



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.  
Posgrado en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y  
EL TIEMPO DE CRECIMIENTO EN LA ACTIVIDAD  
FITOTÓXICA DE CULTIVOS DE *Alternaria dauci*

Tesis que presenta

LANDY YANIRA UC CEN

En opción al título de  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Septiembre 2016



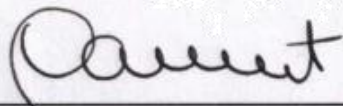
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Landy Yanira Uc Cen titulado **Evaluación del efecto del medio de cultivo y el tiempo de crecimiento en la actividad fitotóxica de cultivos de *Alternaria dauci*** fue realizado en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dr. Manuel Martínez Estévez  
Director de Docencia

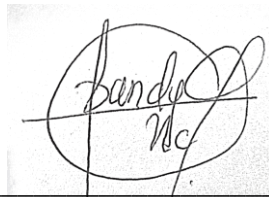
Mérida, Yucatán, México, a 31 de Agosto de 2016.



Mérida, Yucatán, México; a 1 de Septiembre de 2016

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los 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 A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Landy Uc', enclosed within a circular scribble.

Q.F.B. Landy Yanira Uc Cen.



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. y forma parte del proyecto titulado Evaluación del efecto del medio de cultivo y el tiempo de crecimiento en la actividad fitotóxica de cultivos de *Alternaria dauci* bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez.





## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca No. 551218 otorgada para la realización de este proyecto y el apoyo de Becas Mixtas para la estancia realizada en la Universidad de Angers, en Angers, Francia, 2014.

Al CICY y a la Unidad de Biotecnología por las instalaciones brindadas y permitirme realizar mis estudios de Maestría y por la beca de movilidad otorgada para la estancia en la Universidad de Angers, en Angers, Francia, 2014.

Durante la realización de este proyecto, participé en la 11<sup>a</sup>. Reunión Internacional de Investigación de Productos Naturales en Sonora, 2015 y en el Congreso Internacional de Fitopatología, en la Ciudad de México, 2015, en ambos Congresos presenté mis resultados con la presentación de la ponencia en modalidad cartel titulada "Evaluación del efecto del medio de cultivo y el tiempo de crecimiento en la actividad fitotóxica de cultivos de *Alternaria dauci*".

A mi asesor, el Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por la confianza brindada al permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su asesoría, enseñanzas, paciencia y apoyo durante mis estudios de Maestría y en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Pascal Richomme y al Ing. Dimitri Breard del Laboratorio de SONAS de la Universidad de Angers, en Angers, Francia, por compartirme su conocimiento y su colaboración en el trabajo experimental que hicieron posible este proyecto y a todos los integrantes del laboratorio SONAS, sobre todo por su amistad brindada que hicieron agradable y amena la estancia realizada.

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y la M. en C. Rosa María Galaz Avalos de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY por el apoyo brindado, pues sin su colaboración no hubiese sido posible concluir este proyecto.

Al Dr. Ignacio Islas Flores, al Dr. Gregorio Godoy Hernández, al Dr. Jairo Cristóbal Alejo y Al Dr. Pascal Richomme; por formar parte del comité tutorial y/o fungir como revisores de tesis, proporcionándome sus excelentes observaciones y comentarios oportunos que enriquecieron y contribuyeron en la realización de este trabajo.

A las técnicas Q.B.B. Karlina García Sosa y Q.B.B. Fabiola Escalante Erosa por su apoyo profesional y experiencia en el laboratorio para la realización de esta tesis.

A mis amigos del Laboratorio de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología y del Laboratorio # 24 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del CICY por brindarme su amistad incondicional durante todo este tiempo y permitirme conocerlos, por sus consejos, apoyo y críticas constructivas.

## DEDICATORIAS

Doy gracias a esa fuerza poderosa y espiritual que me ha guiado por el mejor de los caminos, por sus grandes bendiciones y por permitirme observar una minúscula parte de su inmensa creación.

### **A mis padres:**

Especialmente a ellos con todo mi corazón, mis padres Martín y Camelia: por ser los pilares que sostienen mi vida, son mi ejemplo de lucha, constancia y dedicación, por sus sabios consejos, el apoyo incondicional y su amor que me permitieron transitar por este camino con optimismo, confianza y valores.

### **A mis hermanos:**

A Mirta y Ernesto, por ser más que mis hermanos, mis amigos y cómplices. A ambos, por su alegría y porque el amor, respeto y admiración que les tengo me ha alentado a exigir siempre lo mejor de mí y superarme en la vida.

A toda mi **familia** y **amigos verdaderos**, todos tienen mi aprecio y amor por igual, por confiar mucho en mí e impulsarme y alentarme en cada momento.



---

---

**ÍNDICE**

	<b>Página</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>9</b>
1.1. Antecedentes generales	9
1.2. Hipótesis	17
1.3. Objetivos	17
1.3.1 Objetivo general	17
1.3.2 Objetivos particulares	17
1.4. Estrategia experimental	18
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>19</b>
<b>EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE <i>ALTERNARIA DAUCI</i></b>	<b>19</b>
2.1. Introducción	19
2.2. Materiales y métodos	21
2.2.1. Obtención de la cepa y preparación de cultivos “Padre”	21
2.2.2. Material vegetal	21
2.2.3. Preparación de cultivos “semilla”	21
2.2.4. Cultivo de <i>A. dauci</i> en diferentes medios y bajo diferentes condiciones de cultivo	22
2.3. Resultados	23
2.4. Discusión	27

---

2.5. Conclusiones	31
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>33</b>
<b>EFFECTO DEL MEDIO Y LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LA ACTIVIDAD FITOTÓXICA DE LOS CULTIVOS DE <i>ALTERNARIA DAUCI</i></b>	<b>33</b>
3.1. Introducción	33
3.2. Materiales y métodos	34
3.2.1. Fracciones fitotóxicas	34
3.2.2. Material vegetal	34
3.2.3. Material biológico	34
3.2.4. Preparación de los cultivos celulares	34
3.3. Establecimiento y caracterización de los cultivos celulares de <i>Daucus carota</i>	34
3.3.1. Inducción de cultivos celulares	34
3.3.2. Caracterización de cultivos celulares	35
3.3.3. Determinación del crecimiento celular	36
3.3.4. Determinación de cambios en el pH y la conductividad del medio de cultivo	37
3.4. Bioensayos	37
3.4.1. Bioensayo de gota.	37
3.4.2. Bioensayo de fuga de electrolitos.	37
3.4.3. Bioensayo de viabilidad celular.	38
3.5. Resultados	39
3.5.1. Evaluación de la actividad fitotóxica en hoja (bioensayo de gota)	39
3.5.2. Evaluación del daño a la membrana celular (Bioensayo de fuga de electrolitos)	41
3.5.3. Bioensayo de viabilidad (Cultivos de células de tallo de zanahoria en suspensión)	44
3.5.4. Caracterización química preliminar de los metabolitos fitotóxicos de <i>A. Dauci</i> utilizando el bioensayo de viabilidad celular	47

---

---

3.6 Discusión	50
3.7. Conclusiones	52
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>55</b>
<b>IDENTIFICACIÓN Y NATURALEZA QUÍMICA DE LOS METABOLITOS FITOTÓXICOS PRODUCIDOS POR <i>ALTERNARIA DAUCI</i></b>	<b>55</b>
4.1. Introducción	55
4.2. Materiales y métodos	57
4.2.1. CLAR-UV	57
4.2.2. LC-ESI-MS	57
4.3. Resultados	59
4.3.1. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	59
4.3.2. Análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-ESI-MS)	62
4.4. Discusión	65
4.5. Conclusión	66
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>67</b>
5.1. Conclusiones generales	67
5.2. Perspectivas	69
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>71</b>





## ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etilo.

ca.: Alrededor o cerca.

CCD: Cromatografía en capa delgada.

CD: Medio Czapek-Dox preparado con agua destilada.

CDI: Medio Czapek-Dox preparado con infusión de perejil.

CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución.

e.g.: Por ejemplo.

EO: Extracto orgánico.

FA: Fase acuosa.

Fig.: Figura.

h: Horas.

HPLC: High performance liquid chromatography.

HTS: Fitotoxina Hospedero selectiva.

LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

m/z: Relación masa/carga.

min: Minuto.

mL: Mililitro.

mm Hg: Milimetro de Mercurio.

MS: Espectrometría de masas.

no-HTS: Fitotoxina No hospedero selectiva.

rpm: Revolución por minuto.

SD: Desviación estándar.

t<sub>R</sub>: Tiempo de retención.

V8: Medio jugo V8 preparado con agua destilada.

V8I: Medio jugo V8 preparado con infusión de perejil.

X: Número de veces.

ZN: Medio jugo de zanahoria preparado con agua destilada.

ZNI: Medio jugo de zanahoria preparado con infusión de perejil.

μl: Microlitros.



---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.1.</b> Estrategia experimental.....	18
<b>Figura 2. 1.</b> Diagrama general de la separación y extracción de cultivos de <i>A. dauci</i> .....	22
<b>Figura 2. 2.</b> Producción de biomasa (crecimiento micelial) liofilizada de <i>A. dauci</i> en diferentes medios de cultivo a diferentes tiempos). Las barras con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ ).....	24
<b>Figura 2. 3.</b> Rendimiento de los extractos orgánicos crudos (mg/ml) de <i>A. dauci</i> en diferentes medios de cultivo. Las barras con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ ).....	26
<b>Figura 2. 4.</b> Producción de biomasa (crecimiento micelial) liofilizada de <i>A. dauci</i> en diferentes medios de cultivo a diferentes tiempos a) sin infusión de perejil, b) con infusión de perejil). Las barras con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ ).....	28
<b>Figura 2. 5.</b> Rendimiento de los extractos orgánicos crudos (mg/ml) de <i>A. dauci</i> en diferentes medios de cultivo a) sin infusión de perejil, b) con infusión de perejil). Las barras con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ ).....	30
<b>Figura 3. 1.</b> Clasificación de la actividad fitotóxica observada en hojas de perejil tratadas con filtrados de <i>Alternaria dauci</i> en el bioensayo de gota. Máxima fitotoxicidad (++++), altamente fitotóxico (+++), fitotóxico moderadamente (++) , fitotóxico débilmente (+), no fitotóxico (-).....	39
<b>Figura 3. 2.</b> Daño de la membrana celular provocado por filtrados de <i>A. dauci</i> en medio a) V8, Zanahoria y Czapek-Dox sin infusión de perejil a las 48 h. b) 72 y c) 96 h. Cada experimento fue realizado por triplicado, $\pm$ SD. Las líneas de conectividad con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ ).....	42
<b>Figura 3. 3.</b> Daño de la membrana celular provocado por filtrados de <i>A. dauci</i> en medio a) V8, Zanahoria y Czapek-dox con infusión de perejil a las 48 h. b) 72 y c) 96 h. Cada experimento fue realizado por triplicado, $\pm$ SD. Las líneas de conectividad con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ ).....	43
<b>Figura 3. 4.</b> Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los filtrados liofilizados de <i>A. dauci</i> en medio jugo	

---

V8 a) sin y b) con infusión de perejil. Promedio de 3 experimentos independientes, $\pm$ SD, ( $P \leq 0.05$ ).....	44
<b>Figura 3. 5</b> Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los filtrados liofilizados de <i>A. dauci</i> en medio jugo de zanahoria a) sin y b) con infusión de perejil. Promedio de 3 experimentos independientes, $\pm$ SD, ( $P \leq 0.05$ ). .....	45
<b>Figura 3. 6</b> Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los filtrados liofilizados de <i>A. dauci</i> en medio Czapek-Dox a) sin y b) con infusión de perejil. Promedio de 3 experimentos independientes, $\pm$ SD, ( $P \leq 0.05$ ). .....	46
<b>Figura 3. 7.</b> Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los a) extractos orgánicos crudos y b) Fases acuosas de <i>A. dauci</i> en medio CD preparados con agua destilada. ( $3x$ , $\pm$ SD, $P \leq 0.05$ ).47	47
<b>Figura 3. 8</b> Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con a) extractos orgánicos crudos y b) Fases acuosas de <i>A. dauci</i> en medio CD con infusión de perejil. (Promedio de 3 experimentos independientes, $\pm$ SD, ( $P \leq 0.05$ ). .....	48
<b>Figura 3. 9</b> Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los a) extractos orgánicos crudos de <i>A. dauci</i> y b) Fases acuosas en medio jugo V8 preparados con agua destilada. (Promedio de 3 experimentos independientes, $\pm$ SD, ( $P \leq 0.05$ ). .....	48
<b>Figura 3. 10</b> Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los a) extractos orgánicos crudos y las b) fracciones acuosas de <i>A. dauci</i> en medio jugo V8 con infusión de perejil. (Promedio de 3 experimentos independientes, $\pm$ SD, ( $P \leq 0.05$ ). .....	49
<b>Figura 4. 1.</b> Equipo HPLC Waters 2695 <sup>®</sup> acoplado a un detector de fotodiodos en serie (PDA) Waters 2995 <sup>®</sup>	58
<b>Figura 4. 2.</b> Perfil cromatográfico por HPLC de extractos orgánicos de <i>A. dauci</i> crecido en medio jugo V8I a las 72 y 96 h con sus respectivos controles.	59
<b>Figura 4. 3</b> Perfil cromatográfico por HPLC de extractos orgánicos de <i>A. dauci</i> crecido en medio jugo de ZNI a las 72 y 96 h con sus respectivos controles.	60

---

- Figura 4. 4** Perfil cromatográfico por HPLC de extractos orgánicos de *A. dauci* crecido en medio en medio CDI a las 48, 72 y 96 h con sus respectivos controles. 60
- Figura 4. 5** Perfil cromatográfico por HPLC de extractos orgánicos de *A. dauci* crecido en medio en medio jugo de ZN a las 48, 72 y 96 h con sus respectivos controles. 61
- Figura 4. 6** Perfiles cromatográficos por HPLC (LC2695 Waters®) acoplado a un espectrómetro de masas (Bruker®). a) Perfil cromatográfico del extracto orgánico del medio jugo de zanahoria con infusión de perejil. Se indica el tiempo de retención correspondiente a un componente en común de los diferentes extractos b) perfil cromatográfico del extracto orgánico de *A. dauci* en medio jugo de ZNI-72 c) perfil cromatográfico del extracto orgánico de *A. dauci* en medio ZN-96I 63
- Figura 4. 7** El espectro de masas del componente a  $t_R$  13.7 min del extracto orgánico ZN-72I muestra un ion molecular protonado  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  245 uma, correspondiente a un peso molecular neutro de 223 uma. Detección de electrospray positivo MS (ESI-MS) 64



## ÍNDICE DE CUADROS

**Tabla 1. 1.** Fitotoxinas hospedero selectivas (HST's).....12

**Tabla 3. 1.** Actividad fitotóxica de los filtrados obtenidos de diferentes cultivos de *A. dauci* en hojas de perejil.....41





## RESUMEN

Los cultivos vegetales son susceptibles al ataque de fitopatógenos que incluyen virus, bacterias y hongos; éstos causan enfermedades que resultan en grandes pérdidas económicas y aumentan los costos de producción. Con frecuencia, los síntomas son causados por metabolitos secundarios conocidos como fitotoxinas.

*Alternaria dauci* es un hongo conocido como el agente causal del “tizón foliar” en cultivos de zanahoria (*Daucus carota*) y otras especies de la familia Apiaceae como el perejil y el apio. El género *Alternaria* spp. sintetiza una amplia gama de fitotoxinas con estructuras químicas de variada complejidad. Hasta ahora, y a pesar de la importancia de la enfermedad causada por *A. dauci*, se conoce poco sobre los mecanismos de infección del fitopatógeno y sobre el papel de sus fitotoxinas en el proceso de patogénesis.

