó un calibrador milimétrico Truper®. Todos los tratamientos se hicieron por cuadruplicado.

El porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio del patógeno de cada bioensayo se determinó con la siguiente la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento del micelio} = (C - T) / C \times 100$$

Dónde:

C = Crecimiento del micelio (mm) del control - (fitopatógeno sin antagonista)

T = Crecimiento del micelio del hongo patógeno en presencia del saprófito (mm)

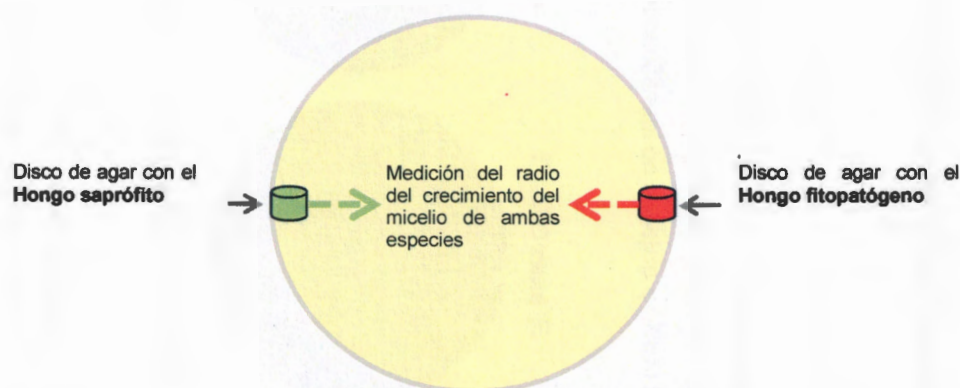


Figura 3.2.- Bioensayo de actividad antagónica entre hongos saprófitos y hongos fitopatógenos (Asran-Amal *et al.*, 2010).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se sometieron a una prueba *t-Student* comparando el crecimiento (cm) del micelio del fitopatógeno vs el crecimiento (cm) del micelio del fitopatógeno en presencia del hongo saprófito al sexto día del cultivo, utilizando el paquete estadístico SPSS.13.0. Todos los ensayos de contacto se realizaron por cuadruplicado.

3.6 RESULTADOS

Los resultados mostraron que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos y el control (Cuadro 3.2).

Inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*:

Para este fitopatógeno se obtuvo una inhibición de más del 60% (Fig. 3.3) ante la presencia de las cepas saprófitas *Hypocrea lixii* OSN-37 (67%) y *Rhizoctonia solani* OSE-73 (63%). En segundo término en un rango de 40–50 % de inhibición están las cepas *F. solani* KE-82 (48%), *Fusarium* sp. OSN-32 (48%), *P. mangiferae* OH-02 (46%) y aislados no identificados KSE-47 (48%), y KH-11 (44%).

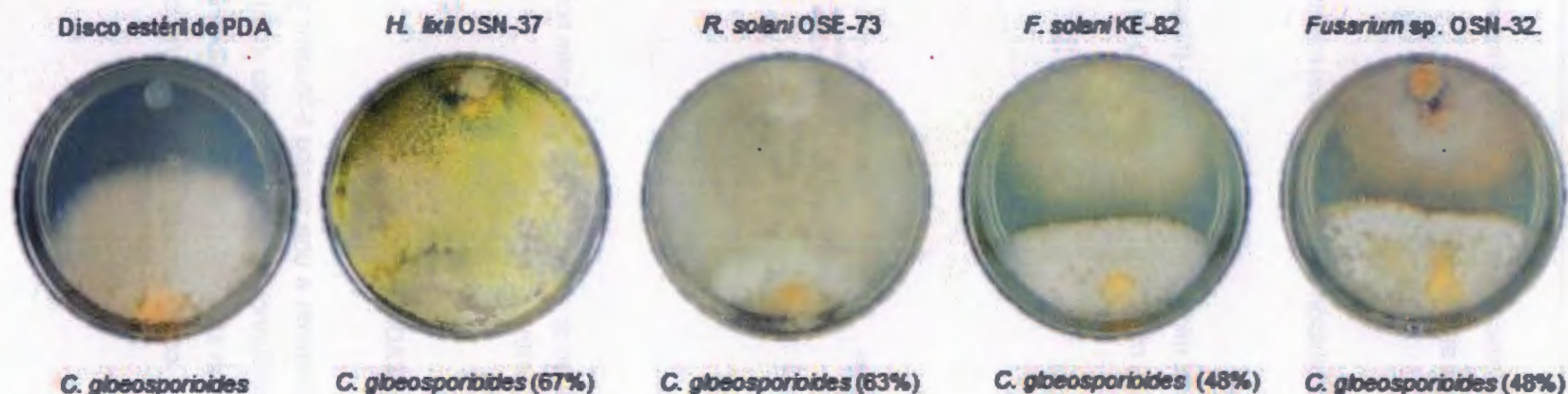


Figura 3.3 Inhibición del crecimiento (%) del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* en PDA (disco inferior) confrontado con hongos saprófitos (disco superior) aislados de restos vegetales de dos cenotes del estado de Yucatán, al sexto día de cultivo.

Inhibición del crecimiento micelial de *Corynespora cassicola*:

Las cepas que provocaron una inhibición de su crecimiento, entre el 58 y 64% (Fig. 3. 4) correspondieron a *R. solani* OSE-73 (64%), *F. solani* KE-82 (61%), *H. lixii* OSN-37 (61%), KH-08 (60%), el aislado no identificado OS-07 (58%), con valores entre 51% y 55% estuvieron las cepas *Fusarium* sp. OSN-54 (55%), *B. ochroleuca* OE-81 (54%), *Fusarium* sp. OSN-32 (53%), *Fusarium* sp. KSN-65, *Penicillium* sp. OSE-61, OSE-53 con 52%, *Clonostachys* sp. OE-79 y KSE-59 con 51%. El crecimiento de *C. cassicola* se redujo en un 40–50% con siete aislados (Fig. 3.4).

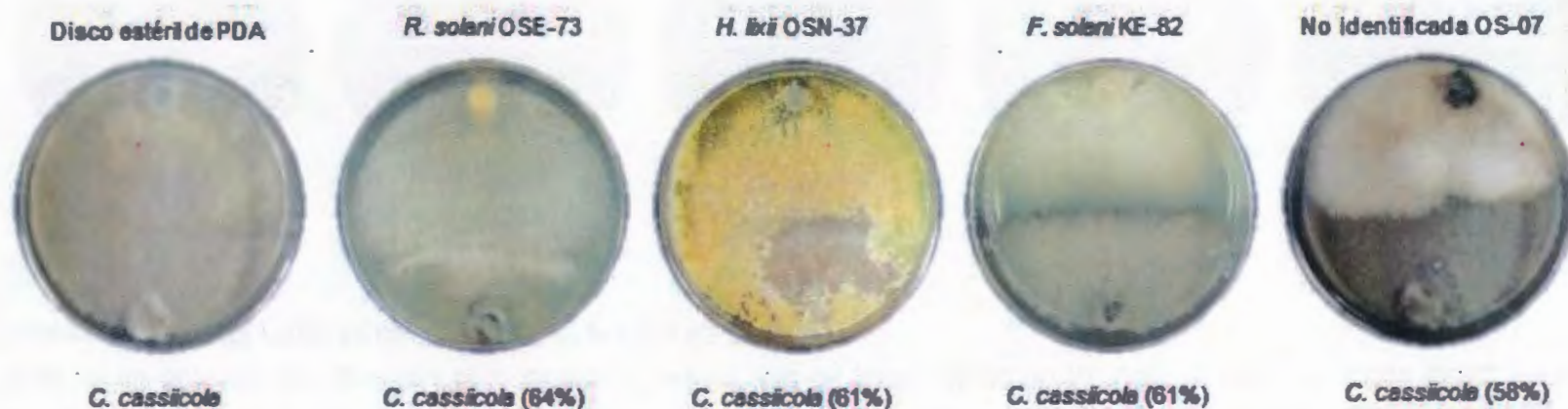


Figura 3.4 Inhibición del crecimiento (%) del hongo fitopatógeno *C. cassicola* en PDA (disco inferior) confrontado con hongos saprófitos (disco superior) aislados de restos vegetales de dos cenotes del estado de Yucatán, al sexto día de cultivo.

Inhibición del crecimiento micelial de *Curvularia* sp:

Por su parte, para el fitopatógeno *Curvularia* sp. las cepas que provocaron el mayor porcentaje de inhibición (Fig. 3.5) fueron *H. lixii* OSN-37 (72%), *F. solani* OE-80 (66%), *R. solani* OSE-73 (63%) y *P. sojae* OSN-36 (60%). El crecimiento de *Curvularia* sp. se redujo en un rango de 40–50% con los siguientes ocho aislados *F. meliae* KSE-64 (48%), KE-85 (47%), OSE-76 (45%), *F. solani* KE-82 (44%), *Fusarium* sp. OSN-32 y OSE-52 con 43%, KSE-47 (41%) y KS-17 (40%).

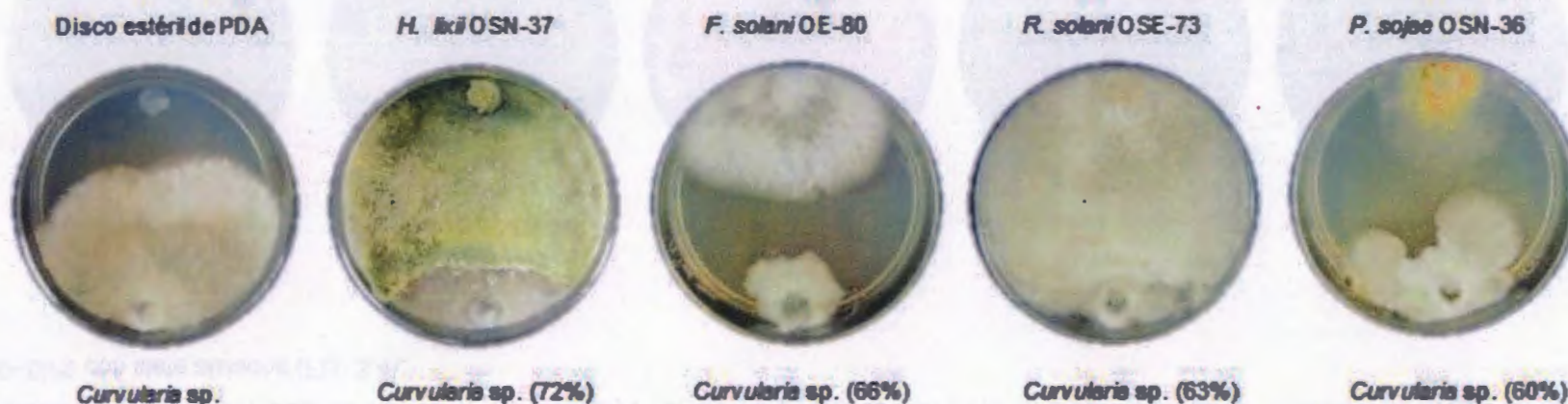


Figura 3.5 Inhibición del crecimiento (%) del hongo fitopatógeno *Curvularia* sp. en PDA (disco inferior) confrontado con hongos saprófitos (disco superior) aislados de restos vegetales de dos cenotes del estado de Yucatán, al sexto día de cultivo.

Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp:

Para *Fusarium* spp. las cepas que provocaron el mayor porcentaje de inhibición (Fig. 3.6) fueron *H. lixii* OSN-37 (77%), *R. solani* OSE-73 (55%). El crecimiento de *Fusarium* spp. se redujo en un 40–50% con 11 aislados entre los que destacan OSE-53 (49%), *F. solani* KE-82, OS-07, OSE-41 y KE-85 con 47%, *F. solani* OSN-54 (45%), *B. ochroleuca* OE-81 y OH2-27 (42%), *Fusarium* sp. OSN-32 y KSE-47 con 40%.

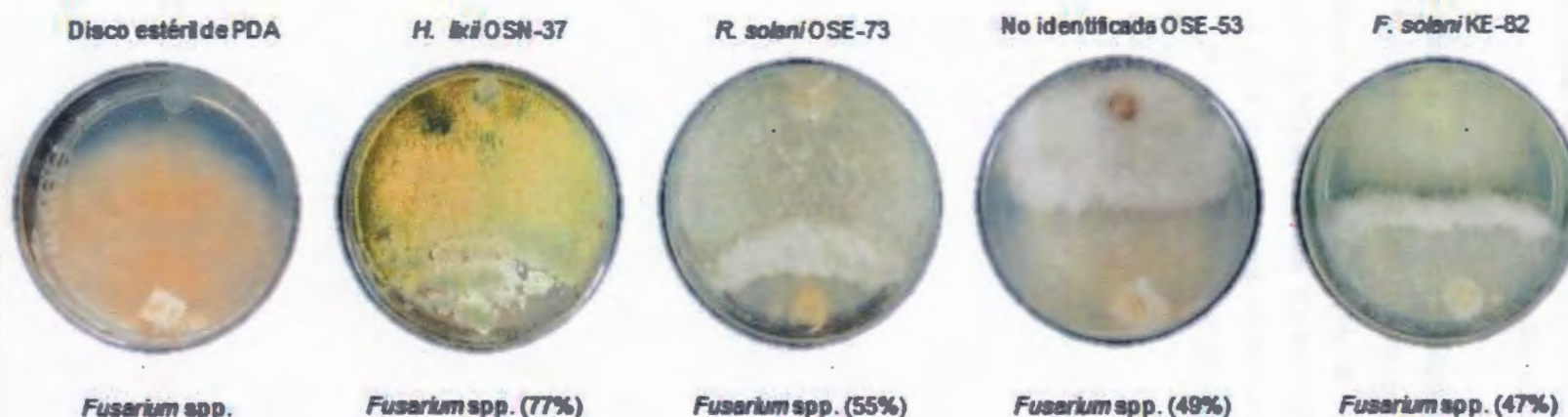


Figura 3.6 Inhibición del crecimiento (%) del hongo fitopatogeno *Fusarium* spp. en PDA (disco inferior) confrontado con hongos saprófitos (disco superior) aislados de restos vegetales de dos cenotes del estado de Yucatán, al sexto día de cultivo.

Colletotrichum gloeosporioides fue el hongo fitopatógeno que presentó el menor grado de inhibición ante las confrontaciones.

Por su parte, la cepa patogénica *Fusarium* spp. fue inhibida en la confrontación por tres aislamientos saprófitos: *H. lixii* OSN-37, *R. solani* OSE-73 y *P. mangiferae* OH-02. El fitopatógeno *Curvularia* sp. presentó inhibición ante cuatro cepas: *H. lixii* OSN-37, *F. solani* OE-80, *P. sojae* OSN-36 y *P. mangiferae* OH-02. La especie *C. cassicola* fue la que presentó mayor sensibilidad ante la mayoría de los hongos saprófitos al ser inhibida en más de un 50% por 16 de las cepas confrontadas (Cuadro 3.2).

Datos correspondientes al sexto día de crecimiento en medio de cultivo PDA.

Especie	Clave	Cenote	Inhibición del crecimiento del micelio (%)			
			<i>C. cassicola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Fusarium</i> spp.
<i>Bionectria ochroleuca</i> *	OE-81	1	54 °	26 °	23 °	42 °
<i>Clonostachys</i> sp.	OE-79	1	51 °	33 °	20 °	28 °
<i>Fomitopsis meliae</i> *	KSE-64	2	37 °	5 °	48 °	23 °
<i>Fusarium solani</i> *	OSN-54	1	55 °	33 °	26 °	45 °
<i>Fusarium solani</i> *	OE-80	1	50 °	38 °	66 °	37 °
<i>Fusarium solani</i> *	KE-82	2	61 °	48 °	44 °	47 °
<i>Fusarium</i> sp.	OH-04	1	46 °	11 °	14 °	40 °
<i>Fusarium</i> sp.	KS-15	2	38 °	31 °	12 °	29 °
<i>Fusarium</i> sp.	OSN-32	1	53 °	48 °	43 °	40 °
<i>Fusarium</i> sp.	KSN-65	2	52 °	25 °	30 °	37 °
<i>Hypocrea lixii</i> *	OSN-37	1	61 °	67 °	72 °	77 °
<i>Monodictys</i> sp.	OSE-75	1	32 °	3 °	-1	19 °
<i>Penicillium</i> sp.	OSE-61	1	52 °	13 °	25 °	34 °
<i>Penicillium</i> sp.	KE-83	2	23 °	-9 °	36 °	37 °
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> *	OH-02	1	59 °	46 °	51 °	59 °