Con el fin de optimizar la producción de metabolitos fitotóxicos en cultivos de *A. dauci*, en el presente trabajo se evaluó el crecimiento del fitopatógeno en tres medios de cultivo; dos de composición indefinida (jugo V8 y jugo de zanahoria), y uno de composición definida (Czapek-Dox), preparados con agua o con una infusión de hojas de perejil, a tres tiempos diferentes de cultivo (48, 72 y 96 h), bajo condiciones de agitación (100 rpm) y luz continua. Cada uno de los cultivos fue comparado con base a su producción de biomasa, su rendimiento de extracto orgánico y la actividad fitotóxica de sus filtrados correspondientes en tres diferentes bioensayos: de gota, de fuga de electrolitos y de viabilidad celular.

El mayor rendimiento de extracto orgánico obtenido a partir de filtrados de cultivo en medios preparados con agua destilada, correlaciona con la expresión de una mayor actividad fitotóxica, i.e. el medio CD, en el que se encontró la mayor actividad fitotóxica en el bioensayo de viabilidad celular, resultó ser uno de los medios con mayor rendimiento de extracto orgánico crudo.

Los resultados presentados en este trabajo constituyen el primer reporte de la optimización de las condiciones de cultivo de *A. dauci* y establecen las bases de futuros

trabajos de investigación dirigidos al aislamiento e identificación de fitotoxinas producidas por *A. dauci* y al estudio de su papel en los eventos de patogénesis del fitopatógeno.

## ABSTRACT

Vegetable crops are susceptible to the attack of phytopathogens which include viruses, bacteria and fungi; these cause diseases that result in significant economic losses and increase production costs. Often, the symptoms are caused by secondary metabolites known as phytotoxins.

*Alternaria dauci* is a fungus recognized as the causative agent of “leaf blight” in carrots (*Daucus carota*) and other species of the Apiaceae family such as parsley and celery. The genus *Alternaria* spp. synthesizes a broad range of phytotoxins with chemical structures of varying complexity. To date, and despite the importance of the disease caused by *A. dauci*, little is known about the infection mechanisms of the pathogen and the role of its phytotoxins in the pathogenic process.

In order to optimize the production of phytotoxic metabolites in cultures of *A. dauci*, in this study the growth of the phytopathogen was evaluated in three culture media, two of undefined composition (V8 juice and carrot juice) and one having a defined composition (Czapek-Dox), the three of them prepared with water or a parsley leaf infusion, in three different cultivation times (48, 72 and 96 h), under shake (100 rpm) conditions and continuous light. Each of the cultures was compared on the basis of their biomass production, its yield of organic extract and the phytotoxic activity of their corresponding filtrates in three different bioassays: leaf drop, electrolyte leakage and cell viability.

The highest yield of organic extract obtained from culture filtrates in media prepared with distilled water, correlates with increased expression of phytotoxic activity, i.e. CD medium, in which most phytotoxic activity was found in the bioassay cell viability assay, showed the highest yield of organic crude extract.

The results presented in this study constitute the first report on the optimization of the culturing conditions of *A. dauci*, and establish the basis for future research towards the isolation and identification of phytotoxins produced by *A. dauci* and the study of their role in the events of pathogenesis of the phytopathogen.



## INTRODUCCIÓN

Las interacciones entre plantas y microorganismos son complejas. Sin embargo, los primeros estudios sobre los procesos involucrados comprenden dos preguntas: la primera, ¿Cuál es la naturaleza fisiológica y bioquímica de la interacción? y la segunda, ¿cómo son determinadas las interacciones genéticamente? El último enfoque es particularmente trascendental para el caso de los cultivos resistentes al ataque de fitopatógenos, dada la importancia de la interacción planta-patógeno, i.e. la colonización en la planta por el patógeno, o el fracaso del patógeno cuando es rechazado por las defensas de la planta (Prell y Day, 2000).

Por otra parte, el estudio de las interacciones planta-patógeno son fundamentales para mejorar la producción agrícola al proveer herramientas novedosas para el control de enfermedades en cultivos de importancia comercial (Jackson y Taylor, 1996). Cuando el ataque es producido por hongos fitopatógenos, los daños ocasionados varían desde leves, hasta la destrucción y muerte de tejidos invadidos o del individuo en su totalidad (Agris, 2005; Herrera y Ulloa, 1998).

Los hongos constituyen un grupo altamente diverso de organismos eucariontes carbono-heterotróficos, que han ocupado exitosamente una amplia diversidad de hábitats naturales. Por otra parte, la Sociedad Americana de Microbiología estima la existencia de al menos 1.5 millones de especies de hongos y que menos del 5% de éstas son conocidas (Manzi y Mayz, 2003; Hawksworth, 2001). De estas últimas, se considera que más de 8000 producen enfermedades en las plantas (García, 2005).

En la historia, los hongos fitopatógenos han sido causantes de enfermedades e incluso de hambrunas (Wolpert *et al.*, 2002). Estos microorganismos constituyen un grupo importante en la agricultura debido a su gran número, a su enorme capacidad de reproducción, y a la necesidad de establecer estrategias para control (García, 2005).

El éxito en la colonización de una planta por parte de un hongo fitopatógeno depende de su producción de factores patogénicos adquiridos durante la evolución. Como resultado de un ataque exitoso por el hongo, la planta se convierte en un hospederero del

microorganismo y entre ambas partes existe una compatibilidad básica que representa todos los requisitos fisiológicos y bioquímicos para colonizar y parasitar una planta particular por un hongo fitopatógeno particular. Durante el proceso de colonización, el patógeno es capaz de retirar los nutrientes de la planta hospedera y vivir y multiplicarse a sus expensas; otros mecanismos incluyen la síntesis y liberación de enzimas que hidrolizan la pared celular que rompen las barreras físicas para favorecer la infección; la formación de estructuras especializadas como el apresorio; y la producción de metabolitos fitotóxicos comúnmente conocidos como fitotoxinas, consideradas como las armas especiales del patógeno. Se ha reportado que las fitotoxinas desempeñan una función particular en la patogénesis y en la virulencia de los fitopatógenos, ya que éstas conducen a cambios bioquímicos en la planta que resultan en síntomas similares de la enfermedad como el amarillamiento de las hojas, la marchitez, la necrosis o las deformaciones que finalmente alteran la fisiología de la planta y con el tiempo, causan la muerte de partes de la planta o, incluso, de toda la planta (Strange, 2007; Jeng-Seng, 2001; Prell y Day, 2001; Knogge, 1996; Prell y Day, 2000).

*Alternaria dauci* (J. G. Kühn) es el agente causal del “Tizón foliar”, una de las enfermedades más destructivas de los cultivos de zanahoria. Este hongo fitopatógeno es capaz de infectar diferentes variedades de zanahoria, tanto cultivadas como silvestres, así como otras especies de la familia Apiaceae, tales como el apio y el perejil. Aun cuando existen medidas para su control, incluyendo métodos profilácticos, aplicaciones de fungicidas y el uso de cultivares resistentes de zanahoria, ninguna de estas medidas es completamente satisfactoria (Boedo *et al.*, 2012; Boedo *et al.*, 2008). La enfermedad, que está presente en todas las áreas del mundo y afecta la economía mundial, inicia con el desarrollo de lesiones de diferentes formas y tamaños en las hojas; las lesiones son de color marrón verdoso hasta marrón oscuro y pueden estar rodeadas por un halo clorótico. Las lesiones se extienden poco a poco hasta que se unen, dando a la hoja una apariencia deteriorada. Los síntomas pueden reducir considerablemente la actividad fotosintética de la hoja y la producción de hidratos de carbono; adicionalmente, el follaje necrosado puede separarse de la raíz primaria, reduciendo significativamente la eficiencia de la recolección (Boedo *et al.*, 2012; Boedo *et al.*, 2010; Boedo *et al.*, 2008).

Como parte del estudio de los mecanismos de infección y resistencia que ocurren durante la interacción planta patógeno, en este proyecto se planteó, como objetivo principal, evaluar el efecto del medio de cultivo y el tiempo de crecimiento en la producción de metabolitos fitotóxicos de *A. dauci*.





## CAPÍTULO I

### 1.1. ANTECEDENTES GENERALES

En hábitats naturales, las plantas están rodeadas por un gran número de enemigos potenciales, incluyendo el ataque de una gran diversidad de microorganismos patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas, haciéndose “inmunes” a muchas enfermedades, debido a la activación de los mecanismos o barreras de defensa natural que poseen. Estas barreras pueden ser físicas, fisiológicas o químicas, cuyo fin es detener el ataque de agentes patógenos o disminuir la severidad de la enfermedad. Se ha postulado que la relación resistencia-avirulencia es la regla, mientras que la susceptibilidad en plantas y la virulencia de organismos patogénicos se considera la excepción a la regla (Riveros, 2010; Taiz y Zeiger, 2006; Agrios, 2005; Glazebrook, 2005).

Como parásitos, los fitopatógenos utilizan diferentes estrategias para obtener y asegurar su nutrición. Una vez que el microorganismo coloniza a la planta hospedera, éste puede desarrollarse bajo condiciones necrotróficas, biotróficas o hemibiotróficas. Los necrotróficos primero matan a las células hospederas, para obtener los nutrientes a partir del tejido muerto. También, los patógenos son capaces de desarrollarse y reproducirse sólo en tejidos vivos, son llamados biotróficos, también conocidos como parásitos obligados o estrictos. Finalmente, existe otro grupo de microorganismos denominado hemibiotróficos, los cuales presentan una etapa inicial biotrófica y una fase necrotrófica posterior (Van Kan, 2006; Rocha *et al.*, 2004; Indurm y Howlett, 2001; Prell y Day, 2000).

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende tanto de los genotipos de la planta como del patógeno. Sin embargo, patógenos tales como *Botrytis* o varias especies del género *Phytophthora* presentan poca o ninguna especificidad para las distintas plantas hospederas (Prell y Day, 2000). Por lo tanto, para estudiar y comprender la interacción planta-patógeno es preciso tomar en cuenta los componentes del sistema: la virulencia o avirulencia de un fitopatógeno, en relación con la resistencia o

susceptibilidad del hospedante. La importancia a la interrelación entre los dos organismos se debe a una interacción compatible y a una interacción incompatible. Durante una interacción compatible (hospedero susceptible, patógeno virulento), el patógeno causa daño celular más allá del sitio de infección, es decir, el reconocimiento del patógeno por parte de la planta no ocurre, por lo cual, las respuestas de defensa no se activan y la enfermedad se establece. Por el contrario, durante una relación incompatible (hospedero resistente, patógeno avirulento), existe un sistema de reconocimiento del patógeno por parte de la planta que activa la expresión de los mecanismos de defensa específicos, bloqueando la penetración y/o haciendo que el microorganismo patogénico sea incapaz de causar la enfermedad aunque penetre la planta; por lo cual la muerte celular es limitada al sitio de infección y la colonización de la planta por el patógeno es reducida. Finalmente, el conocimiento de los mecanismos que utilizan las plantas para defenderse de los microorganismos patogénicos, así como las herramientas que emplean estos organismos para establecer la infección, son de gran importancia para entender la interacción planta-patógeno (Riveros, 2010; Berger, *et al.*, 2007; Prell y Day, 2000).

Las enfermedades causadas por hongos necrotróficos y hemibiotróficos en plantas causan síntomas tales como clorosis o marchitamiento de las hojas, así como necrosis y descomposición en cualquiera de las partes o de toda la planta. Los efectos destructivos de estos patógenos se atribuyen directamente a la acción de metabolitos que causan los síntomas de la enfermedad y que son conocidos comúnmente como fitotoxinas (Prell y Day, 2000).

Las fitotoxinas son metabolitos secundarios de poseen bajo peso molecular y pertenecen a una amplia gama de familias químicas incluyendo terpenoides, macrólidos, productos fenólicos, péptidos, isocumarinas, policétidos, derivados de aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos y productos heterocíclicos, entre otros (Huang, 2001; Prell y Day, 2000; Strobel *et al.*, 1991).

Las primeras manifestaciones de interés por el estudio de las fitotoxinas aparecieron como consecuencia de las grandes destrucciones causadas por hongos del género *Helminthosporium* en cultivos de avena y maíz durante la década de los setenta en Norteamérica, así como las afectaciones en cultivos de pera y manzana causadas por

varias especies del género *Alternaria* en Japón; estos sucesos demostraron la existencia de una relación directa entre la producción de fitotoxinas por el microorganismo y su capacidad para infectar al hospedero correspondiente (Strange, 2007; Panigri, 1997).

Las fitotoxinas pueden propagarse en plantas por difusión a partir de sitios de la infección fúngica al tejido adyacente o a través del transporte por apoplasto o xilema de la planta. De acuerdo a la gama de actividades de las fitotoxinas sintetizadas por los patógenos de la planta, se distinguen de acuerdo con su especificidad y modo de acción, las fitotoxinas hospedero específicas o toxinas hospedero selectivas (HTS's) pueden actuar como factores de patogenicidad, es decir, cualitativamente, afectando solo plantas de un genotipo específico susceptibles al patógeno. A bajas concentraciones, estas toxinas inducen los síntomas naturales de la infección. Sin embargo, la mayoría de las fitotoxinas son hospedero no específicas u hospedero no selectivas (no-HTS's), y pueden funcionar como factores de virulencia, es decir, actúan de una manera cuantitativa intensificando los síntomas de la enfermedad en los que no se reproducen los patrones de resistencia y susceptibilidad del hospedero al patógeno. De hecho, la capacidad para producir una o más toxinas y usarlos como armas químicas puede ser el factor decisivo en la virulencia de patógenos de plantas e incluso su patogenicidad. Debido a que estos metabolitos biológicamente activos son toxinas de amplio espectro pueden afectar a muchos cultivos de importancia económica, su impacto total en la agricultura tiene graves repercusiones (Colmenares, 2002; Prell y Day, 2000).

Dada su importancia por la función que desempeñan en el proceso infeccioso, las HST's han recibido una mayor atención y actualmente se conocen alrededor de 40 HTS's que pertenecen químicamente a diferentes familias incluyendo péptidos cíclicos, terpenoides y policétidos, entre otras (Tabla 1.1) (Otani *et al.*, 1995; Kohmoto y Otani, 1991). Los principales géneros reconocidos por su producción de fitotoxinas son el género *Alternaria* y el género *Cochliobolus*; sin embargo existen HTS's producidas por otros fitopatógenos, e.g. la toxina PM producida por *Phyllosticta maydis* (*Mycosphaerella-Zeaemaydis*), y la peritoxina, producida por *Periconia circinata* (Tabla 1) (Jeng-Sheng, 2001; Prell y Day, 2000).