<i>Pseudorobillarda sojae</i> *	OSN-36	1	33 ^c	1 ^c	60 ^c	29 ^c
<i>Rhizoctonia solani</i> *	OSE-73	1	64 ^c	63 ^c	63 ^c	55 ^c
<i>Scopulariopsis</i> sp.	KS-18	2	42 ^c	35 ^c	24 ^c	25 ^c
N.I	OR-O5	1	25 ^c	2 ^c	24 ^c	20 ^c
N.I	OS-07	1	58 ^c	34 ^c	36 ^c	47 ^c
N.I	KH-08	2	60 ^c	17 ^c	26 ^c	38 ^c
N.I	KH-11	2	39 ^c	44 ^c	7 ^a	25 ^c
N.I	KH-13	2	26 ^c	-2 ^c	26 ^c	23 ^c
N.I	KS-17	2	21 ^c	8 ^c	40 ^c	30 ^c
N.I	KS-19	2	38 ^c	24 ^c	25 ^c	38 ^c
N.I	OH2-22	1	30 ^c	5 ^c	2	30 ^c
N.I	OH2-23	1	30 ^c	9 ^c	16 ^c	31 ^c
N.I	OH2-27	1	30 ^c	14 ^c	9 ^a	42 ^c
N.I	OSN-35	1	44 ^c	39 ^c	-17 ^c	35 ^c
N.I	OSN-38	1	39 ^c	0 ^c	23 ^c	25 ^c
N.I	OSE-41	1	32 ^c	13 ^c	30 ^c	47 ^c
N.I	OSE-43	1	46 ^c	25 ^c	10 ^a	29 ^c
N.I	KSE-47	2	58 ^c	48 ^c	41 ^c	40 ^c
N.I	OSE-52	1	36 ^c	23 ^c	43 ^c	34 ^c
N.I*	OSE-53	1	52 ^c	39 ^c	35 ^c	49 ^c
N.I	OSN-55	1	43 ^c	10 ^c	21 ^c	28 ^c
N.I	KSE-59	2	51 ^c	16 ^c	27 ^c	29 ^c
N.I	OSE-74	1	20 ^c	16 ^c	15 ^c	15 ^b
N. I	OSE-76	1	32 ^c	8 ^c	45 ^c	35 ^c

N.I	OSN-78	1	37 ^c	17 ^c	9 ^a	32 ^c
N.I	KE-85	2	48 ^c	24 ^c	47 ^c	47 ^c
Control positivo			80 ^c	77 ^c	67 ^c	76 ^c
Control negativo			0	0	0	0

Valores en las columnas con diferentes letras presentan diferencias (t-Student): a) significativas ($P < 0.05$), b) muy significativas ($P < 0.01$), c) altamente significativas ($P < 0.001$).

N.I = No identificada. Control positivo fitopatógeno + disco estéril de PDA con antifúngico.* Se realizó análisis molecular

3.3 DISCUSIÓN

La selección de hongos aplicando el método *in vitro* para detectar actividad antagónica, proporciona información confiable de la supresión de la actividad de los organismos que potencialmente pueden ser llevados a campo y permite determinar en condiciones controladas su actividad contra patógenos de importancia agrícola (Delgado y Vázquez, 2010; Peng y Sutton, 1991).

En el presente trabajo se detectaron 17 aislados (41%) fueron capaces de inhibir el crecimiento a un grado $\geq 50\%$ contra al menos uno de los cuatro fitopatógenos evaluados. En los resultados resalta el aislado correspondiente a la cepa *H. lixii* OSN-37, la cual presentó la mayor actividad antagónica contra los cuatro fitopatógenos, seguido de las cepas *R. solani* OSE-73, *F. solani* OE-80 y *P. mangiferae* OH-02, estos tres últimos inhibieron a tres de los patógenos confrontados.

En algunas cepas se detectó competencia por sustrato. Esta se basa en la respuesta de dos o más organismos ante el aprovechamiento de un mismo requerimiento (como espacio y nutrientes) de disponibilidad limitada (Živković *et al.*, 2010). Este mecanismo se detectó en las cepas que generalmente inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos en más del 50% tales como *R. solani* OSE-73, *H. lixii* OSN-37 y *P. sojae* OSN-36 en las cuales se observó un mayor velocidad de crecimiento del micelio, presentándose incluso un sobrecrecimiento (Bertrand *et al.*, 2013). Esto pudo deberse a un eficaz aprovechamiento de los nutrientes del medio de cultivo, que permitió cubrir un área mayor de la superficie del medio, lo que generó una inhibición del crecimiento de las cepas confrontadas por falta de espacio disponible.

Otro mecanismo detectado correspondió a la antibiosis, el cual se visualizó claramente en los confrontamientos con *F. solani* OE-80 y *P. mangiferae* OH-02 mediante la formación de un halo de inhibición. Entre los hongos confrontados (fitopatógeno-saprófito) el mecanismo de la antibiosis puede involucrar diversos compuestos de bajo peso molecular volátiles y no volátiles, antibióticos y péptidos difusibles en el medio que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Benítez *et al.*, 2004), como por ejemplo: a) trichodermina, metabolito secundario obtenido del género *Trichoderma* (Dennis y Webster, 1971), b) gliovirina y gliotoxina obtenidas de *Gliocladium virens*, (Howell y Stipanovic, 1995) y c) los compuestos furánicos

antimicrobianos como la 6-pentil-pirona sintetizada por *Fusarium graminearum* (Cooney *et al.*, 2001). Incluso la inhibición del crecimiento por antibiosis también pudiera deberse a la producción y secreción de diversas enzimas como amilasa, caseinasas, lacasas, peroxidasas, endoglucanasas y exoglucanasas y un posible efecto concomitante (Yuen *et al.*, 1999).

De manera general, los efectos en la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos en presencia de las cepas saprófitas pudieran estar relacionados también con el micoparasitismo, característica ya reportada para el género *Trichoderma*. Los aislados de *H. lixii* OSN-37 y probablemente con *R. solani* OSE-73 y *P. sojae* OSN-36 presentaron este mecanismo. Se considera que el micoparasitismo puede estar regulado por la producción de diversas enzimas, como la quitinasa, β -glucanasa, celulasas y proteasas (Harman, 2006; Goldman *et al.*, 1994; Živković *et al.*, 2010). En sus estudios sobre la actividad antagónica de 13 cepas de *Trichoderma* spp. contra el patógeno *Rhizoctonia* sp. Reyes *et al.*, (2008) mencionan que estas enzimas provocan un aumento del tamaño celular por la desorganización de la célula, retracción y ruptura de la membrana plasmática, así como su alteración y distorsión, hasta la posterior lisis celular, estos eventos debilitan las células fúngicas y favorecen la colonización masiva del hospedante. Estas características de cambios morfológicos en diversas estructuras fúngicas han sido reportadas en especies saprófitas y parásitas como *Ascochyta* sp., *Cephalosporium* sp., *Melasmaia* sp., *Phyllosticta* sp., (Hai-Yan *et al.*, 2010), *Aspergillus* (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008; Suárez-Estrella *et al.*, 2007), *Botrytis cinerea* (Moreno *et al.*, 2003), *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Gliocladium* y *Trichoderma* (Ortiz y Orduz, 2000), *Penicillium* (Molina-Mercader *et al.*, 2006), *Phialophora* y *Pythium* (Whipps y Lumsden, 2001) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Álvarez-Castellanos *et al.*, 2001).

La especie *H. lixii* OSN-37, provocó la mayor inhibición micelial en los cuatro hongos fitopatógenos evaluados, se ha comprobado que el género *Hypocrea* corresponde a la fase sexual de muchas especies del género anamorfo *Trichoderma*, dentro del cual se han documentado diversas cepas con importantes propiedades antagónicas, por lo que son consideradas como agente de biocontrol (Asran-Amal *et al.*, 2010; García *et al.*, 2006; Ehteshamul y Ghaffar, 1992). En algunas especies del género *Trichoderma* se han reportado mecanismos fisiológicos y/o bioquímicos como la liberación de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles para debilitar a los fitopatógenos

(Vinale *et al.*, 2006; Ait-Lahsen *et al.*, 2001). Este género tiene amplia distribución, se han descrito alrededor de 220 especies (www.indexfungorum.org); en Yucatán es el primer reporte de esta especie con actividad antagonista.

En este estudio se resalta la importancia que tendría el conocimiento de los diversos mecanismos de acción que pueden presentar los hongos saprófitos de la Península de Yucatán como plataforma para evaluar su potencial aplicación como agentes de control biológico en la agricultura. La utilización de consorcios biológicos en el control de enfermedades es una opción altamente viable, pero habría que considerar y evaluar el impacto ambiental, persistencia en el suelo, condiciones ambientales adversas, organismos introducidos a nuevos agroecosistemas, mecanismos de defensa de los patógenos debido a que hay un conocimiento escaso del probable impacto ecológico de los consorcios biológicos (Duffy *et al.*, 2003). Por lo tanto, es muy importante contar con cepas nativas para preparar los formulados para región. El control biológico de patógenos de plantas es una alternativa ecológicamente amigable que puede disminuir el daño causado al ambiente por la aplicación de plaguicidas sintéticos (Alwathnani *et al.*, 2012).