Tabla 1. 1. Fitotoxinas hospedero selectivas (HST's)

Patógeno	Hospedero	Toxina(s)
<i>Alternaria mali</i>	Manzana	AM I, II y III
<i>A. tenuissina</i>	Chícharo	ATC
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	AL I y II
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Fresa	AF I y II
<i>A. kikuchiana</i>	Pera	AK I y II
<i>A. citri</i> p. limón	Limón	ACR, I ACT I y II
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>tangerina</i>	Tangerina	ACTG A y B
<i>A. longipes</i>	Tabaco	AT
<i>Bipolaris sacchari</i>	Caña de azúcar	HS A, B y C
<i>Cochiobolus carbonum</i> raza 1	Maíz	HC I, II y III
<i>C. heterostrophus</i> raza T	Maíz	HM 1, 2, 3 y 1'
<i>C. victoriae</i>	Avena	HV
<i>Corynespora cassicola</i>	Tomate	CC
<i>Phyllosticta maydis</i>	Maíz	PM A, B, C y D
<i>Periconia circinata</i>	Sorgo	Peritoxina

Actualmente, se conocen al menos 200 fitotoxinas no-HTS's, pertenecientes a diversas familias químicas, sintetizadas en diferentes vías metabólicas. Entre las no-HTS's que han recibido mayor atención se encuentran la brefeldina A, producida por *Penicillium decumbes* y *A. carthami*; cercosporina de *Cercospora kikuchii*; la fusicoccina A de *Fusicoccum amygdali*; las ofiobolinas de *C. miyabeanus*; el ácido fusárico, sintetizado por varias especies de *Fusarium*; la tentoxina, destruxina B y el zinniol aisladas por diferentes especies y patotipos del género *Alternaria*. Todas estas toxinas son producto del metabolismo secundario de sus respectivos hongos. Sus blancos son principalmente los organelos de sus hospederos vegetales que incluyen membranas, mitocondrias y cloroplastos. Por lo tanto, el espectro de acción de cada fitotoxina es mucho más amplio que la gama de hospederos del patógeno que lo produce (Gamboa-Angulo *et al.*, 2002; Jeng-Sheng, 2001; Prell y Day, 2000).

Además de su importancia en el campo de la patología vegetal, en la que han sido utilizadas como reguladores potenciales en los procesos bioquímicos, fisiológicos y genéticos que suceden durante el desarrollo normal de la infección en especies vegetales, las fitotoxinas han sido utilizadas también como supresores e inductores de respuestas de defensa (fitoalexinas); como base de estudios de relación estructura-actividad; para elucidar mecanismos de detoxificación, rutas de biosíntesis y metabolismo (Huang, 2001; Haraguchi *et al.*, 1996). Actualmente las fitotoxinas representan un gran potencial para utilizarse como herbicidas biodegradables en el control biológico de malezas y como herramientas de selección *in vitro* de líneas de plantas resistentes a fitopatógenos (Wood *et al.*, 1992; Strobel *et al.*, 1991).

Algunas veces, la producción de fitotoxinas *in vivo* no siempre es la misma bajo condiciones *in vitro*, o viceversa; la composición del medio de cultivo afecta y determina tanto el crecimiento como las respuestas bioquímicas, genéticas y morfológicas de un microorganismo, así como la capacidad del patógeno de producir los metabolitos deseados y, en general, no es posible predecir el efecto cualitativo o cuantitativo de los componentes del medio sobre la producción de metabolitos fitotóxicos. Este efecto ha sido reportado tanto para bacterias como para hongos. Para el caso de los fitopatógenos, estas condiciones constituyen uno de los aspectos de mayor importancia y es necesario considerar diferentes factores tales como la naturaleza (sólido o líquido) y composición del medio de cultivo (definidos e indefinidos); de las fuentes de nutrientes (de carbono, nitrógeno, iones inorgánicos); de las condiciones de temperatura, de iluminación (luz continua, fotoperiodo u oscuridad); de aereación (cultivos estacionarios o en agitación); incluso del pH o de la presencia de reguladores de crecimiento (Strange, 2007; Prell y Day, 2001).

En la mayoría de los trabajos reportados y encaminados hacia el aislamiento e identificación de metabolitos fitotóxicos y la evaluación de su papel en el proceso infeccioso, se utilizan técnicas de bioensayo simples como el bioensayo de gota, el de inmersión, el de infiltración, el de fuga de electrolitos, y el de viabilidad celular para monitorear el proceso de purificación del o los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica detectada. Los tres primeros son métodos confiables que reproducen *in vitro* los síntomas de la infección causados por el patógeno; son bioensayos simples y fácilmente

reproducibles. El bioensayo de fuga de electrolitos evalúa a nivel membrana el daño ocasionado por las fitotoxinas, cuantificando la pérdida de solutos; este método permite una mayor sensibilidad y la obtención de resultados en un tiempo relativamente corto. Finalmente, los cultivos celulares son ampliamente usados como una herramienta conveniente para el análisis complejo a nivel celular y molecular; la buena reproducibilidad en el bioensayo de viabilidad celular hace adecuado este método ya que permite una mejor cuantificación del daño (Moscatiello, *et al.*, 2013; Puch, 2001).

*A. dauci* es el patógeno que causa el tizón foliar, una de las enfermedades más destructivas en los cultivos de zanahoria, importante fuente alimenticia para millones de personas en todo el mundo. *A. dauci* es un miembro del género *Alternaria*, reconocido por el gran número de patógenos importantes en hospederos vegetales, e.g. *A. carthami* en cártamo; *A. cucumerina* en cucurbitáceas; *A. porri* en la cebolla; *A. solani* en tomates y papas y *A. zinnia* en *Zinnia* spp., así como *A. mali* y *A. kikuchiana* en manzana, pera y tabaco (Farrar *et al.*, 2004; Prell y Day, 2000).

Los síntomas foliares causados por *A. dauci* aparecen de 8 a 10 días después de la infección como lesiones pequeñas, de color marrón verdoso; estas lesiones se agrandan y el tejido infectado se vuelve marrón oscuro a negro y en ocasiones puede estar rodeado de un halo clorótico. *A. dauci* puede infectar a las inflorescencias, semillas y plántulas en desarrollo, aunque las hojas viejas son las primeras afectadas. La infección de los brotes y partes florales pueden llevar a la infección de las semillas en desarrollo; una vez infectadas, las semillas pueden transmitir la infección a nuevas áreas de producción de zanahoria o de otras especies de la familia Apiaceae (Farrar *et al.*, 2004).

Los patógenos del género *Alternaria*, dependiendo de su especie o patotipo, cuentan con diferentes herramientas para lograr su establecimiento exitoso, en sus hospederos, (Panigrahi; 1997). Asimismo, es interesante comentar que el zinniol, descrito como el principal metabolito fitotóxico de este hongo y responsable de la actividad fitotóxica de la fracción lipofílica mediante el bioensayo de gota (Gamboa-Angulo *et al.*, 2000 y 2002; Cotty y Misaghi, 1984), utilizado en el modelo celular mostró que este metabolito no posee actividad fitotóxica marcada, tomando en cuenta que las concentraciones empleadas para evaluar su efecto fitotóxico fueron significativamente mayores (150  $\mu$ M a

1 mM) que las reportadas para otras no HSTs evaluadas en modelos celulares (Qui-Zapata, 2008; Barash *et al.*, 1981). Únicamente a nivel del daño a la membrana celular, señalada como el principal sitio de acción del zinniol, presentó nuevamente una actividad menor a la esperada para un metabolito puro (Huang, 2001). En estudios recientes, la toxicidad de zinniol se evaluó a una concentración de 10  $\mu$ M (3  $\mu$ g/ml) en suspensiones celulares de zanahoria y no se observó fitotoxicidad, por consiguiente el zinniol probablemente no es una fitotoxina como previamente sugiere Qui *et al.* (2008), es decir, no está necesariamente implicado en el proceso de patogénesis durante la interacción planta-patógeno y que la aparición de lesiones en las hojas tratadas con zinniol, ocurre como consecuencia de la inducción de una respuesta de defensa por parte del hospedero (Wolpert *et al.*, 2002). Este último punto, en muchas ocasiones, no es tomado en cuenta al momento de designar un metabolito como fitotoxina (Huang, 2001).

Por otra parte, una vez que se sospecha que una fitotoxina está involucrada en la enfermedad de una planta, la subsecuente investigación depende de métodos confiables para la separación, detección y purificación del o los metabolitos fitotóxicos. No obstante, un perfil de metabolitos secundarios puede visualizarse usando métodos cromatográficos, tales como cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía de Gases (CG) o cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). El análisis de perfiles metabólicos ha sido usado para la diferenciación entre especies en géneros tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Xylariaceae*; asimismo, los perfiles de metabolitos secundarios también han demostrado ser útiles para diferenciar especies del género *Alternaria* (Andersen *et al.*, 2001).

Asimismo, la espectrometría de masas (MS) es una técnica que durante la pasada década ha tenido un gran avance, fundamentalmente en el desarrollo de diferentes metodologías y mediante su combinación con técnicas analíticas de separación, e.g. métodos cromatográficos o electroforesis (Xie *et al.*, 2014).

El acoplamiento de una técnica de separación con MS resulta muy útil al conseguir una metodología analítica en dos dimensiones, en la que se realiza simultáneamente la separación y la identificación (Loescher *et al.*, 2014). Recientemente, la combinación cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de ionización por

electrospray (LC-ESI-MS, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser una buena opción para la identificación de productos nuevos y conocidos, dado que permite la detección de una amplia gama de productos. Las características propias de la MS, como la determinación de masas exactas, la elevada sensibilidad y el alto poder de resolución de masas, la convierten en uno de los métodos de detección más recomendables.

Los extractos de *A. dauci* son mezclas complejas que contienen un gran número de constituyentes químicos que dificultan el aislamiento y la detección de cada componente. Por lo que es necesario el uso de técnicas y/o métodos adecuados tales como los mencionados anteriormente para la identificación de los diferentes componentes (Loescher *et al.*, 2014).

Dado que hasta ahora los reportes sobre el papel que desempeña *A. dauci* durante la interacción con su hospedero son escasos en este proyecto se planteó como objetivo evaluar el efecto del medio de cultivo y el tiempo de crecimiento en la producción de metabolitos fitotóxicos de *A. dauci*, evaluando el efecto de los medios de cultivo líquido de composición definida e indefinida, en presencia o ausencia de infusión de hojas de perejil cultivados en diferentes tiempos, en la actividad fitotóxica de los cultivos.



## 1.2. HIPÓTESIS

Se ha reportado que el metabolismo de los hongos del género *Alternaria* es afectado por las condiciones de cultivo *in vitro*; por consiguiente la producción de metabolitos fitotóxicos de *A. dauci* está influenciado por los diferentes medios de cultivo líquido y el tiempo de crecimiento del mismo.

## 1.3. OBJETIVOS

### 1.3.1 OBJETIVO GENERAL

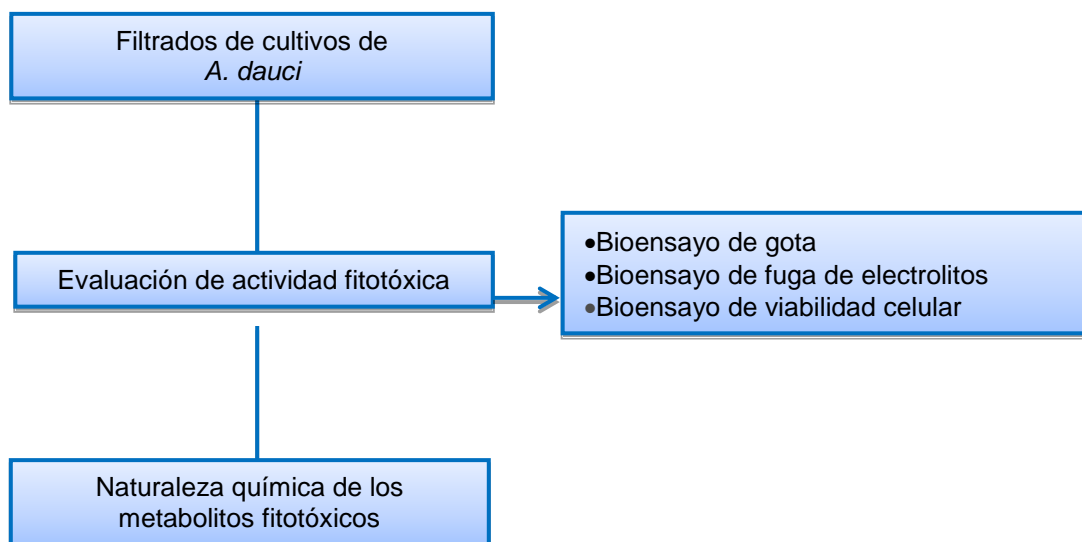
- Evaluar el efecto del medio de cultivo y el tiempo de crecimiento en la producción de metabolitos fitotóxicos de *A. dauci*.

### 1.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones óptimas de cultivo, crecimiento y producción de fitotoxinas del hongo *A. dauci* en medio líquido.
- Evaluar diferentes técnicas de bioensayo para detectar la actividad fitotóxica en filtrados de cultivo de *A. dauci*.
- Utilizar HPLC-MS para establecer de manera preliminar la naturaleza química del o los metabolitos fitotóxicos producidos por *A. dauci* bajo diferentes condiciones de cultivo.

## 1.4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados se utilizó la siguiente estrategia experimental:



**Figura 1.1.** Estrategia experimental

## CAPÍTULO II

### EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE *Alternaria dauci*

#### 2.1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por hongos necrotróficos y hemibiotróficos en plantas producen síntomas tales como clorosis, necrosis y marchitamiento o muerte de una parte o de la planta completa. Con frecuencia, estas afecciones ocurren como consecuencia de la liberación de metabolitos tóxicos, denominados “fitotoxinas” (Cruz, 2009).

Se ha encontrado que los hongos fitopatógenos al ser cultivados *in vitro* producen metabolitos, algunos de ellos con actividad fitotóxica, que no producen *in vivo* o viceversa. Esta variación se debe principalmente a las diferencias en las condiciones de cultivo y las fuentes de nutrientes del medio de cultivo, afectando no solo el crecimiento sino la capacidad del patógeno de producir los metabolitos de interés. Por esta razón, la producción de metabolitos fitotóxicos por parte de un fitopatógeno en particular, depende de sus condiciones de cultivo, así como de la naturaleza y composición del medio de cultivo, de las condiciones de temperatura, aereación, pH y de la presencia de reguladores de crecimiento (Bundale, *et al.*, 2015; Qui, 2008; Puch, 2001).

Debido al limitado conocimiento que se tiene sobre los procesos metabólicos primarios o secundarios que ocurren en el interior de la célula de un microorganismo, la optimización de las condiciones de cultivo que permitan la obtención de un mayor rendimiento de fitotoxinas o cualquier otro metabolito secundario de interés, es un proceso que generalmente se realiza de manera empírica, experimental o la combinación de ambos para cada microorganismo (Bundale *et al.*, 2015; Shaw, 1981).

Habitualmente, los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de hongos son de dos tipos; de composición definida o indefinida. Los primeros proveen al microorganismo fuentes de carbono y nitrógeno en concentraciones y composiciones

conocidas, mientras que los medios de composición indefinida poseen fuentes complejas de carbono y nitrógeno.

Otros factores de importancia, por su influencia en la producción de metabolitos secundarios, son la iluminación, la aereación y el tiempo de cultivo de los microorganismos. Aún cuando el efecto de la luz en el crecimiento y reproducción de los microorganismos está bien documentado, el efecto específico de los otros factores como la aereación, no está del todo establecido (Shaw, 1981).

*A. dauci* es un hongo necrotrófico, responsable del “tizón foliar” de la zanahoria. Aun cuando la enfermedad está presente en todo el mundo y reduce de manera significativa (40-99%) los rendimientos de los cultivos de zanahoria (Boedo, *et al.*, 2010; Boedo, *et al.*, 2008), hasta ahora no se conocen las fitotoxinas producidas por el hongo y el papel de éstas en el proceso infeccioso. En este capítulo se describe la evaluación del crecimiento de *A. dauci* en diferentes medios de cultivo y bajo diferentes tiempos de crecimiento, comparando los rendimientos de biomasa micelial y de extracto orgánico del filtrado de cultivo.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. OBTENCIÓN DE LA CEPA Y PREPARACIÓN DE CULTIVOS “PADRE”**

Para la preparación de cultivos “padre” de la cepa certificada de *A. dauci* (P2 AdFRA 017), una porción de micelio de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> fue colocada sobre 15 mL de V8 con agar en tubos de rosca (medida: 22x135 mm) inclinados. Los tubos fueron incubados durante 15 días a una temperatura de 26+/-2°C, con luz natural. Terminado el tiempo de incubación, los tubos se guardaron a temperatura ambiente, en oscuridad, hasta su uso.

### **2.2.2. MATERIAL VEGETAL**

Para la preparación de la infusión se utilizaron plantas comerciales de perejil (*Petroselinum crispum*) adquiridas en un supermercado local.

### **2.2.3. PREPARACIÓN DE CULTIVOS “SEMILLA”**

Dos mililitros de agua destilada estéril se adicionaron al cultivo “padre” de *A. dauci* y con ayuda de un pincel estéril, la superficie de crecimiento fue raspada ligeramente. Luego se depositó un mililitro del sobrenadante sobre 15 mL de medio V8 con agar contenidos en una caja de Petri. Las cajas se incubaron durante 15 días a una temperatura de 26+/-2°C, bajo condiciones de luz natural. Terminado el periodo de incubación, el inóculo se preparó agregando cinco mililitros de agua destilada estéril sobre la caja que contenía el cultivo y la superficie fue raspada ligeramente con la ayuda de un pincel estéril, tomándose 1 mL del sobrenadante para inocular los correspondientes medios líquidos de cultivo.

## 2.2.4. CULTIVO DE *A. DAUCI* EN DIFERENTES MEDIOS Y BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO

Se prepararon medios de composición definida (Czapek-Dox, CD) e indefinida (Jugo V8/CaCO<sub>3</sub>, V8 y Jugo Zanahoria/CaCO<sub>3</sub>, ZN) cada uno preparado con infusión de perejil (20 g/L) (CDI, V8I, ZNI) o con agua (CD, V8, ZN). Se prepararon doce matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml de medio de cultivo líquido cada uno y nueve de ellos fueron inoculados con 1 ml de esporas de *A. dauci*. Los matraces restantes se dejaron sin inocular como control. Los matraces se incubaron a diferentes tiempos (48, 72 y 96 h), a una temperatura de 26+/-2°C, bajo condiciones de luz natural y agitación constante (100 rpm). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Finalizado el tiempo de incubación, el medio fue separado de la biomasa micelial por filtración al vacío a través de un embudo Buchner y con ayuda de un papel Whatman No. 1 (Tamaño de poro de 90 mm). El filtrado se extrajo con AcOEt (2:1, 1:1, 1:1), obteniéndose el correspondiente extracto orgánico crudo y la fase acuosa residual (Figura 2.1). Para estimar la biomasa micelial producida, el papel filtro con la biomasa micelial se congeló, se liofilizó y se pesó.

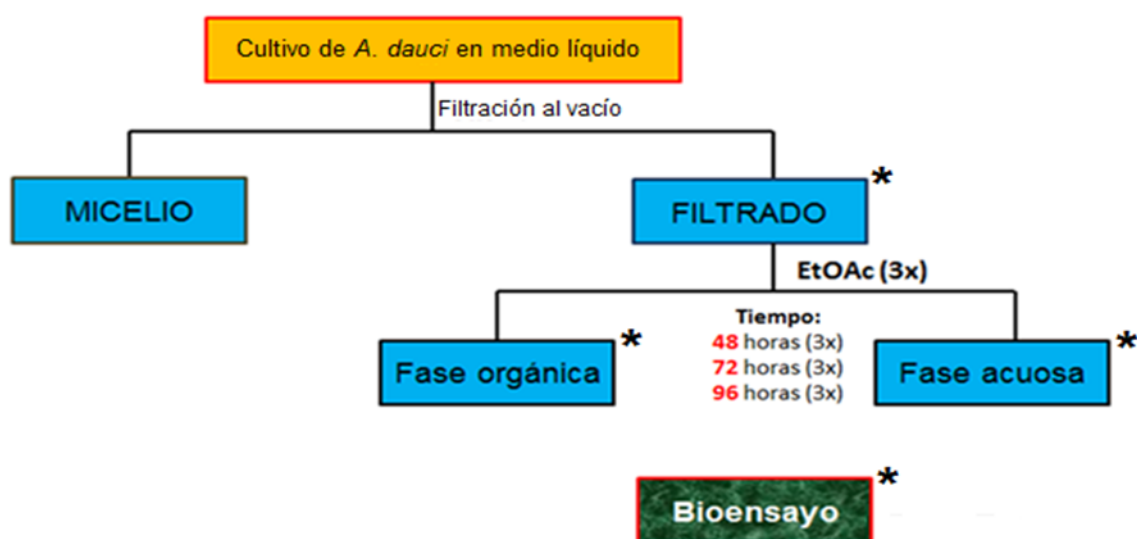
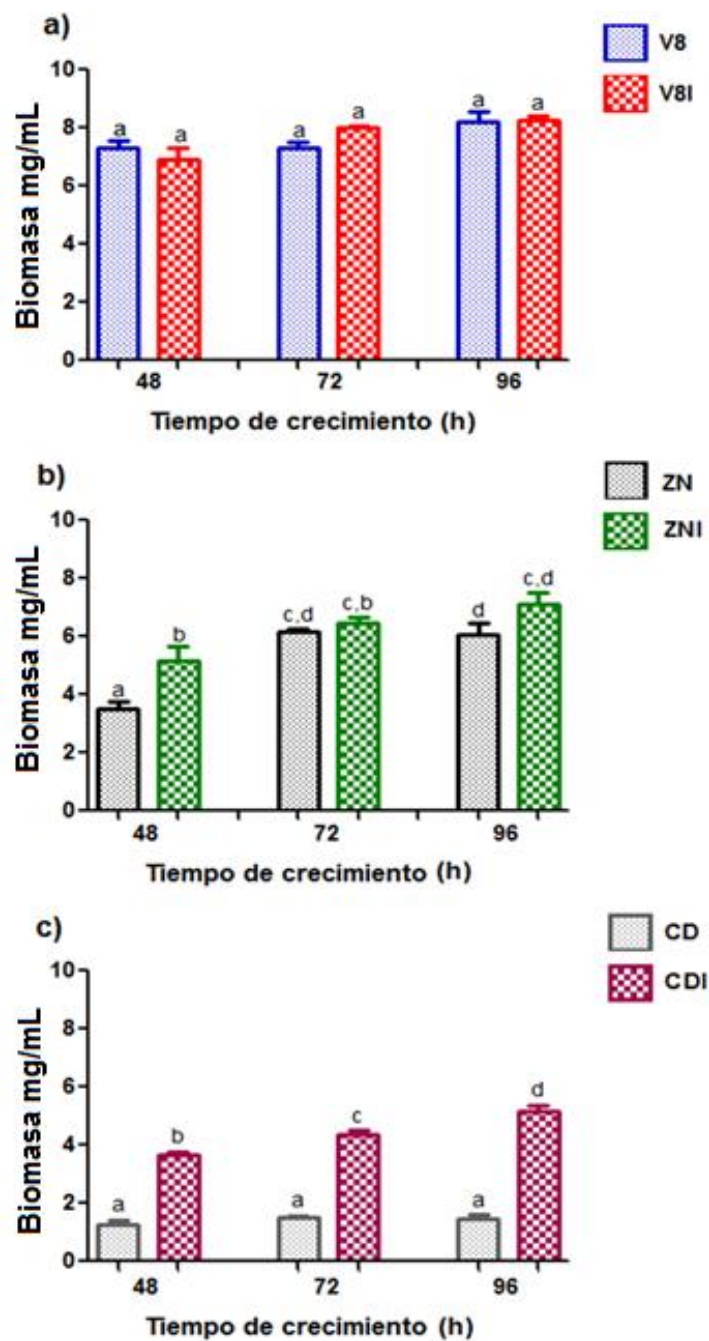


Figura 2. 1. Diagrama general de la separación y extracción de cultivos de *A. dauci*

### 2.3. RESULTADOS

El crecimiento de *A. dauci* fue evaluado en condiciones de agitación constante (100 rpm), a tres diferentes tiempos de cultivo (48, 72, 96 horas), utilizando dos medios indefinidos (V8 y ZN) y un medio definido (CD), preparados con agua destilada (V8, ZN y CD) o con una infusión de hojas de perejil (V8I, ZNI, CDI).

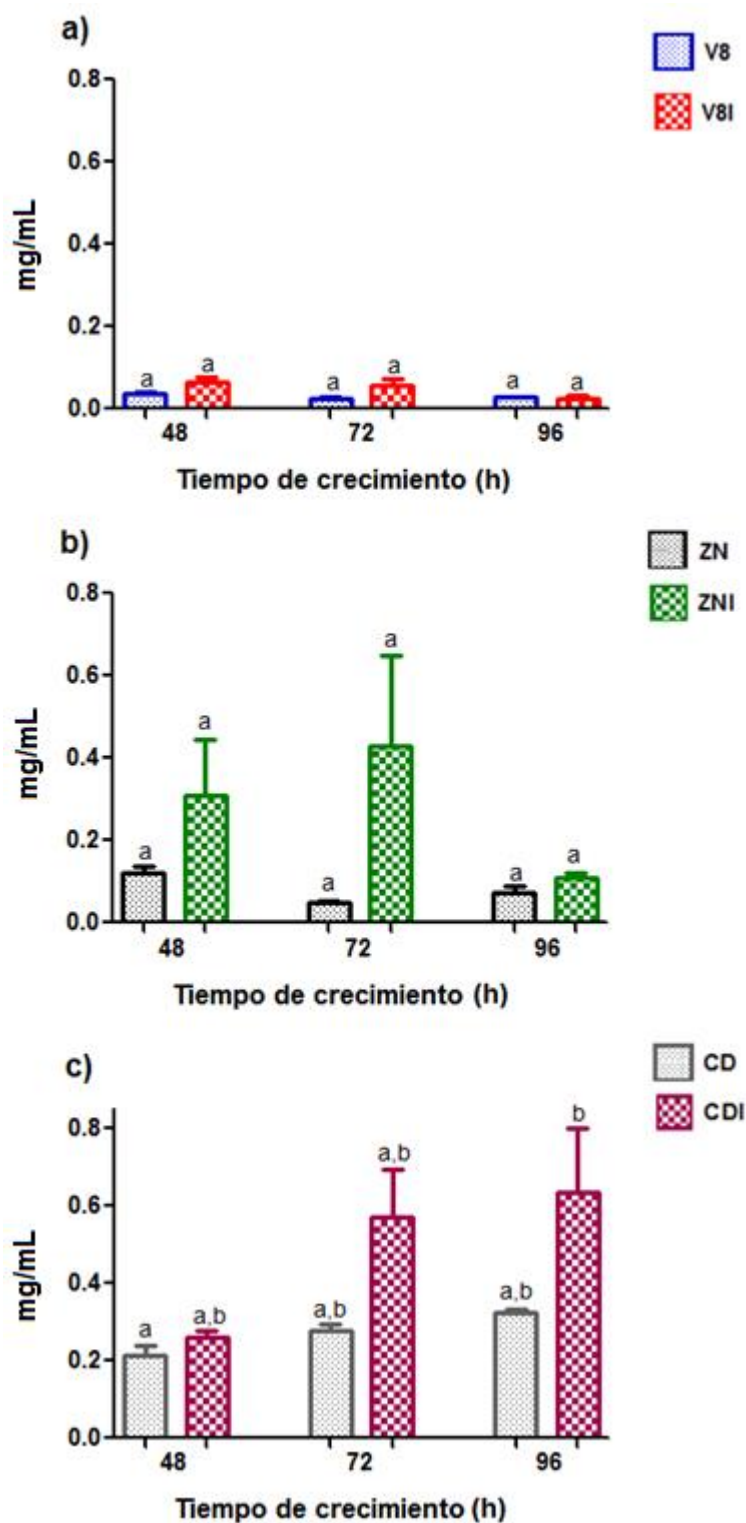
El análisis de los resultados del rendimiento de biomasa micelial en cada uno de los cultivos mostró que al ser cultivado en medio V8 el fitopatógeno alcanza su máximo crecimiento a las 48 h y que el uso de la infusión de perejil en el medio de cultivo no tiene un efecto en el crecimiento del hongo (Fig. 2.2. a). También, el análisis de los resultados del cultivo de *A. dauci* en el medio jugo de zanahoria mostró que el crecimiento del hongo alcanza su máximo a las 72 horas y que éste permanece constante hasta las 96 horas, en tanto que con la incorporación de la infusión de perejil al medio de cultivo el microorganismo alcanzó su máximo crecimiento a las 48 h (Fig. 2.2.b). Finalmente, el análisis de los rendimientos de biomasa micelial obtenidos al cultivar el fitopatógeno en medio Czapek-Dox mostraron que el crecimiento del microorganismo es pobre en este medio pero la adición de la infusión de perejil favorece el crecimiento del hongo, observándose en este caso un aumento constante en el rendimiento micelial con respecto al tiempo de cultivo (Fig. 2.2. c).



**Figura 2. 2.** Producción de biomasa (crecimiento micelial) liofilizada de *A. dauci* en diferentes medios de cultivo a diferentes tiempos). Las barras con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ )



Por otra parte, el análisis de los rendimientos de extracto orgánico en cada uno de los cultivos mostró los valores más bajos para los cultivos en medio V8, tanto en medios preparados con agua destilada, como en medios preparados con infusión de perejil (Fig. 2.3. a). De la misma forma, los cultivos en el medio de jugo de zanahoria preparado con agua destilada o infusión de perejil mostraron rendimientos bajos, aunque ligeramente más altos que los obtenidos para el caso del medio V8 (Fig. 2.3. b). Finalmente, los rendimientos más altos de extracto orgánico se obtuvieron al cultivar el fitopatógeno en medio Czapek-Dox preparado tanto con agua destilada, como con infusión de perejil, observándose una máxima producción de extracto orgánica a las 96 h, en cultivos de Czapek-Dox preparado con infusión de perejil (Fig. 2.3 c).