VI. CONCLUSIONES

- Entre los 41 micromicetos evaluados en los ensayos de actividad antagónica en cultivos duales, 15 mostraron propiedades antagónicas con una significativa intensidad de inhibición entre 50–60%, contra al menos uno de los fitopatógenos.
- Tres cepas aisladas de los dos cenotes en estudio demostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de tres o más hongos fitopatógenos, las cuales correspondieron a *Hypocrea lixii* OSN-37, *Rhizoctonia solani* OSE-73 y *Pestalotiopsis mangiferae* OH-02.
- Con esto se demuestra que algunos micromicetos que habitan en los restos vegetales de los cenotes poseen la característica de limitar el crecimiento de hongos fitopatógenos al ser confrontados.

3.5 REFERENCIAS

- Ait-Lahsen, H., A. Soler., M.J. Rey., J. De la Cruz., E. Monte y A. Llobell (2001). An antifungal Exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. 67: 5833-5839.
- Álvarez-Castellanos, P.P., C.D. Bisshop y M.J. Pascual-Villalobos (2001). Antifungal activity of the assential oil of flowerheads of garland *chrysanthemum* (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. Phytochemistry. 57: 99-102.
- Alwathnani, HA., K. Perveen., R. Tahmaz y S. Alhaqbani (2012). Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under in vitro and pot conditions. African Journal of Microbiology Research. 6: 312-319.
- Asran-Amal, S.M., K.K. Moustafa-Mahmoud., O.H. Sabet y E.I. Banna (2010). In vitro antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. Saudi Journal of Biological Sciences. 17: 153-157.
- Benhamou, N. y J. Brodeur (2000). Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*. The causal agent of green mold. Phytopathology. 90: 932-943.
- Benítez, T., A.M. Rincón, M.C. Limón y A.C. Codón (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International. Microbiology. 7: 249-260.
- Bertrand, S., O. Schumpp., N. Bohni., A. Bujard., A. Azzollini., M. Monod., K. Gindro y J.L. Wolfender (2013). Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high – throughput differential ultra - high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. Journal of Chromatography. 1292: 219-228.
- Cook, R.J. (2000). Advances in plant health management in the twentieth century. Annual Review of Phytopathology. 38: 95-116.
- Cooney, J.M., Lauren, D.R y M.E. Di Menna (2001). Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 49: 522-526.

-
- Delgado, E.F. y S.M. Vásquez (2010). Control biológico de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. y Sacc.) en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante hongos endófitos antagonistas. La Granja. 11: 36-43.
- Dennis, C. y J. Webster (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotic. Transactions of the British Mycological Society. 57:25-39.
- Duffy, B., A. Schouten y J.M. Raaijmakers (2003). Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annual Review of Phytopathology. 41: 501-538.
- Ehteshamul, H.S. y A. Ghaffar (1992). Efficacy of *Trichoderma* spp. and *Rhizobium meliloti* in the control of root rot of fenugreek. Pakistan Journal of Botany. 24: 217-221.
- García, R., R. Ricia., C. Zambrano y L. Gutiérrez (2006). Desarrollo de un fungicida biológico con base a una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región Andina Venezolana. En memorias del taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana del 28-31 de mayo del 2006.
- Gloer, J.B. (2007). Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. Environmental and Microbial Relationships, 2nd Edition. The Mycota IV C.P. Kubicek and I. S. Druzhinina (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Goldman, H.G., C. Hayes y G.E. Harman (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Trends in Biotechnology. 12: 478-482.
- Hai-Yan, Li., Chun-An, Zhao., Chen-Jian, Liu y X. Xiao-Fei (2010). Endophytic Fungi Diversity of Aquatic/Riparian Plants and Their Antifungal Activity In Vitro. The Journal of Microbiology. Vol. 48, No. 1, pp. 1-6.
- Harman, G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96: 190-194.
- Heredia, G.E. y S.F. Delgadillo (2000). El ajo en México. Origen, mejoramiento genético tecnología de producción. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Instituto Nacional de Investigación Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro Campo Experimental Bajío. Celaya. 101 p.
-

- Hernández, M.S., P.A. Sierra y A. Carr (2006). Evaluación in vitro del antagonista de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de Piña. (*Ananas comosis* L. Merr). En memorias del Taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana del 28-31 de mayo del 2006.
- Howell, C.R. y R.D. Stipanovic (1995). Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology*. 85: 469-472.
- Indexfungorum, (2014). Names [En Línea] <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> [18/02/14].
- Molina-Mercader, G., S. Zaldúa-Flores., G. González-Vargas y E. Sanfuentes-Von Stowasser (2006). Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque*. 27: 126-134.
- Moreno, A. B., A. Martínez del Pozo, M. Borja y B. San Segundo (2003). Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 93: 1344-1353.
- Ortiz, A. y S. Orduz. (2000). In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia*. 150: 53-60.
- Paul, B. (1999a). Suppression of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Phytium radiosum*. *FEMS Microbiology Letters*. 176: 25-30.
- Paul, B. (1999b). *Phytium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiology Letters*. 181: 277-280.
- Peng, G. y J. Sutton (1991). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry. *Journal of Plant Pathology*. 13: 247-257.
- Poinar, jr. G.O. y R. Buckley (2007). Evidence of mycoparasitism and hypermycoparasitism in Early *Cretaceous* amber. *Mycological Research*. 111: 503-506.
- Prada, H., L. Ávila., R. Sierra., A. Bernaly y S. Restrepo (2009). Caracterización morfológica y molecular de antagonismo entre el endófito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 26: 198-201.

- Quiroz-Sarmiento, V.F., A.A. Ferrera-Cerrato y M.E. Lara-Hernández (2008). Antagonismo *in vitro* de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología*. 26: 27-34.
- Reyes, Y., B. Martínez y D. Infante (2008). Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista de Protección Vegetal*. Vol. 23 No. 2: 112-117.
- Santander, C., J. Montealegre y R. Herrera (2003). Control Biológico de *Rhizoctonia* solani en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y Bromuro de Metilo. *Ciencia. Investigación. Agricultura*. 30: 107-112.
- Sempere, F. y M.P. Santamarina (2008). Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berck & Broowe) Petch. by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Curv & Thom. *International Journal of Food Microbiology* 122: 35-43.
- Shearer, C.A. (1995). Fungal competition. *Canadian Journal of Botany*. 73 suppl. 1:S1259-S1264.
- Suárez-Estrella, F., C. Vargas-García., M.J. López., C. Capel y J. Moreno (2007). Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Crop Protection*. 26: 26-53.
- Vinale, F., R. Marra, F. Scala, E.L. Ghisalberti, M. Lorito y K. Sivasithamparam (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* 43: 143-148.
- Whipps, J.M. y D.R. Lumsden (2001). Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: Status and prospects. In: Butt, T.M., C.W. Jackson, N. Magan (eds.), *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potentials*. CABI Publishing. Wallingford. pp 9-22.
- Yuen, T., K. Hyde y I. Hodgkiss (1999). Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microbiology Ecology*. 37: 257-62.
- Živković, S., S. Stojanovic., Z. Ivanovic., V. Gavrilovic., T. Popovic y J. Balaz (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*. 62: 611-623.

**Evaluación antimicrobiana de extractos obtenidos de micromicetos nativos de
Yucatán**

Pablo Moreno-Pérez¹, Marcela Gamboa-Angulo^{1*}, Gabriela Heredia², Blondy Canto
Canché¹, Cecilia M. Rodríguez García¹, Irma L. Medina-Baizabal¹, Leticia Peraza
Echeverría¹

¹*Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43
No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México.*

²*Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología A.C., Km 2.5 antigua
carretera a Coatepec No. 351, Xalapa 91070, Veracruz, México.*

Autor para correspondencia: Marcela Gamboa-Angulo, mmarcela@cicy.mx

RESUMEN

Un total de 49 cepas fúngicas aisladas de hojarasca sumergida en dos cenotes de la península de Yucatán se cultivaron en arroz fermentado y se obtuvieron sus respectivos extractos orgánicos macerados en acetato de etilo (EAE) y metanol (EM). Todos los extractos se evaluaron contra los hongos fitopatógenos *Alternaria chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis* y las bacterias *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris*, utilizando ensayos de microdilución. El 82% de los extractos fúngicos mostraron antimicrobiana, ya sea antifúngica o antibacteriana (2,000 µg/ml y 200 µg/ml, respectivamente) contra al menos uno de los patógenos evaluados. *Penicillium* sp. OSE-61, *Rhizoctonia solani* OSE-73, *Fusarium* sp. OH2-30 e *Hypocrea lixii*. OSN-37 tuvieron actividad contra al menos tres de los cinco fitopatógenos evaluados. Los EAE y EM de *Fusarium solani* OE-80 presentaron actividad inhibitoria contra *X. campestris* ($\leq 25\mu\text{g/ml}$); los extractos más activos correspondieron a los de EAE de *Penicillium* sp. OSE-61 contra *A. chrysanthemi* ($\leq 500\mu\text{g/ml}$), *Fusarium* KS-15 e *H. lixii* OSN-37 contra *X. campestris* ($\leq 25\mu\text{g/ml}$), esta última cepa también tuvo buen efecto en *C. gloeosporioides* y *M. fijiensis* (1000 µg/ml). Esta investigación contribuye a enriquecer el escaso conocimiento sobre la actividad biológica de hongos anamórficos nativos de los cenotes de Yucatán y su potencial uso en aplicaciones biotecnológicas en la agricultura.