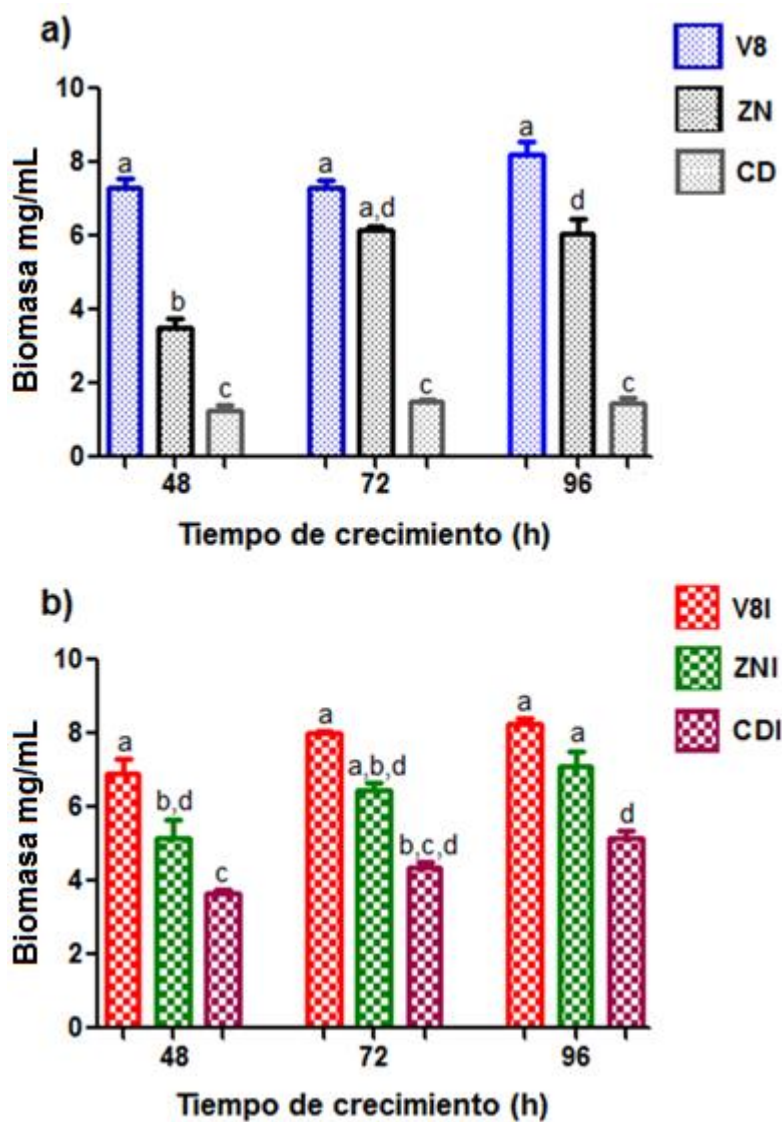


**Figura 2. 3.** Rendimiento de los extractos orgánicos crudos (mg/ml) de *A. dauci* en diferentes medios de cultivo. Las barras con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ )

## 2.4. DISCUSIÓN

Algunos hongos crecen bien en medios líquidos bajo condiciones estacionarias, pero a menudo este crecimiento se limita a la superficie. Generalmente el factor limitante para inducir una reproducción y un crecimiento fúngico adecuados *in vitro* es la aereación, por lo que es necesario agitar el medio de cultivo durante el crecimiento de un hongo con el fin de tener una constante renovación de nutrimentos en su superficie. Como consecuencia de este aumento en la aereación, el período de crecimiento es corto y se evita un alto porcentaje de células muertas. Por otra parte, el crecimiento y la esporulación de la mayoría de los hongos se favorece a temperaturas de entre 15 y 25°C y en presencia de luz; para el caso particular de *Alternaria* spp. se ha reportado que su crecimiento es óptimo a 26°C y que disminuye a temperaturas bajas (e.g. 5°C), mientras que a 35°C no hay producción de esporas (Rodrigues, et al, 2010; Hebert y French, 1980; Díaz, 1966). Con base a lo anterior, en este trabajo el cultivo de *A. dauci* se llevó a cabo en condiciones de agitación, a temperatura ambiente (26°C) y con luz natural.

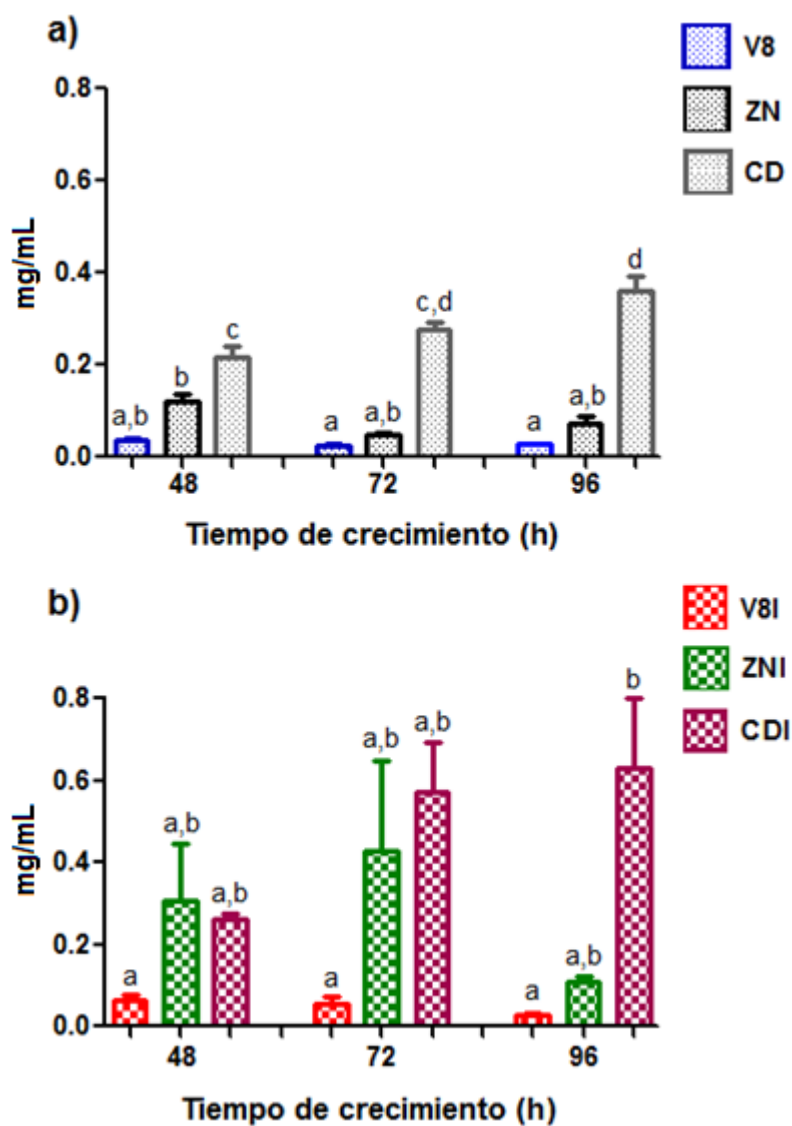
Se ha reportado que los medios indefinidos como el medio de jugo de zanahoria o V8 inducen o aumentan la esporulación de los hongos fitopatógenos, lo que resulta en un buen crecimiento micelial y favorece la producción de metabolitos secundarios (Lecomte *et al.*, 2014; Barash, 1981; Hebert y French, 1980). Lo anterior coincide con los resultados obtenidos por Rodrigues *et al.* (2010), quien obtuvo los mejores resultados de esporulación de *Alternaria solani* al cultivarlo en medio de jugo V8, a 25°C, en condiciones de agitación, durante siete días. En este trabajo, al evaluar el crecimiento de *A. dauci* en tres medios de cultivo diferentes, dos indefinidos (jugo V8 y jugo de zanahoria) y uno definido (Czapek-Dox), y a tres diferentes tiempos de cultivo (48, 72 y 96 h), se encontró que, utilizando el medio de cultivo de jugo V8, el hongo alcanza su máximo crecimiento micelial a las 48 h (Fig. 5a).



**Figura 2. 4.** Producción de biomasa (crecimiento micelial) liofilizada de *A. dauci* en diferentes medios de cultivo a diferentes tiempos a) sin infusión de perejil, b) con infusión de perejil). Las barras con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ )

Por otra parte, y dado que se ha reportado que el uso de infusiones de una planta hospedera estimula la esporulación del fitopatógeno y la producción de fitotoxinas, además de favorecer la formación de conidios y mantener la viabilidad del hongo (Ávila *et al.*, 2000; Hebert y French, 1980), cada uno de los medios de cultivo mencionados anteriormente fue preparado sustituyendo el agua destilada por una infusión de perejil. Los resultados obtenidos mostraron que, para el caso del medio de jugo V8, la incorporación de la infusión de perejil no tuvo un efecto significativo en el crecimiento del hongo. Sin embargo, tanto para el medio de jugo de zanahoria como para el del medio Czapek-Dox, el uso de la infusión de perejil en la preparación del medio favoreció el crecimiento micelial del fitopatógeno (Fig. 2.4.b)

Al comparar los diferentes medios y condiciones de cultivo de *A. dauci* en cuanto a su rendimiento de extracto orgánico crudo, se encontró que los cultivos en medio Czapek-Dox preparado con infusión de perejil, primero, y agua destilada, segundo, produjeron los mejores rendimientos de metabolitos secundarios lipofílicos, en tanto que los rendimientos más bajos se obtuvieron a partir de filtrados de cultivos en jugo de zanahoria y jugo V8. Lo anterior no coincide con resultados en la literatura que mencionan al medio de jugo V8 como el medio más comúnmente utilizado para el aislamiento y mantenimiento de *Alternaria* spp., así como para estudios relacionados con la interacción planta-patógeno y para la producción de metabolitos secundarios (Lecomte *et al.* 2012; Qui *et al.* 2010; Shaw, 1981;). En este estudio, aun cuando el medio de jugo V8 mostró el mayor crecimiento micelial, su rendimiento de extracto orgánico crudo resultó ser el más bajo (Fig. 6ab), comparado con el obtenido al cultivar el fitopatógeno en el medio definido Czapek-Dox (Fig. 2.5. b), que se caracteriza por estar constituido por fuentes de nitrógeno y carbono químicamente especificadas, lo que puede colocar al fitopatógeno en condiciones de estrés, favoreciendo de esta manera la producción de metabolitos secundarios (Puch, 2001; Shaw, 1981).



**Figura 2. 5.** Rendimiento de los extractos orgánicos crudos (mg/ml) de *A. dauci* en diferentes medios de cultivo a) sin infusión de perejil, b) con infusión de perejil). Las barras con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ )

## 2.5. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que para el caso de *A. dauci*, cultivado bajo condiciones similares de agitación, temperatura y luz, la elección del medio de cultivo es crítica para alcanzar el máximo crecimiento micelial en corto tiempo, y que dependiendo del medio de cultivo seleccionado, la sustitución del agua destilada por una infusión de perejil, como planta hospedera del fitopatógeno, puede o no, reducir el tiempo de cultivo del hongo. Los resultados obtenidos indican que no existe una relación directa entre la producción de metabolitos secundarios y la cantidad de micelio generado por *A. dauci* en cada uno de los diferentes medios, bajo las diferentes condiciones de cultivo.





## CAPÍTULO III

### EFFECTO DEL MEDIO Y LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LA ACTIVIDAD FITOTÓXICA DE LOS CULTIVOS DE *ALTERNARIA DAUCI*

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre la interacción planta-patógeno requieren modelos experimentales que permitan evaluar los diferentes mecanismos de patogénesis, así como las respuestas a nivel celular que se desencadenan como consecuencia de esta interacción (Asai *et al.*, 2000). En la mayoría de los trabajos reportados y encaminados hacia el aislamiento e identificación de metabolitos fitotóxicos y a la evaluación de su papel en el proceso infeccioso, se utilizan técnicas de bioensayo simples como los bioensayos de gota, de inmersión, de disco de hoja, de microdilución en caldo, de germinación de esporas, de fuga de electrolitos, para monitorear el proceso de purificación de los metabolitos responsables de la actividad detectada (Lecomte *et al.* 2014; Vargas *et al.* 2014; Masoud, 2012;. Díaz *et al.* 2011) Así mismo, se requiere de un modelo específico para la especie vegetal y su patógeno, para contribuir en el esclarecimiento de los mecanismos a nivel celular, para ello los productos purificados son evaluados mediante ensayos *in vitro* utilizando cultivos celulares, monitoreando la viabilidad o muerte celular, o en estudios *in situ* (Huang, 2001; Jacyn y Norton, 1994). Al evaluar la actividad biológica de metabolitos secundarios en diferentes modelos experimentales, es de suma importancia obtener resultados confiables, reproducibles y que requieran de pequeñas cantidades de muestra, particularmente en el caso de la evaluación de la actividad fitotóxica a nivel celular (Cotty y Misaghi, 1984).

Como parte del proceso y mecanismo de resistencia de las plantas y de defensa frente al ataque de patógenos, en este capítulo se describe la evaluación del efecto del medio y las condiciones de cultivo (Capítulo 2) en la actividad fitotóxica de *A. dauci*.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. FRACCIONES FITOTÓXICAS**

Las diferentes fracciones fitotóxicas se obtuvieron a partir de cultivos de *A. dauci* siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Cap. 2).

### **3.2.2. MATERIAL VEGETAL**

Para los bioensayos de gota y fuga de electrolitos se utilizaron discos cortados de hojas de perejil (*Petroselinum crispum*). Las plantas comerciales de perejil fueron adquiridas en un supermercado local.

### **3.2.3. MATERIAL BIOLÓGICO**

Se utilizaron cultivos celulares de *Daucus carota*, previamente establecidos y caracterizados.

### **3.2.4. PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES**

A los cultivos celulares de *D. carota* (día 7) se le agregaron las fracciones fitotóxicas (1 mg/ml) y los cultivos se dejaron en incubación durante 13 días. Las células se cosecharon al término de la incubación y se procedió a evaluar la actividad fitotóxica.

## **3.3. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES DE *DAUCUS CAROTA***

### **3.3.1. INDUCCIÓN DE CULTIVOS CELULARES**

Se obtuvo una línea celular a partir de tallos de zanahoria cultivados *in vitro*. Esta línea celular fue seleccionada y proporcionada por el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y la M.

en C. Rosa María Galaz Avalos de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY.

### **3.3.2. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES**

La caracterización de la línea celular (tallo) se llevó a cabo evaluando cada dos días, durante 16 días, su viabilidad, el volumen final y el volumen de paquete celular, su peso fresco y su peso seco, así como el número de células, la conductividad y pH del medio de cultivo. Se utilizó una tabla aleatoria (enumerando los matraces) para tomar muestras por triplicado que se caracterizaron de acuerdo a los parámetros señalados anteriormente.

#### **3.3.2.1. VIABILIDAD CELULAR**

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de azul de Evans. A 1 mL de células en suspensión se le agregaron 250  $\mu$ l del colorante azul de Evans al 0.1%; después de 15 min a temperatura ambiente, las células se lavaron con 5 mL de agua destilada y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, hasta eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, las células se resuspendieron en 2 mL de metanol al 50% con SDS al 1%, se incubaron a 65°C durante 30 minutos para extraer el colorante y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. El procedimiento se repitió tres veces y el sobrenadante se llevó a un volumen final de 7 mL y se leyó su absorbancia a 600 nm. El control negativo se realizó con células en suspensión muertas (72°C durante 1 hora) (Escobedo y Miranda, 2003).

#### **3.3.2.2. VOLUMEN FINAL**

Se agitó el matraz y se midió el volumen de la suspensión celular utilizando una probeta.

### **3.3.2.3 VOLUMEN DE PAQUETE CELULAR**

Se tomaron 10 mL de suspensión celular y se colocaron en una centrífuga Beckman a 3000 rpm por 15 min. Después de medir el paquete celular, el material se regresó al matraz para determinar el peso fresco, peso seco y viabilidad celular.

### **3.3.3. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR**

El crecimiento celular en los cultivos en suspensión se determinó al cuantificar cada dos días el peso fresco, el peso seco y el número de células.

#### **3.3.3.1. PESO FRESCO**

Las suspensiones celulares se filtraron al vacío (450 mm Hg) durante 1 minuto, utilizando un embudo Büchner; posteriormente se pesó el paquete celular.

#### **3.3.3.2. PESO SECO**

Las muestra obtenidas del peso fresco se mantuvieron en congelación hasta terminar el ciclo de cultivo, al término de éste las muestras se liofilizaron (3 días) y se pesaron.

#### **3.3.3.3. NÚMERO DE CÉLULAS**

Para proceder al conteo de las células, primero se llevó a cabo una separación de los agregados celulares. Para esto se tomaron 500  $\mu$ l de las suspensiones celulares del matraz original y se mezclaron con 1 mL de Trióxido de Cromo al 8%; esta mezcla se colocó a baño María a 70°C durante 15 minutos, y transcurrido este tiempo se agitó (Vortex) durante 10 minutos. Finalmente, se tomó una muestra (20  $\mu$ l) de la mezcla y se procedió a contar el número de células en diferentes cuadrantes de la cámara de Neubauer. El conteo se realizó con la ayuda de un microscopio óptico Zeiss (10X).

### **3.3.4. DETERMINACIÓN DE CAMBIOS EN EL PH Y LA CONDUCTIVIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO**

#### **3.3.4.11. PH Y CONDUCTIVIDAD**

A cada uno de los filtrados se les midió el pH (potenciómetro, Termo Orion) y la conductividad (Conductímetro, Hi8733, HANNA instruments).

### **3.4. BIOENSAYOS**

#### **3.4.1. BIOENSAYO DE GOTAS.**

Discos cortados de hojas de perejil (*P. crispum*) de 1 cm. de diámetro (previamente lavados) se colocaron en una caja de Petri estéril conteniendo en el fondo dos capas de papel filtro previamente humedecidos con agua destilada estéril. Utilizando un pincel para raspar se realizó una ligera punción en la hoja, donde se depositaron 20 µl de filtrado a diferentes concentraciones (25, 50, 100 µg/mL); como control se utilizaron medio sin inocular y agua destilada estéril. Se utilizaron tres discos por tratamiento y las inoculaciones fueron realizadas en la cara adaxial o abaxial. Las cajas Petri se mantuvieron bajo condiciones de temperatura ambiente y luz natural y los efectos se observaron a las 72 horas después del tratamiento.

#### **3.4.2. BIOENSAYO DE FUGA DE ELECTROLITOS.**

Diez discos cortados de hojas de perejil de 8 mm de diámetro (previamente lavados), se colocaron en un vial conteniendo solución de filtrado crudo (10 mg/mL), medio sin inocular y agua desionizada, como controles, respectivamente. Los discos se infiltraron al vacío por 30 minutos, se enjuagaron con cinco cambios de agua desionizada durante 20 minutos y se transfirieron a un vial limpio conteniendo 10 mL de agua desionizada. La conductividad (Conductímetro, Hi8733, HANNA instruments) del sobrenadante se determinó a diferentes tiempos.

### **3.4.3. BIOENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.**

Primeramente, las células de un cultivo en suspensión se dejaron sedimentar en tubos Falcon estériles y se centrifugaron (2X) a 3000 rpm durante 10 min, hasta tener un paquete celular de aproximadamente 5 mL. A este paquete celular se le agregaron 40 mL de medio de cultivo nuevo (B5-Gamborgs) y de la suspensión resultante, en el día 0 del crecimiento celular, se tomó 1 mL que se combinó con 9 mL de medio de cultivo nuevo en un matraz de 50 mL. En el día 7 del crecimiento celular, se inocularon los filtrados liofilizados (1 mg/mL) y en el día 13 del crecimiento celular, se llevó a cabo la evaluación de la actividad fitotóxica a nivel celular, evaluando el porcentaje de viabilidad celular por medio del ensayo de Azul de Evans. Como control se utilizó una fracción con una muerte celular completa (calentamiento de células a 72°C durante 1 hora). Los porcentajes de viabilidad se calcularon al comparar la viabilidad encontrada en las células tratadas con respecto a la viabilidad de las células muertas por calor.

### 3.5. RESULTADOS

#### 3.5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FITOTÓXICA EN HOJA (BIOENSAYO DE GOTA)

Los filtrados de cultivo en medio jugo V8, Zanahoria y Czapek-Dox, preparados con agua destilada o infusión de perejil, se liofilizaron y se prepararon a diferentes concentraciones (25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) para evaluar su actividad fitotóxica mediante el bioensayo de gota en hojas de perejil (*Petroselinum crispum*). La actividad fitotóxica de los filtrados se determinó con base al grado de clorosis, marchitamiento de las hojas o necrosis, observado en las hojas de perejil (Figura 3.1).

Daño en la hoja	Actividad	Síntomas
	(++++) Máxima	La lesión es muy agresiva, observándose clorosis, necrosis y marchitamiento en un 80-95%.
	(+++) Alta	El daño necrótico presente en la hoja es agresivo abarcando de un 50 a un 65%.
	(++) Moderada	El daño clorótico y necrótico es evidente, abarcando de un 25 a 50% de la superficie.
	(+) Débil	La lesión es ligera, observándose clorosis en un 10 a 20% de la superficie de la hoja.
	(-) Sin actividad	No se observa ningún síntoma, la hoja se observa sana.

**Figura 3. 1.** Clasificación de la actividad fitotóxica observada en hojas de perejil tratadas con filtrados de *Alternaria dauci* en el bioensayo de gota. Máxima fitotoxicidad (++++), altamente fitotóxico (+++), fitotóxico moderadamente (++), fitotóxico débilmente (+), no fitotóxico (-)

El análisis de resultados en la evaluación de la actividad fitotóxica en el bioensayo de gota mostró que los filtrados de los cultivos en medio jugo V8 preparados con agua destilada presentan una actividad altamente fitotóxica a partir de los 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , es decir, a medida que aumenta la concentración aumenta la actividad. Por otra parte, en los filtrados de los cultivos en medio jugo V8 preparados con infusión de perejil se observó que a medida que aumentó el tiempo aumentó la actividad, particularmente a las 96 h a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Para los filtrados de los cultivos en medio jugo de zanahoria preparados con agua destilada presentan una actividad baja a moderada, la actividad es similar a las 48 h y 96 h para 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , es decir, la actividad depende de la concentración pero no del tiempo. Por su parte, en los filtrados de los cultivos en medio jugo de zanahoria preparados con infusión de perejil se observa que la actividad aumenta con la concentración y con el tiempo de cultivo, observándose una actividad máxima a las 96 h con 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla 3.1).

Finalmente, los filtrados de los cultivos en medio Czapek-Dox preparados con agua destilada mostraron una actividad baja, que no depende del tiempo ni de la concentración. En cambio, para los filtrados de los cultivos en medio Czapek-Dox preparados con infusión de perejil la actividad es buena pues depende de la concentración pero no del tiempo (Tabla 3.1).



**Tabla 3. 1.** Actividad fitotóxica de los filtrados obtenidos de diferentes cultivos de *A. dauci* en hojas de perejil.

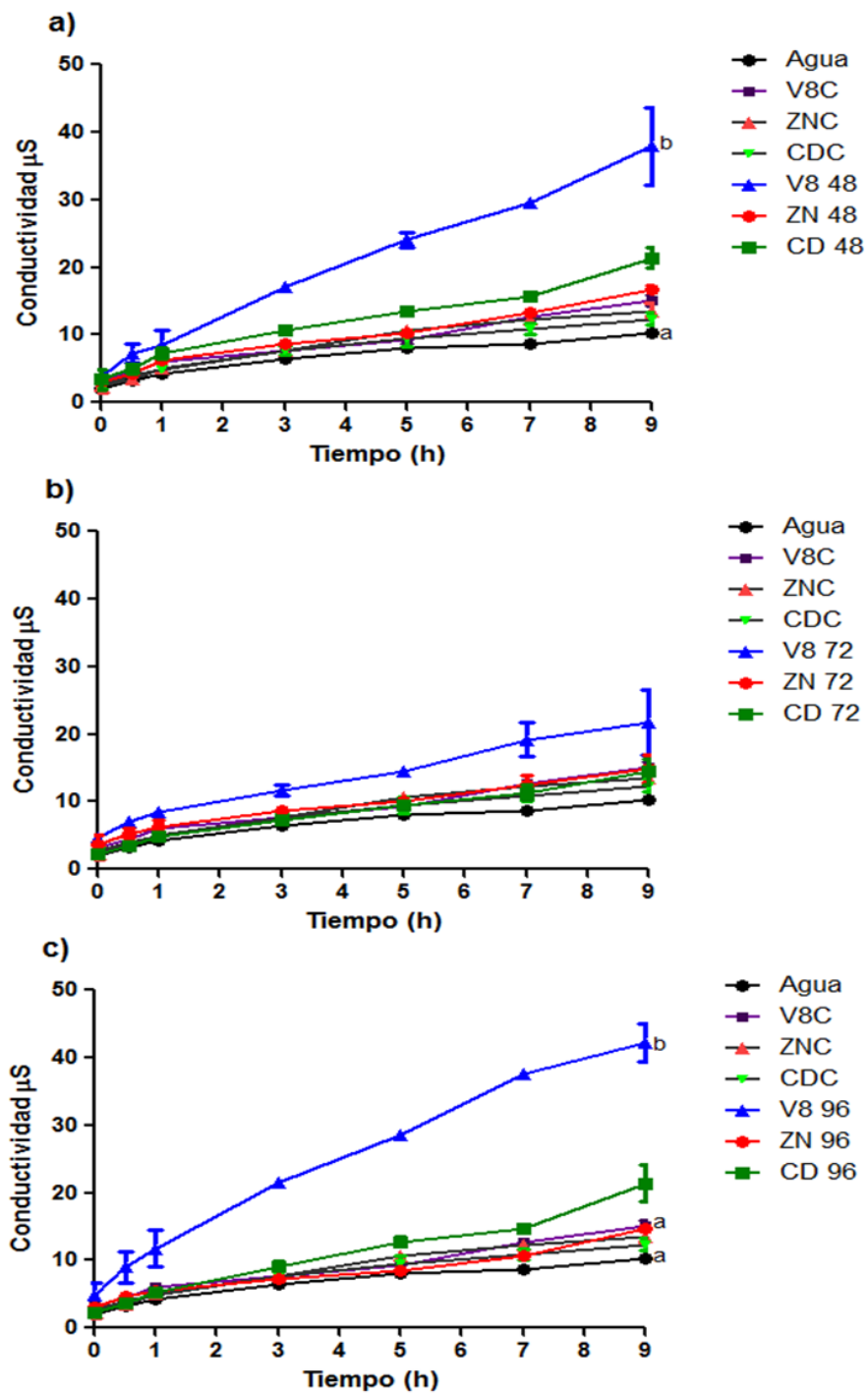
Medios de cultivo SIN infusión de perejil									
Concentración	V8			ZN			CD		
	48	72	96	48	72	96	48	72	96
100 µg/mL	+++	+++	++++	++	+	++	++	+	+
50 µg/mL	+++	+++	+++	++	+	++	+	+	+
25 µg/mL	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Control*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio de cultivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medios de cultivo CON infusión de perejil									
Concentración	V8			ZN			CD		
	48	72	96	48	72	96	48	72	96
100 µg/mL	++	++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++
50 µg/mL	+	+	+++	+++	+++	++++	++	++	++
25 µg/mL	+	+	+	+++	+++	++++	++	+	+
Control*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio de cultivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los experimentos se realizaron por triplicado con 3 hojas replicas para cada fracción fitotóxica y cada concentración, los resultados fueron similares en ambas repeticiones. Control\*: agua destilada estéril, Máxima fitotoxicidad (++++), altamente fitotóxico (+++), fitotóxico moderadamente (++), fitotóxico débilmente (+), no fitotóxico (-)

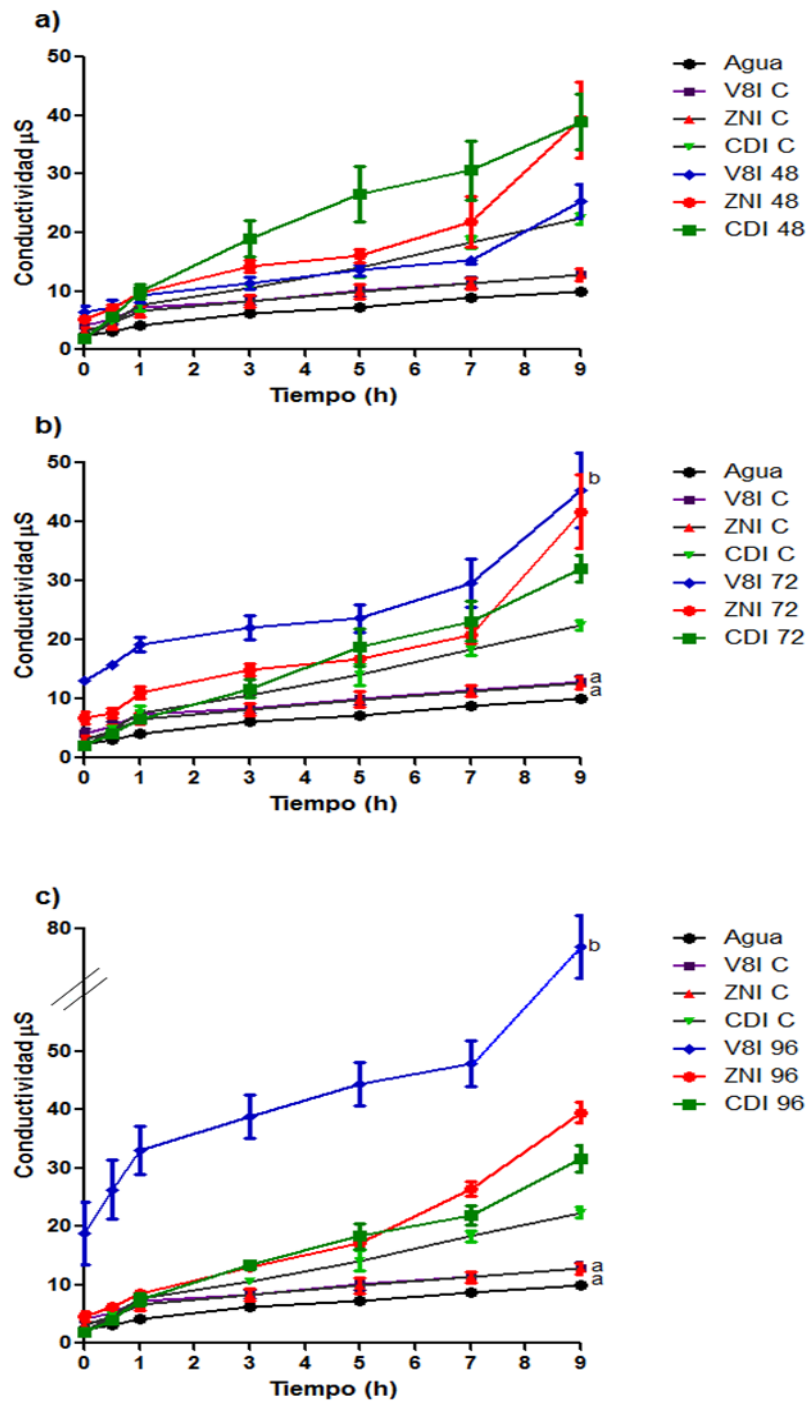
### 3.5.2. EVALUACIÓN DEL DAÑO A LA MEMBRANA CELULAR (BIOENSAYO DE FUGA DE ELECTROLITOS)

Para conocer el efecto de los diferentes filtrados de *A. dauci* sobre la integridad de la membrana celular, se utilizó el bioensayo de fuga de electrolitos que mide la pérdida de electrolitos ( $\mu\text{S}$ ), desde un tiempo 0 hasta un tiempo de 9 h, en discos de hojas de perejil (*P. crispum*).

Los resultados mostraron actividad fitotóxica únicamente en los filtrados de los cultivos en medio de jugo V8, tanto en los preparados con agua destilada, como en los preparados con la infusión de perejil. Los primeros, cultivados durante 48 y 96 h, causaron una fuga máxima y constante hasta las 96 horas, en tanto que los cultivos de 72 h no mostraron una actividad fitotóxica significativa (Fig. 3.2). Por otra parte, de los filtrados de cultivo preparados con infusión de perejil, únicamente los de 72 y 96 h mostraron una pérdida significativa y constante de electrolitos (Fig 3.3).