Palabras clave: Cenotes, Extractos fúngicos, *Fusarium*, *Hypocrea*, micromicetos.

Introducción

Actualmente es necesario reducir la aplicación de plaguicidas sintéticos en la agricultura y evitar el colapso de ecosistemas que eventualmente degrada el bienestar de la población humana. Estos eventos han llevado a la búsqueda de alternativas amigables con el ambiente, como el uso de productos de origen natural, que permiten un desarrollo sostenible en la actividad agrícola. En la búsqueda de estas alternativas, los microorganismos representan una fuente abundante de compuestos novedosos, con diversas propiedades biológicas (Cantrell *et al.*, 2012; Demain y Sanchez, 2009; Newman, 2012). Actualmente se encuentran patentes de extractos fúngicos como el de *Colletotrichum dematium* con actividad inmunosupresora y antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia* (Strobel *et al.*, 2011). Las investigaciones en este campo continúan para incrementar las opciones de productos naturales efectivas en el control de enfermedades agrícolas.

En particular, en la Península de Yucatán se han aislado micromicetos cuyos extractos y compuestos puros poseen efecto antifúngico. Entre éstos se encuentra *Muscodor yucatanensis*, un endófito de las hojas de *Bursera simaruba*, que libera compuestos orgánicos volátiles con efectos antifúngicos contra *Alternaria solani*, *Guignardia mangifera*, *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *Rhizoctonia* sp; otro ejemplo es *Edenia gomezpompae* que produce preusomerina EG1 y preusomerina EG2, ambos inhiben a los hongos *Colletotrichum* sp. y *Phomopsis* sp. (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008; 2010).

En nuestro grupo de investigación se han realizado estudios exploratorios enfocados a la detección de micromicetos en áreas tropicales del sureste de México, con la capacidad de controlar fitopatógenos de importancia agrícola. Entre estos se han detectado a las cepas *Beltrania rhombica* TH26, *Fusarium* sp. XH1Ga y varios aislamientos no identificados (TA53, TH34, 2TA2, 2TA6, 2TS6, 2XA7) con actividad contra los hongos *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y varias bacterias zoo y fitopatógenas (Gamboa-Angulo *et al.*, 2012; Reyes-Estebanez *et al.* 2011). Debido a la evidente actividad biológica de los extractos fúngicos se continuó con esta búsqueda. En el presente trabajo el objetivo se dirigió a la obtención de los extractos orgánicos en acetato de etilo y metanol de 49 cepas fúngicas obtenidas de dos

cenotes del estado de Yucatán, y su evaluación contra los hongos fitopatógenos *Alternaria chrysanthemi*, *C. gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, y las bacterias *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris*, finalmente los extractos mas activos se fraccionaron por partición y se determinaron sus concentraciones mínimas inhibitorias (MIC, por sus siglas en inglés), pues algunos mostraron actividad inhibitoria comparativa a un producto antifúngico comercial.

Materiales y métodos

Hongos saprófitos

Las especies fúngicas se aislaron de hojarasca sumergida en los cenotes Kikal y Oxola del municipio de Homún, Yucatán y se encuentran depositadas en el cepario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.

Cultivo de los hongos saprófitos y extracción orgánica

Se inoculó arroz fermentado con una suspensión de esporas (1×10^5 esporas/ml) de cepa correspondiente y se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ con fotoperiodo de 12/12 horas de luz/oscuridad (Soman et al., 2001). A los 40 días de cultivo se congelaron y liofilizaron. Posteriormente, los cultivos se molieron y las extracciones se realizaron por maceración a temperatura ambiente (24 horas $3\times$) y posteriormente con metanol bajo las mismas condiciones. Los disolventes se eliminaron en un evaporador rotatorio a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo presión reducida, obteniéndose los extractos orgánicos secos de acetato de etilo (EAE) y metanol (EM) de cada cepa.

Los extractos de acetato de etilo que presentaron actividad antifúngica se particionaron en hexano-acetonitrilo ($3\times$, 2:1, 1:1, 1:1). Los disolventes se eliminaron en un evaporador rotatorio a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo presión reducida, obteniéndose los correspondientes extractos hexánicos (A) y de acetonitrilo (B), y en la mayor parte de los casos un precipitado soluble en metanol (C).

Identificación molecular de los hongos

Las especies de hongos cuyos extractos mostraron actividad antifúngica se sometieron a análisis molecular para su identificación taxonómica siguiendo la técnica descrita previamente por Reyes-Estebanez *et al.* (2011). Las secuencias se compararon en las bases de datos públicas (GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)).

Fitopatógenos evaluados

Los extractos orgánicos se evaluaron contra los hongos *Alternaria chrysanthemi* (CICY004), *Colletotrichum gloeosporioides* (CICY005), *Mycosphaerella fijiensis* (CI233), las bacterias *Erwinia carotovora* (ATCC138) y *Xanthomonas campestris* (ATCC10547).

Evaluación antimicrobiana por el método de microdilución en placa

Hongos fitopatógenos

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos, siguiendo la técnica modificada de Andrews (2001). Los extractos orgánicos fúngicos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 40 µg/ml. A todos los pozos se le adicionaron 90 µl de medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) y 10 µl de los extractos fúngicos a evaluar (40 µg/µl). Finalmente, todos los pozos se inocularon con 100 µl de la suspensión de esporas del hongo fitopatógeno: *A. chrysanthemi* 2.5×10^4 , *C. gloeosporioides* 1×10^5 , *M. fijiensis* 5×10^4 para obtener un volumen final de 200 µl, con una concentración final de 2,000 µg/ml del extracto fúngico y 5% del DMSO. Como control de crecimiento (control negativo) se utilizó el medio RPMI-1640, el fitopatógeno y DMSO al 5%; y como control de inhibición del crecimiento (control positivo) DMSO al 40%, Mirage (200 µl/ml) y Neomicol al 0.15% para *A. chrysanthemi*, *C. gloeosporioides* y *M. fijiensis*, respectivamente. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Las microplacas se incubaron por 96 horas a 26 °C y 12/12 horas de luz/obscuridad.

Las fracciones hexanánicas y de acetonitrilo obtenidas de la partición de los EAC y los EM se evaluaron a una concentración final de 1,000, 500 y 250 µg/ml de la muestra y a 2.5, 1.25, 0.62 % de DMSO. Las lecturas se realizaron de manera visual mediante la escala numérica establecida por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2002) y se reportan como inhibición del crecimiento (IC).

Bacterias fitopatógenas

E. carotovora y *X. campestris* se inocularon en Caldo Müeller-Hinton (CMH) y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Los cultivos se ajustaron en CMH por comparación visual con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland a una concentración final

aproximada de 5×10^6 ufc/ml. Los extractos fúngicos evaluados se disolvieron en DMSO a una concentración de 4 µg/ml. A todos los pozos se le adicionaron 90 µl de medio CMH estéril y 10 µl de los extractos activos (40 µg). Posteriormente, se inocularon con 100 µl de la suspensión de la bacteria patógena; la concentración final del extracto fúngico fue de 200 µg/ml y 0.5% de DMSO. Como control negativo se utilizó DMSO (5µl) y como control positivo amikacina (5 µg). Los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron por 18 horas a 37 °C para ambas bacterias.

Las fracciones hexánicas, acetonitrilo y los EM activos se evaluaron empleando 100, 50 y 25 µg/ml del extracto y de 2.5, 1.25, 0.62% de DMSO. Las lecturas se realizaron de manera visual mediante la escala numérica establecida por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2002) y se reportan como inhibición del crecimiento (IC).

A las 24 horas de incubación se adicionó a cada pozo 50 µl de 2,3,5-cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC) al 1%. La ausencia de color indicó inhibición del crecimiento; la lectura se realizó de manera visual.

La concentración más baja a la que no se encontró crecimiento microbiano se le consideró la concentración mínima inhibitoria bactericida (CMI).

A las 24 horas de incubación, una alícuota de cada pozo que no presentó crecimiento, es decir, sin coloración después de aplicar el TTC, se transfirió a cajas de TSA y se incubó a 37°C. A las 24 horas se verificó la presencia o ausencia de crecimiento (Taylor et al., 1983). En el caso de ausencia de crecimiento se le consideró efecto bactericida; si se observó crecimiento el efecto se clasificó como bacteriostático.