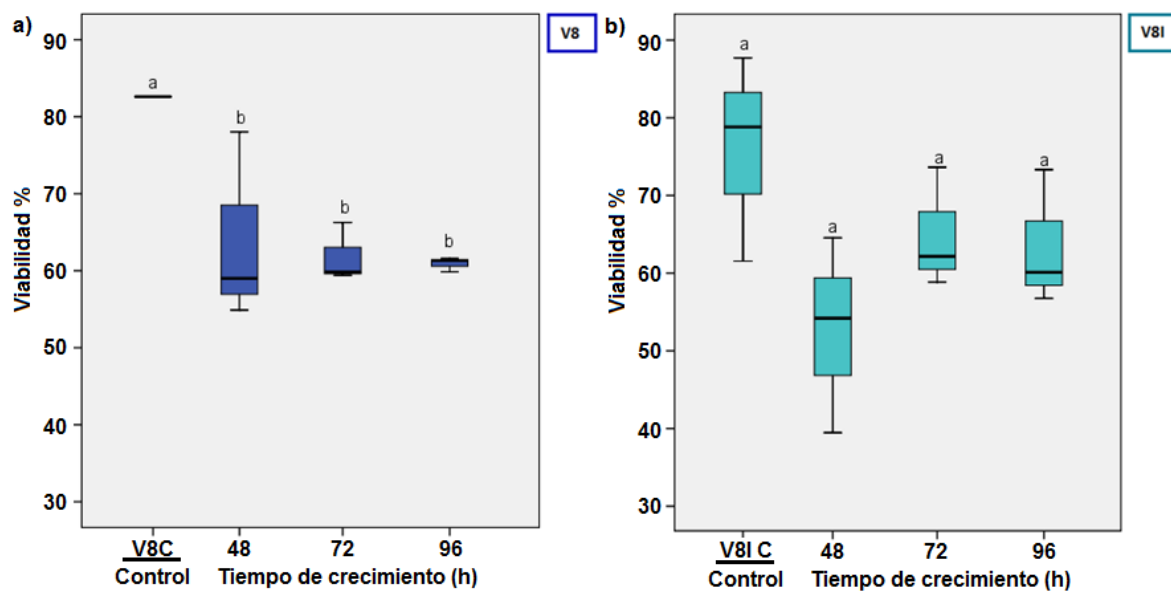
**Figura 3. 2.** Daño de la membrana celular provocado por filtrados de *A. dauci* en medio a) V8, Zanahoria y Czapek-Dox sin infusión de perejil a las 48 h. b) 72 y c) 96 h. Cada experimento fue realizado por triplicado,  $\pm$  SD. Las líneas de conectividad con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 3. 3.** Daño de la membrana celular provocado por filtrados de *A. dauci* en medio a) V8, Zanahoria y Czapek-dox con infusión de perejil a las 48 h. b) 72 y c) 96 h. Cada experimento fue realizado por triplicado,  $\pm$  SD. Las líneas de conectividad con letras diferentes representan diferencias significativas. ( $P \leq 0.05$ )

### 3.5.3. BIOENSAYO DE VIABILIDAD (CULTIVOS DE CÉLULAS DE TALLO DE ZANAHORIA EN SUSPENSIÓN)

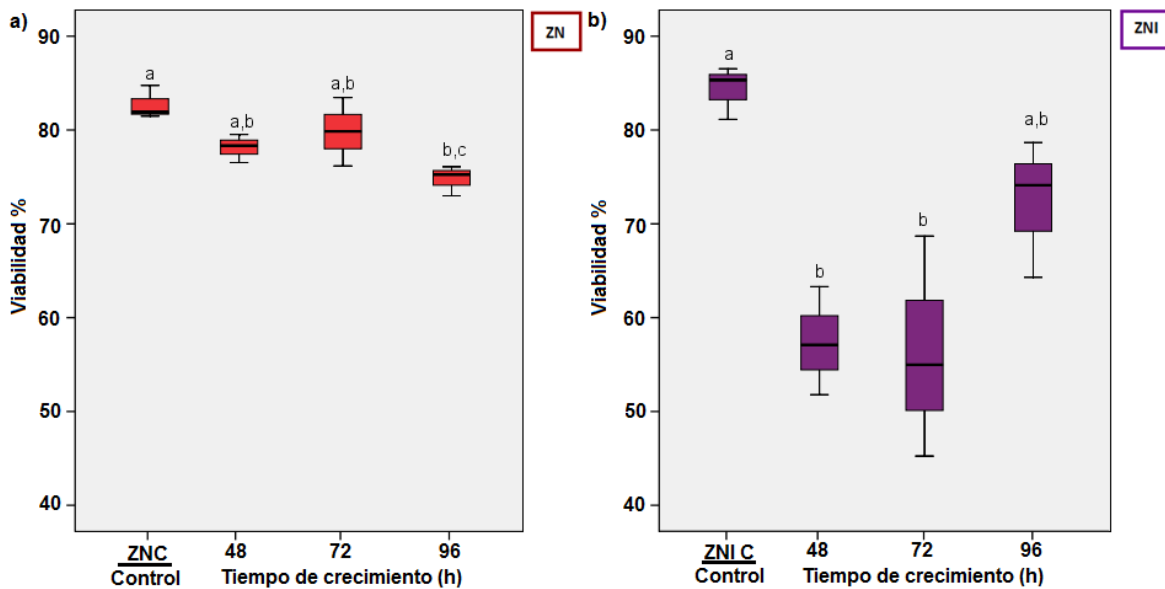
El análisis de los resultados de la evaluación de los diferentes filtrados de cultivo sobre la viabilidad de los cultivos celulares de tallo de zanahoria en suspensión mostró que, para el caso de los filtrados de cultivo de *A. dauci* en medio jugo V8 preparado con agua destilada, la actividad fitotóxica es moderada (ca. 60% de viabilidad vs 80% de viabilidad en el control) y se mantiene constante a los diferentes tiempos de cultivo del fitopatógeno; por el contrario, el uso de la infusión de perejil para preparar el medio jugo V8 produce un filtrado de cultivo que causa una reducción en la viabilidad celular similar a la del control (Fig. 3.4).



**Figura 3. 4.** Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los filtrados liofilizados de *A. dauci* en medio jugo V8 a) sin y b) con infusión de perejil. Promedio de 3 experimentos independientes,  $\pm$  SD, ( $P \leq 0.05$ ).

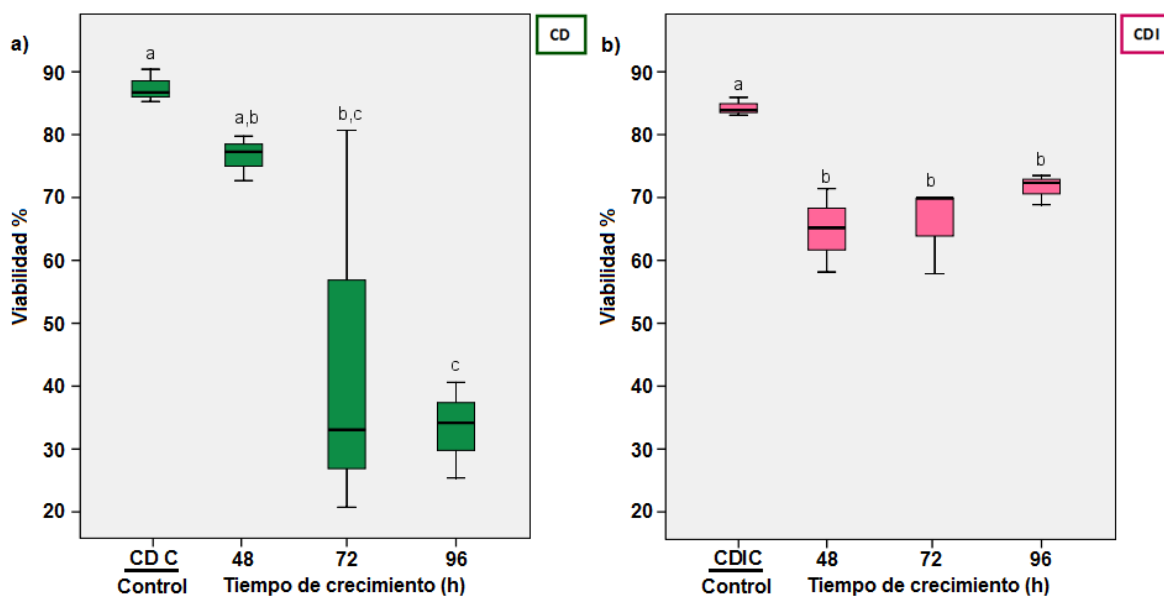
Por otra parte, los resultados de la evaluación de los filtrados de *A. dauci* en medio jugo de zanahoria preparado con agua destilada mostraron que su actividad fitotóxica es baja (ca. 75% vs 82% del control), aun a las 96 h de cultivo.

Por el contrario, el medio jugo de zanahoria con infusión de perejil dio como resultado un filtrado de cultivo con una actividad fitotóxica importante (ca. 55% de viabilidad vs 85% del control) que se mantuvo en su nivel máximo desde las 48 y hasta las 72 h de cultivo (Fig. 3.5).



**Figura 3. 5** Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los filtrados liofilizados de *A. dauci* en medio jugo de zanahoria a) sin y b) con infusión de perejil. Promedio de 3 experimentos independientes,  $\pm$  SD, ( $P \leq 0.05$ ).

Finalmente, los resultados de la evaluación de los filtrados de *A. dauci* cultivado en medio Czapek-Dox preparado con agua destilada, mostraron que el fitopatógeno produce una muy alta actividad fitotóxica (ca. 35% de viabilidad vs 85% del control) a las 96 h de cultivo, en tanto que la sustitución del agua por la infusión de perejil en la preparación del medio de cultivo resulta en la obtención de un filtrado de cultivo con una actividad fitotóxica significativamente menor (ca. 70% de viabilidad vs 85% del control) desde las 48 h de cultivo (Fig. 3.6)

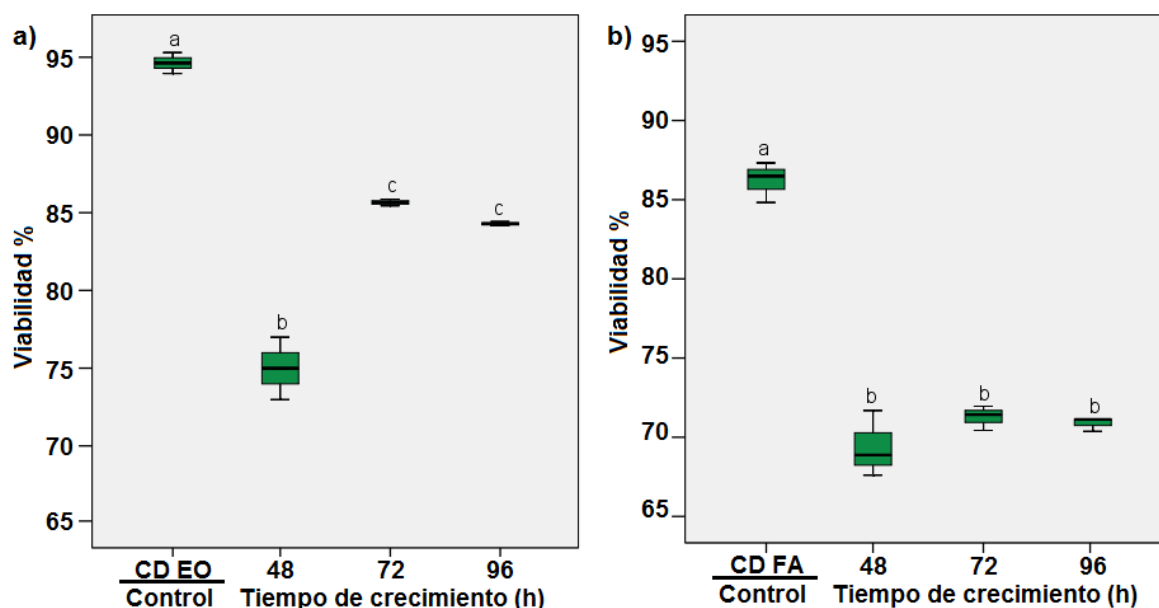


**Figura 3. 6** Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los filtrados liofilizados de *A. dauci* en medio Czapek-Dox a) sin y b) con infusión de perejil. Promedio de 3 experimentos independientes,  $\pm$  SD, ( $P \leq 0.05$ ).

Dado que los filtrados de los cultivos en CD mostraron la mayor actividad en el bioensayo de viabilidad celular y los filtrados de los cultivos del jugo V8 fueron los que mostraron la mayor actividad en el bioensayo de fuga de electrolitos y los segundos más activos en el bioensayo de gota, éstos se seleccionaron para establecer, de manera preliminar, la naturaleza química de el o los metabolitos fitotóxicos producidos por *A. dauci*. Para esto, cada uno de los filtrados fue extraído con AcOEt para obtener las correspondientes fracciones hidrofílica (fase acuosa; FA) y lipofílica (extracto orgánico; EO).

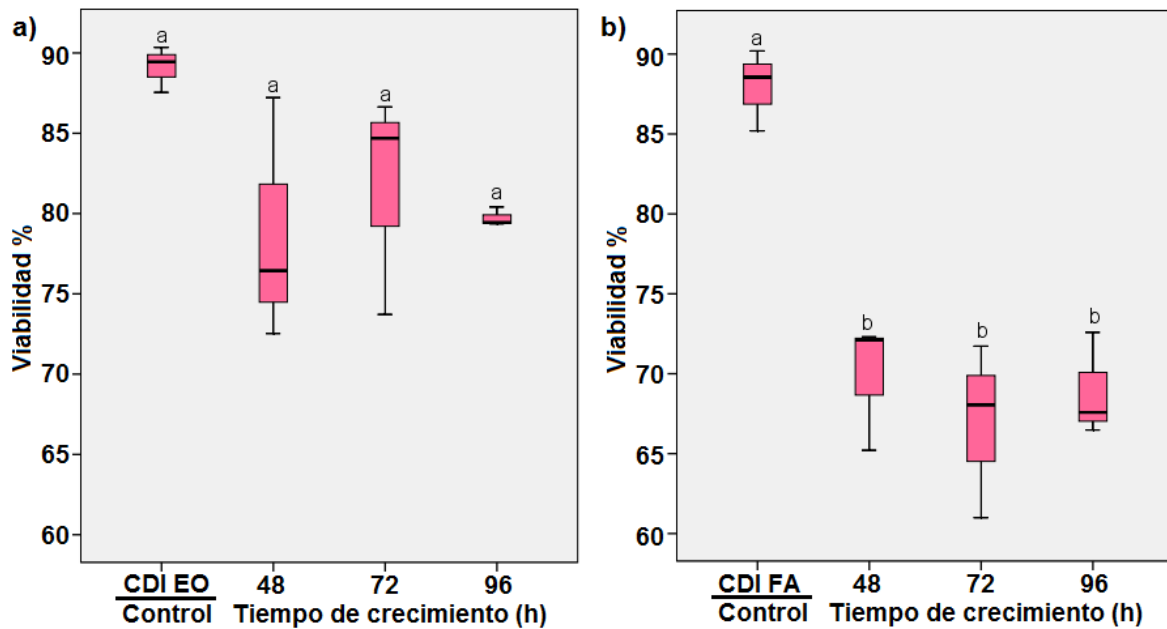
### 3.5.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PRELIMINAR DE LOS METABOLITOS FITOTÓXICOS DE *A. DAUCI* UTILIZANDO EL BIOENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La evaluación de las fracciones hidrofílica y lipofílica del cultivo de *A. dauci* en medio CD preparado con agua destilada mostró que, aun cuando el filtrado original mostró la mayor actividad fitotóxica en el bioensayo de viabilidad celular (ca. 35% vs 85% del control, Fig. 3.6), la actividad fitotóxica en cada una de las fracciones es menor a la del filtrado original, i.e. 85% vs 95% de la fracción lipofílica (Fig. 3.7a) y 70% vs 85% del control de la fracción hidrofílica (Fig. 3.7b).