Resultados

Un total de 98 extractos fúngicos se evaluaron, 49 de acetato de etilo y 49 de metanol, entre los cuales el 69% mostraron efecto antimicrobiano (% IC $\geq$ 50) contra al menos uno de los patógenos evaluados (Cuadro 4.1). El hongo fitopatógeno más sensible correspondió a *A. chrysanthemi*, el cual detuvo su crecimiento ante 42 extractos. Entre estos, los que ocasionaron la mayor inhibición en un 75% correspondieron a los dos extractos de *Fusarium* sp. OH2-30, los EM de *Scopulariopsis* sp. KS-18, y las cepas no

identificadas KR-14 y OSE-43 (Cuadro 4.1). La cepa *M. fijiensis* se inhibió ante siete extractos, donde el más efectivo correspondió al EM de *Penicillium* sp. OSE-61 (IC = 75%). Para *C. gloeosporioides*, seis extractos demostraron su capacidad para afectarlo (IC = 50%). Entre las dos bacterias evaluadas, *E. carotovora* mostró más resistencia, ya que solo seis extractos inhibieron su crecimiento en un 75%. En contraste, 17 extractos inhibieron totalmente el crecimiento de *X. campestris* (IC = 100%), de los cuales cinco con efecto bacteriostático. En general, las cepas *Fusarium* sp. OH2-30, *Hypocrea* *lixii* OSN-37, *Penicillium* sp. OSE-61, *Penicillium* sp. KE-83 demuestran la capacidad para inhibir a tres o más fitopatógenos. En particular, los dos extractos de *Rhizotocnia solani* OSE-73 inhibieron (IC = 50%) contra *A. chrysanthemi* y *C. gloeosporioides*. Los EAE de *Fomitopsis meliae* KSE-64 y *Penicillium* sp. KE-83 exhibieron los más altos efectos inhibitorios contra las dos bacterias evaluadas. (Cuadro 4.1).

Con estos resultados se seleccionaron los EAE más promisorios y se sometieron a una partición con disolventes de polaridad ascendente, obteniéndose tres fracciones, a las cuales se les determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés). Contrario a lo esperado, solo la fracción B de *Penicillium* sp. OSE-61 inhibió a *A. chrysanthemi* con una MIC de 500 µg/ml. Por otra parte, las fracciones B de *H. lixii* OSE 37 y de *Fusarium* OH2-30 mostraron efectividad en el crecimiento de *C. gloeosporioides* (MIC = 1,000 µg/ml para ambas). La fracción B de *H. lixii* OSE-37 fue la única capaz de inhibir a *M. fijiensis* (MIC = 1,000 µg/ml). Todos los extractos antes mencionados tuvieron efecto fungistático sobre las cepas blanco. La bacteria *E. carotovora* se inhibió totalmente ante los EM *F. solani* OE-80 e *H. lixii* OSN-37 (MIC = 100 y 50 µg/ml, respectivamente); y para *X. campestris* las fracciones A y B de *F. solani* OE-80 (MIC ≤ 25 µg/ml), *Fusarium* sp. KS-15 (A, MIC ≤ 25 µg/ml) e *H. lixii* OSN-37 (B y C ≤ 50 µg/ml). El efecto bactericida contra *X. campestris* se observó con seis muestras, siendo el más efectivo la fracción A de *Fusarium* sp. KS-15 (Tablas 4.2).

Discusión

Más del 50% de los extractos orgánicos evaluados mostraron actividad antimicrobiana contra al menos uno de los fitopatógenos estudiados. El efecto inhibitorio de los extractos fúngicos se detectó con mayor frecuencia contra los hongos patógenos (47%)

que contra las bacterias (Tabla 4.1). Las únicas cepas con efectos antimicrobianos de amplio espectro detectadas en este estudio correspondieron a las cepas de *H. lixii* OSE 37 y *Penicillium* sp. OSE-61.

El género *Hypocrea*, estado sexual (telomorfo) de *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011) son comúnmente aislados como hongos saprófitos en tierra y crecen frecuentemente en madera, aunque se encuentran en innumerables sustratos, demostrando su alto potencial oportunista y adaptabilidad a diferentes condiciones ecológicas (Klein y Eveleigh, 1998; Jaklitsch, 2011). El género *Trichoderma* es prolífico en metabolitos secundarios, con más de 100 compuestos reportados (Reino et al., 2008; Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998), que incluyen moléculas de bajo peso molecular como pironas, terpenoides, esteroides y policétidos y péptidos no ribosomales como la epipolítiodioxopiperazinas y sideróforos (Mukherjee et al., 2012). Adicionalmente, son prolíficos productores de un sub producto de peptaibióticos, conocidos como peptaiboles (pequeños péptidos de origen no ribosomal con presencia de aminoácidos no comunes), con más de 700 secuencias de peptaiboles conocidas de *Trichoderma/Hypocrea*, algunos de estos son ecológicamente y comercialmente importantes debido a su actividad antimicrobiana y propiedades anti-cancerígenas (Degenkolb et al., 2008). Del género *Hypocrea* se ha obtenido actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *F. oxysporum* (Gogoi et al., 2008) y de los extractos de acetato de etilo se han obtenido compuestos con actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* IMI 242684 (Jantarach y Thanaboripat, 2010).

La actividad reportada de estas especies debido a sus metabolitos secundarios está fuertemente relacionada a las condiciones de cultivo; estas mismas especies no pueden llegar a presentar las mismas características de actividad, ya que la biosíntesis de metabolitos secundarios está directamente influenciada por las condiciones de cultivo (Demain, 1999; Feng y Leonard, 1998).

En estudios previos, la cepa de *H. lixii* OSE 37 se determinó el efecto antagonista, como otra alternativa para el control de los fitopatógenos, contra *C. gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. y *Fusarium* spp. No obstante las ventajas que ofrece el control biológico, en ocasiones su más seria desventaja es que generalmente no equivale al control químico (Guetsky et al., 2001). Para superar esta problemática se

utiliza una combinación de agentes químicos (en bajas dosis) y control biológico (Alamri et al., 2012); el uso combinado del control biológico y de los fungicidas es atractivo debido a la posibilidad de un efecto sinérgico o aditivo contra los microorganismos, aunque en ocasiones pudiera ser antagónicos.

También destacan la actividad de varias cepas del género *Fusarium* con buen efecto contra bacterias y hongos (Cuadro 4.2). El género *Fusarium* se encuentra en la naturaleza como endófito, saprobio y parásito. Análisis filogenéticos revelan que ancestros saprófitos coexisten con especies patógenas (Barik et al., 2010; Teetorbarsch and Roberts, 1983). Es un género taxonómicamente complejo y su identificación precisa requiere de una adecuada diferenciación morfológica y análisis filogenéticos (Summerell et al., 2010). En especial *F. solani* puede colonizar una gran variedad de nichos, incluso ambientes extremos (Scully et al., 2012). De *F. solani* se han reportado compuestos como podofilotoxina, compuesto utilizado en la preparación de drogas semi-sintéticas antitumorales (Nadeem et al., 2012), el compuesto 1-tetradeceno, 8-octadecanona, 8-pentadecanona, octilciclohexano y 10-nonadecanona, con actividad antifúngica y antimicrobiana contra patógenos clínicos (Tayung et al., 2011); también la producción de metabolitos anticancerígenos como el paclitaxel (Chakravarthi et al., 2008, Li et al., 2005).

Los resultados de este trabajo son una evidencia del potencial biotecnológico de los extractos de hongos que crecen en los cenotes de Yucatán, asimismo marcan la pauta para seguir explorando en dicho nicho y aislando una mayor cantidad de microorganismos con la finalidad de seguir probando su actividad contra microorganismos patógenos y así en un futuro contribuir a la solución de problemas tangibles en el sector agrícola. Paralelamente la efectividad probada de los extractos permitirá continuar con la investigación hasta la obtención de perfiles químicos y la identificación estructural de los principios activos.

Agradecimientos

Sergio Pérez y Narcedalia Gamboa por el soporte técnico. A Jairo Cristóbal Alejo por proporcionar algunos hongos fitopatógenos. Al Conacyt (Proyecto No. 2009/131256) por el financiamiento y la beca doctoral otorgada a P.M.P. (CVU No. 209062).

Literatura citada

- Ajith, P.S. and N. lakshmidēvi. 2010. Effect of Volatile and Non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of Anthracnose on Bell peppers. *Nature and Science*, 8: 264-269.
- Alamri, S., M. Mohamed. and Y.S. Mostaf. 2012. In vitro and In vivo Biocontrol of Soil-Borne Phytopathogenic Fungi by Certain Bioagents and Their Possible Mode of Action. *Biocontrol Science*, 17: 155-167.
- Aly, A.H., A. Debbab., and P. Proksch. 2011. Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Diversity An International Journal of Mycology*. 10.1007/s13225-011-0116-y
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentration. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 48: 5-16.
- Barik. B.P., K. Tayung., P.N. Jagadev. and S.K. Dutta. 2010. Phylogenetic Placement of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Acorus calamus* Rhizomes with Antimicrobial Activity. *European Journal of Biological Sciences* 2: 8-16.
- Bosshard, P.P., S. Abels., M. Altwegg., E.C. Böttger. And R. Zbinden. 2004. Comparison of conventional and molecular methods for identification of Aerobic catalase-negative Gram-positive Cocci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 2065-2073.
- Chakravarthi, B.V.S.K., P. Das., K. Surendranath., A.A. Karande. and C. Jayabaskaran. 2008. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *Journal of Bioscience* 32: 1-9.
- Cantrell, C.L., F.E. Dayan and S.O. Duke. 2012. Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products*. 75: 231-1242.
- Chanchaichaovivat, A., B. Panijpan and P. Ruenwongsa. 2010. Yeast biocontrol of a fungal plant disease: a model for studying organism interrelationships. *Journal of Biological Education*, 43:1, 36-40.
- Dayan, F.E., C.L. Cantrell and S.O. Duke. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*. 17: 4022-4034.
-

-
- Degenkolb, T., H. von Dohren., K.F. Nielsen., G.J. Samuels., and H. Bruckner. 2008. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem Biodivers*. 5: 671-680.
- Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol*. 52, pp. 455-463.
- Demain, A. L. y S. Sanchez. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*. 62: 5-16.
- Druzhinina, I.S., V. Seidl-Seiboth., A. Herrera-Estrella., B.A. Horwitz., C.M. Kenerley., E. Monte., P.K. Mukherjee., S. Zeilinger., I.V. Grigoriev. and C.P. Kubicek. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 749-759.
- Feng, G.H. and T.J. Leonard. 1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2275-2277.
- Gamboa-Angulo, M., S.C. De la Rosa-García., G. Heredia-Abarca and I.L. Medina-Baizabal. 2012. Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatán peninsula, México. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 2305-2312.
- Gogoi, D.K., S. Mazumder., R. Saikia. and T.C. Bora. 2008. Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 79-87.
- Guetsky, R., D. Shtienberg., D. Elad. And A. Dinoor. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 91: 621-627.
- Jaklitsch, W. M. 2011. European species of *Hypocrea* Part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Diversity* 48: 1-247.
- Jantarach, J. and D. Thanaboripat. 2010. The Efficacy of Ethyl Acetate Extract of *Trichoderma* Culture Broth on Growth Inhibition and Aflatoxin Production by
-

-
- Aspergillus flavus* IMI 242684. KMITL. Journal of Science and Technology, 10: 19-29.
- Li Y., Y.C. Song., J.Y. Liu., Y.M. Ma. and R.X. Tan., 2005. Anti-Helicobacter pylori substances from endophytic cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21: 553-558.
- Klein, D. and D.E. Eveleigh. 1998. In: *Trichoderma and Gliocladium* Vol.1 (eds Kubicek, C. P. & Harman, G. E.), 57–69 (Taylor and Francis, London, 1998).
- Macías-Rubalcava, M.L., B.E. Hernández-Bautista., M. Jiménez-Estrada., M.C. González., A.E. Glenn., R.T. Hanlin., S. Hernández-Ortega., A. Saucedo-García., J.M. Muria-González., A.L. Anaya. 2008. Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. Phytochemistry. 69: 1185-1196.
- Macías-Rubalcava, M.L., B.E. Hernández-Bautista., F. Oropeza., G. Duarte., M.C. González., A.E. Glenn., R.T. Hanlin and A.L. Anaya. 2010. Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. Journal of Chemical Ecology. 36: 1122-1131.
- Mukherjee, P.K., B.A. Horwitz. and C.M. Kenerley. 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. Microbiology, 158: 35-45.
- Nadeem, M., M. Ram., P. Alam., M.M. Ahmad., A. Mohammad., F. Al-Qurainy., S. Khan. and M.Z. Abdin. 2012. *Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophyllotoxin-producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*. African Journal of Microbiology Research, 6 : 2493-2499.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Newman, D. J. and G.M. Cragg. 2012. Journal of Natural Products, 75: 311-335.
-

-
- Reino, J.L., R.F. Guerrero., R. Hernández-Galán. and I.G. Collado 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7: 89-123.
- Reyes-Estebanez, M., E. Herrera-Parra., J. Cristóbal-Alejo., G. Heredia-Abarca., B. Canto-Canché., I. Medina-Baizabal., and M. Gamboa-Angulo (2011) Antimicrobial and nematocidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in México. *African Journal of Microbiology Research*, 5: 1083-1089.
- Scully, E.D., K. Hoover., J. Carlson., M. Tien., S.M. Geib. 2012. Proteomic Analysis of *Fusarium solani* Isolated from the Asian Longhorned Beetle, *Anoplophora glabripennis*. *Plos One*, 7, 4, e32990.
- Soman, A.G., J.B. Gloer., R.F. Angawi., D.T. Wicklow. and P.F. Dowd. 2001. Vertilecanin: New phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, 64: 189-192.
- Strobel, G.A., Y. Ren. and D.B. Teplow. 2011. Endophytic fungi from *Pteromischum* sp. plant, compounds and methods of use. United States Patent Application Publication. US 20130177596A1. Jul. 11, 2013.
- Sivasithamparam, K. and E. Ghisalberti. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma and Gliocladium Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, pp. 139–191. Edited by C. Kubicek & G. E. Harman. London: Taylor & Francis.
- Summerell, B.A., M.H. Laurence., E.C.Y. Liew. and J.F. Leslie. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review, *Fungal Diversity*, 44: 3-13.
- Tayung, K., B.P. Barik., D.K. Jha., and D.C. Deka. 2011. Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere*, 2: 203-213.
- Teetorbarsch, G.H. and D.W. Roberts. 1983. Entomogenous *Fusarium* species. *Mycopathologia*, 84: 3-16.
-

Cuadro 4.1. Porcentaje de inhibición del crecimiento de hongos (2,000 µg/ml) y bacterias (200 µg/ml) fitopatógenas causado por los extractos orgánicos de AcOEt y MeOH de hongos saprofitos aislados de cenotes de la Península de Yucatán.

Inhibición de la germinación micelial y crecimiento bacteriano (%)						
Genero/especie	Disolvente	<i>A. chrysanthemi</i> (2,000 µg/ml)	<i>C. gloeosporioides</i> (2,000 µg/ml)	<i>M. fijiensis</i> (2,000 µg/ml)	<i>E. carotovora</i> (200 µg/ml)	<i>X. campestris</i> (200 µg/ml)
<i>Aspergillus</i> sp. OH-03	AcOEt	0	0	0	0	75
	MeOH	0	0	0	0	0
<i>Bionectria ochroleuca</i> OE-81	AcOEt	0	0	0	0	100**
	MeOH	0	0	0	0	75
<i>Cladosporium</i> sp. KH-09	AcOEt	50	0	50	0	0
	MeOH	50	0	50	0	0
<i>Clonostachys</i> sp. OE-79	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
<i>Fomitopsis meliae</i> KSE-64	AcOEt	0	0	0	75	100**
	MeOH	0	0	0	75	0
<i>Fusarium solani</i> OSN-54	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
<i>Fusarium solani</i> OE-80	AcOEt	0	0	0	0	100**
	MeOH	0	0	0	0	100***
<i>Fusarium solani</i> KE-82	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp. OH-04	AcOEt	0	0	0	0	75
	MeOH	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp. KS-15	AcOEt	0	0	0	0	100**
	MeOH	0	0	0	75	0
<i>Fusarium</i> sp. OH2-28	AcOEt	50	0	0	0	0

	MeOH	50	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp. OH2-30	AcOEt	75	50	0	0	100**
	MeOH	75	0	0	0	100**
<i>Fusarium</i> sp. OSN-32	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp. KSN-65	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
<i>Hypocrea lixi</i> OSN-37	AcOEt	0	50	50	0	100**
	MeOH	0	25	25	0	100***
<i>Monodictys</i> sp. OSE-75	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp. OSE-61	AcOEt	50	50	0	0	0
	MeOH	50	50	75	0	100**
<i>Penicillium</i> sp. KE-83	AcOEt	0	0	50	75	100**
	MeOH	0	0	50	0	100**
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> OH-02	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
<i>Pseudorobillarda sojae</i> OSN-36	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	100***
<i>Rhizoctonia solani</i> OSE-73	AcOEt	50	50	0	0	0
	MeOH	50	50	0	0	0
<i>Scopulariopsis</i> sp. KS-18	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	75	0	0	0	0
No identificada OR-05	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada OS-07	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada KH-08	AcOEt	0	0	0	0	75

Capítulo IV

	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada KH-10	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada KH-11	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
No identificada KH-13	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada KR-14	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	75	0	0	0	0
No identificada KS-17	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada KS-19	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
No identificada OH2-22	AcOEt	0	0	0	75	0
	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada OH2-23	AcOEt	0	0	0	0	75
	MeOH	0	0	0	0	75
No identificada OH2-27	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	50
No identificada OSN-33	AcOEt	0	0	0	0	75
	MeOH	0	0	0	0	75
No identificada OSN-35	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada OSN-38	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	100***
No identificada OSE-41	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	0	0
No identificada OSE-43	AcOEt	50	0	0	0	0

	MeOH	75	0	0	0	0
No identificada KSE-45	AcOEt	0	0	0	0	75
	MeOH	0	0	0	0	75
No identificada KSE-47	AcOEt	0	0	0	0	75
	MeOH	0	0	0	0	75
No identificada OSE-52	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
No identificada OSE-53	AcOEt	50	0	0	0	100***
	MeOH	50	0	0	0	0
No identificada OSN-55	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
No identificada KSE-59	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
No identificada KSE-62	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
No identificada OSE-76	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	0
No identificada OSN-78	AcOEt	0	0	0	0	100**
	MeOH	0	0	0	0	100**
No identificada KE-85	AcOEt	0	0	0	0	0
	MeOH	0	0	0	75	0

Cuadro 4.2 Concentración mínima inhibitoria contra hongos y bacterias fitopatógenos de los extractos fúngicos, obtenidos de hongos saprofitos aislados de cenotes de la Península de Yucatán.

Genero/especie	Disolvente	Fracción	Concentración mínima inhibitoria (MIC) µg/ml					
			<i>Alternaria chrysanthemi</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Mycospaherella fijiensis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	
<i>Bionectria ochroleuca</i> OE-81	AcOEt	A	—	—	> 200	—	100	**
		B	—	—	> 200	—	50	**
		C	—	—	> 200	—	> 100	
<i>Fomitopsis meliae</i> KSE-64*	MeOH		—	—	100	**	200	**
	AcOEt	A	—	—	> 100	—	100	**
		B	—	—	> 100	—	> 100	
C		—	—	> 100	—	> 100		
<i>Fusarium solani</i> OE-80*		A	—	—	—	—	≤ 25	**
		B	—	—	—	—	≤ 25	**
		C	—	—	—	—	> 100	
<i>Fusarium</i> sp. KS-15	MeOH		—	—	100	**	200	***
	AcOEt	A	—	—	> 100	—	≤ 25	***
		B	—	—	> 100	—	50	**
C		—	—	> 100	—	> 100		
<i>Fusarium</i> sp. OH2-30	MeOH		—	—	> 100	—	200	**
	AcOEt	A	—	2,000 **	—	—	> 100	**
		B	—	1000 **	—	—	100	**
C		—	> 2,000	—	—	> 100		
<i>Hypocrea lixi</i> OSN-37A	MeOH		—	—	—	—	200	**
	AcOEt	A	—	2,000 **	—	> 1,000	≤ 25	**
		B	—	1000 **	—	1,000 **	50	**
C		—	2,000 **	—	> 1,000 **	50	**	

<i>Penicillium</i> sp. OSE-61*	MeOH		-	> 2,000	50	**	> 2,000	> 100	
	AcOEt	A	> 2,000	-	-		-	-	
		B	≤ 500	**	-		-	-	
		C	> 2,000	-	-		-	-	
<i>Penicillium</i> sp. KE-83	MeOH		-	-	> 200		-	200	**
	AcOEt	A	-	-	> 100		-	> 100	
		B	-	-	> 100		-	> 100	
		C	-	-	> 100		-	> 100	
<i>Pseudorobillarda sojae</i> OSN-36	MeOH		-	-	-		-	200	***
<i>Rhizoctonia solani</i> OSE-73*	AcOEt	A	> 2,000	2,000	**		-	-	
		B	> 2,000	> 2,000	-		-	-	
		C	> 2,000	> 2,000	-		-	-	
No Identificada OSN-38	MeOH		-	-	-		-	200	***
No Identificada OSE-53*	AcOEt	A	-	-	-		-	50	**
		B	-	-	-		-	50	***
		C	-	-	-		-	> 100	
No Identificada OSN-78	MeOH		-	-	-		-	200	***

Efecto fungistático/bacteriostático, *Efecto bactericida

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

- Se aislaron micromicetos, con potencial biotecnológico, de hojarasca sumergida en cenotes de la península de Yucatán, con lo cual comprobamos nuestra hipótesis.
- En el aislamiento, las técnicas permitieron aislar 49 cepas. La probabilidad de obtener un mayor número de aislados aumentaría con un mayor número de trampas colocadas en una mayor área de superficie, mayor periodo de tiempo e incluso en otros cenotes.
- Aunque todos los aislados se cultivaron en tres medios de cultivo diferentes, agar papa-dextrosa, agar maíz y agar extracto de malta, no fue posible la identificación mediante características morfológicas de 28 cepas, ya que no presentaron estructuras reproductivas. El análisis molecular fue una herramienta valiosa para obtener información de las cepas o de sus extractos que tuvieron actividad antagónica; se logró ubicar taxonómicamente cuatro aislados a nivel género y cuatro cepas a nivel especie. Aun con el análisis molecular, no fue posible identificar a dos aislados, debido a que no se encontraron homólogos en las bases de datos, por lo que existe la probabilidad de que sean especies nuevas con potencial para el control de fitopatógenos en la agricultura.
- La cepa *Hypocrea lixii* OSN-37 presentó el mayor potencial antagónico al inhibir el crecimiento de las cuatro cepas fitopatógenas en un rango del 61 al 77%; *Pestalotiopsis mangiferae* OH-02 y *Rhizoctonia solani* OSE-73 inhibieron el crecimiento en más del 50% de tres de los fitopatógenos evaluados. El hongo *Pestalotiopsis mangiferae* OH-02 es un potencial antagónico de fitopatógenos por el alto porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del 46 al 59%.

-
- Los extractos en AcOEt y MeOH de las especies fúngicas evaluadas mostraron actividad antimicrobiana; 72 extractos evaluados contra cinco fitopatógenos tuvieron actividad.
 - Los extractos fraccionados correspondientes a acetonitrilo y hexano también mostraron actividad antimicrobiana; todos presentaron actividad contra al menos un fitopatógeno evaluado.
 - Las cepas *F. solani* OE-80, *Hypocrea lixii* OSN-37 y *Fusarium* sp. KS-15 mostraron mayor actividad antibacteriana a menor concentración (≤ 25 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$). Es interesante la importante actividad antimicrobiana de *Hypocrea lixii* catalogado como uno de los más importantes géneros del control biológico y de *Fusarium* sp. catalogado como uno de los generos más importantes de fitopatógenos.
 - La actividad antimicrobiana se presentó en la mayoría de las tres fracciones de los extractos desengrasados, lo cual puede indicar la complejidad y diversidad de los metabolitos fúngicos. Estos resultados muestran que los ambientes acuáticos de la península de Yucatán y sus microorganismos representan un nicho potencial para la búsqueda de agentes antimicrobianos, que permita orientar la producción agrícola hacia un desarrollo sustentable. Con esta investigación se enriquece el cepario de hongos de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán.
-

5.2. PERSPECTIVAS

La búsqueda sistemática de organismos y compuestos naturales en estos ambientes permite la obtención de cepas y compuestos novedosos, apremiantes para el control biológico de enfermedades en las actividades agrícolas. Por supuesto, esto será posible con un adecuado planteamiento científico y metodológico, así como la propuesta de estrategias e innovaciones que permitan aumentar la capacidad para aislar mayor cantidad de microorganismos.

Para lograr la aplicación óptima del recurso fúngico, se requiere profundizar en estudios a nivel de invernadero y posteriormente en campo sobre la capacidad antagónica de la cepa *H. lixii* OSN-37, *P. mangiferae* OH-02 y *R. solani* OSE-73, en los cuales se analicen sus mecanismos de acción y colonización.

Aunque las herramientas moleculares son valiosas, la baja proporción de hongos identificados en este estudio se debió a la incapacidad de muchas cepas en producir estructuras reproductivas bajo las condiciones de laboratorio utilizadas y que las bases de datos aún no están suficientemente representadas, lo que no permitió la clasificación definitiva de las demás cepas. Los análisis filogenéticos serán fundamentales en la identificación y clasificación taxonómica de los nuevos aislados.

Así mismo, es necesario determinar el espectro de acción y las dianas de los extractos de las especies *H. lixii* OSN-37 y *F. solani* OE-80 y del género *Fusarium* sp. KS-15, así como realizar pruebas de citotoxicidad para complementar su evaluación como alternativa de origen natural para el control de patógenos en la agricultura.