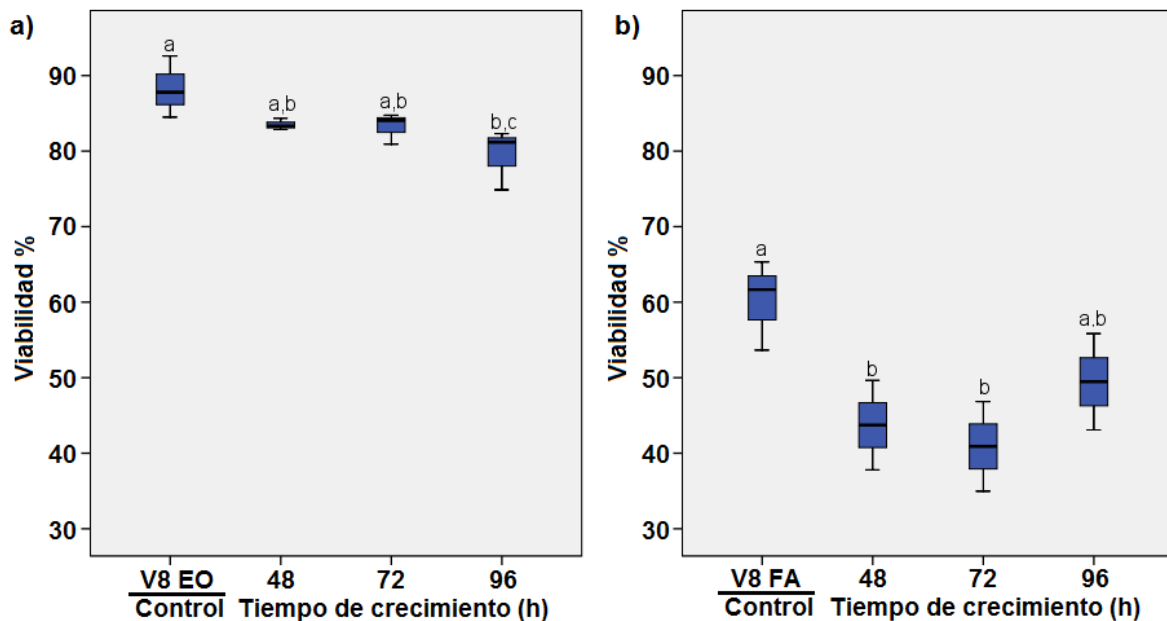


**Figura 3. 7.** Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los a) extractos orgánicos crudos y b) Fases acuosas de *A. dauci* en medio CD preparados con agua destilada. ( $3x, \pm SD, P \leq 0.05$ ).

De la misma forma, al evaluar las fracciones obtenidas del cultivo de *A. dauci* en medio CD preparado con infusión de perejil, el cual mostró una actividad fitotóxica baja en el ensayo de viabilidad celular (70% de viabilidad vs 85% del control; Fig 3.6), se encontró que, mientras la fracción lipofílica no mostró actividad fitotóxica significativa (Fig 3.8a), la fracción hidrofílica mostró una actividad baja (ca. 70% vs 85% del control, Fig. 3.8b), similar a la del filtrado original.



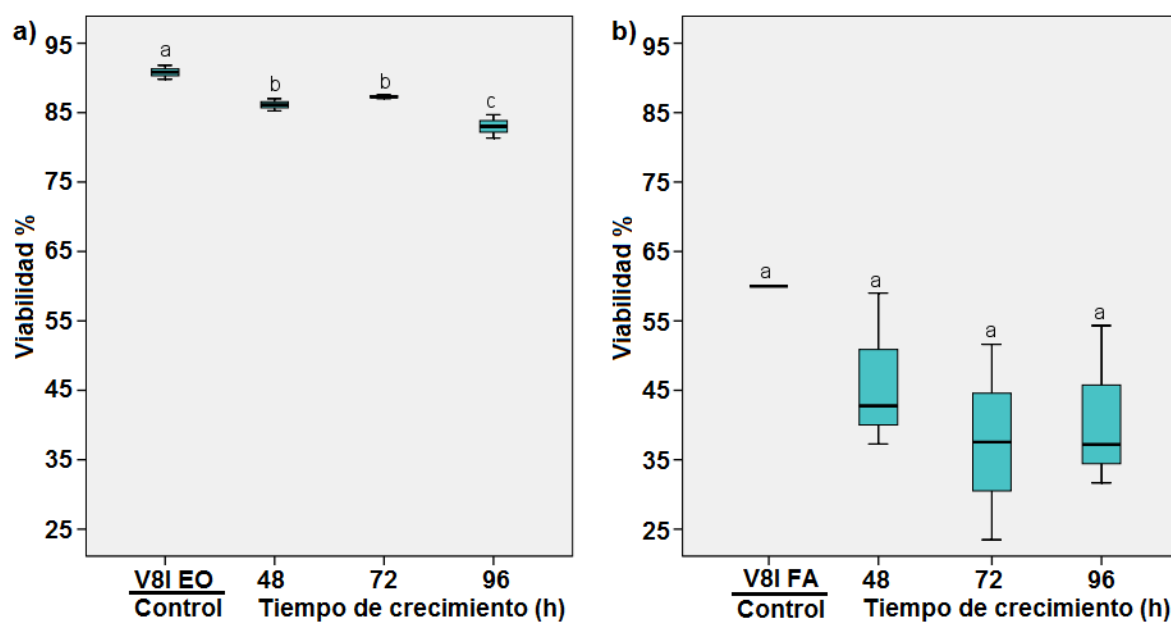
**Figura 3. 8** Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con a) extractos orgánicos crudos y b) Fases acuosas de *A. dauci* en medio CD con infusión de perejil. (Promedio de 3 experimentos independientes,  $\pm$  SD, ( $P \leq 0.05$ )).



**Figura 3. 9** Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los a) extractos orgánicos crudos de *A. dauci* y b) Fases acuosas en medio jugo V8 preparados con agua destilada. (Promedio de 3 experimentos independientes,  $\pm$  SD, ( $P \leq 0.05$ )).



Por otra parte, los resultados de la evaluación de las fracciones hidrofílica y lipofílica de los cultivos de *A. dauci* en medio de jugo V8 preparado con agua o con infusión mostraron que ninguna de las fracciones posee una actividad fitotóxica significativa (Figs. 3.9a y 3.9b y Figs. 3.10a y 3.10b).



**Figura 3. 10** Evaluación de la actividad fitotóxica expresada en cambios de viabilidad. Los cultivos celulares fueron incubados con los a) extractos orgánicos crudos y las b) fracciones acuosas de *A. dauci* en medio jugo V8 con infusión de perejil. (Promedio de 3 experimentos independientes,  $\pm$  SD,  $P \leq 0.05$ ).

---

### 3.6 DISCUSIÓN

El filtrado (conjunto total de metabolitos) del medio de cultivo Czapek-Dox preparado con agua destilada de *A. dauci* mostró la mayor actividad fitotóxica al ser evaluado en el bioensayo de viabilidad celular. Sin embargo, al separar los metabolitos de acuerdo a su naturaleza hidrofílica o lipofílica y evaluar el efecto fitotóxico de las fracciones resultantes en el bioensayo de viabilidad celular, no se observó el esperado aumento en la actividad fitotóxica de una o las dos fracciones. Este resultado sugiere que el efecto fitotóxico detectado en el filtrado original puede deberse a un efecto de sinergismo entre los metabolitos presentes en el filtrado y que éstos, al separarse, pierden la capacidad de causar una actividad fitotóxica marcada.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los filtrados del medio jugo V8, preparados tanto con agua destilada como con infusión de perejil, fueron los únicos que presentaron una actividad fitotóxica clara en el bioensayo de fuga de electrolitos. Cabe destacar que el incremento de la fuga de electrolitos en numerosas interacciones planta-patógeno se considera como “cambios en la permeabilidad de la membrana celular, reconocidos como una característica universal de la planta enferma”. Este cambio en la integridad de la membrana es uno de los primeros síntomas detectables del mecanismo de acción de los metabolitos fitotóxicos, e. g. la toxina victorina de *Cochliobolus victoriae* causa alteraciones en la permeabilidad celular una vez que establece contacto con las células huésped (Novacky, 1991). De la misma forma, la toxina HS (helminthosporósido), producida por *Helminthosporium sacchari*, interacciona directamente con la membrana plasmática de su hospedero y se ha reportado que la toxina AM tiene dos sitios de acción, la membrana plasmática y el cloroplasto (Tsuge *et al.* 2013). Adicionalmente, el bioensayo de fuga de electrolitos se ha utilizado también para correlacionar la estructura química con la actividad de diferentes fitotoxinas, incluyendo la destruxina B, la homodestruuxina B y la desmetildestruuxina B, producidas por *A. brassicae* (Pedras *et al.*, 2000).

Finalmente, aun cuando los filtrados del medio jugo de zanahoria preparado con infusión de perejil fueron los que presentaron mayor actividad en el bioensayo de gota, su sitio o mecanismo de acción se desconoce. En la literatura existen numerosos reportes sobre el uso del bioensayo de gota para la detección de actividad fitotóxica, particularmente para el caso de hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Alternaria*. Este bioensayo, realizado sobre la hoja del hospedero del patógeno, es un método de ensayo confiable, simple y reproducible que fue utilizado en las primeras investigaciones sobre la producción de zinniol por parte de *A. dauci* (Barash, 1981), y que ha sido utilizado también para detectar otras fitotoxinas tales como las toxinas AK, las toxinas AF y las toxinas ACT, producidas por diferentes especies de *Alternaria* spp. (Kohmoto *et al*, 1983; Otani *et al*. 1995) así como la detección de destruxina B en cultivos de *A. brassicae* (Pedras *et al.*, 2000).

### 3.7. CONCLUSIONES

Los resultados de la evaluación del tiempo de crecimiento en la producción de metabolitos fitotóxicos de *A. dauci* mostró que en general este parámetro no parece incidir de manera crítica en la actividad fitotóxica observada, con excepción de algunos casos al evaluarse en las diferentes técnicas de bioensayo en los que se observa una actividad muy particular, e.g. en el bioensayo de viabilidad celular los filtrados de *A. dauci* cultivados en medio CD preparado con agua destilada produce una actividad altamente fitotóxica a las 96 h de cultivo. De igual manera, la preparación del medio jugo de zanahoria con infusión de perejil dio como resultado un filtrado de cultivo con una actividad fitotóxica importante que se mantuvo en su nivel máximo a las primeras horas de cultivo (48 a 72 h) en el bioensayo de viabilidad celular. Por el contrario, la evaluación de la actividad fitotóxica en el bioensayo de gota mostró que los filtrados de los diferentes medios de cultivo preparados con agua destilada presentan una actividad fitotóxica similar en los diferentes tiempos, es decir, la actividad depende en la mayoría de los casos de la concentración pero no del tiempo.

Por otra parte, los resultados obtenidos mostraron que no existe una relación directa entre la producción de metabolitos secundarios lipofílicos y la cantidad de micelio generado por *A. dauci* en cada uno de los diferentes medios de cultivo. Sin embargo, es interesante mencionar que el mayor rendimiento de extracto orgánico obtenido a partir de filtrados de cultivo en medios preparados con agua destilada, correlaciona con la expresión de una mayor actividad fitotóxica, i.e. el medio CD, en el que se encontró la mayor actividad fitotóxica en el bioensayo de viabilidad celular resultó ser uno de los medios con mayor rendimiento de extracto orgánico crudo.

El uso de la incorporación de infusión de perejil para la preparación de los diferentes medios de cultivo no resultó en un aumento significativo en la producción de biomasa micelial ni en la actividad fitotóxica de los diferentes medios de cultivo. Estos resultados no coinciden con los reportados en la literatura y sugieren que, en este caso, la incorporación de la infusión de un hospedero al medio de cultivo no causa el esperado estímulo en la producción de biomasa y de fitotoxinas.

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad fitotóxica de los diferentes filtrados en cada uno de los bioensayos, sugieren que los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica detectada son diferentes en cada caso y que su producción depende de la naturaleza del medio de cultivo. Asimismo, estos resultados sugieren que la actividad fitotóxica detectada puede originarse como consecuencia de diferentes mecanismos o sitios de acción.

Finalmente, este trabajo constituye el primer reporte sobre la optimización de las condiciones de cultivo de *A. dauci*, para la futura producción y estudio de sus metabolitos fitotóxicos.



## CAPÍTULO IV

### IDENTIFICACIÓN Y NATURALEZA QUÍMICA DE LOS METABOLITOS FITOTÓXICOS PRODUCIDOS POR *ALTERNARIA DAUCI*

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Una vez que se sospecha que una fitotoxina está involucrada en la enfermedad de una planta, la subsecuente investigación depende de métodos confiables para la producción, separación, detección y purificación de los metabolitos fitotóxicos. No obstante, un perfil de metabolitos secundarios puede visualizarse usando métodos cromatográficos, tales como cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía de Gases (CG) o cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) (Cruz, 2009). La Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC) es la técnica de separación más comúnmente utilizada, dado que permite purificaciones bajo condiciones de alta presión y con mayor resolución y a diferencia de la Cromatografía de Gases, a menudo las muestras no requieren de un proceso de derivatización antes de ser analizadas. Por otra parte, la combinación de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas (LC-MS) da como resultado una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad, que proporciona datos cualitativos y cuantitativos (Prelle, *et al.*, 2013; Di Mavungu, *et al.*, 2009; Scott, *et al.*, 1997).

El análisis de perfiles metabólicos ha sido usado para la diferenciación entre especies en géneros tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Xylariaceae*; asimismo, los perfiles de metabolitos secundarios también han demostrado ser útiles para diferenciar especies del género *Alternaria* (Andersen *et al.*, 2001).

Los extractos de *Alternaria dauci* son mezclas complejas que contienen un gran número de constituyentes químicos que dificultan el aislamiento y la detección de cada componente, por lo que es necesario el uso de técnicas y/o métodos adecuados para separación e identificación de los diferentes componentes (Loescher *et al.*, 2014)

Dado que el rendimiento más alto de extracto orgánico se obtuvo al cultivar el fitopatógeno en medio Czapek-Dox preparado con agua, y que éste a su vez resultó ser el medio con mayor actividad fitotóxica al evaluar los filtrados crudos en el bioensayo de viabilidad con células en suspensión de zanahoria, el objetivo de este capítulo consistió en llevar a cabo el análisis por HPLC y LC-MS de los extractos orgánicos crudos de diferentes cultivos de *A. dauci*.



## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. CLAR-UV

El análisis por CLAR-UV se realizó en el Departamento de Farmacia de la Universidad de Angers, (Angers, Francia) por el Prof. Pascal Richomme. Los análisis fueron llevados a cabo en un equipo Waters 2695, equipado con una bomba cuaternaria y un detector de fotodiodos en serie (Waters 2995) (Fig. 4.1), utilizando una columna Uptispher (C18) (150 mm x 4,6 m, 5 mm), una velocidad de flujo de 0,7 ml/min y un volumen de inyección fue 10-20 ml. Los extractos se analizaron con la siguiente fase móvil: solvente **A**, H<sub>2</sub>O y solvente **B**, MEOH. El gradiente de elución fue 0-25 min, 90% **A** y 10% **B**; 25-30 min, 100% **B**; 31-35 min, 90% **A** y 10% **B**. La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 210 a 600 nm.

### 4.2.2. LC-ESI-MS

El análisis por LC-MS se realizó en el Departamento de Farmacia de la Universidad de Angers, (Angers, Francia) por el Prof. Pascal Richomme. Los extractos orgánicos seleccionados fueron examinados por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-ESI-MS, por sus siglas en inglés). El sistema LC-MS usado consiste de un LC Waters 2695, conectado a un detector de trampa iónica (Esquire 3000 PLUS Bruker) de ionización electro spray (ESI). Los análisis se realizaron utilizando una columna analítica Uptispher (C18) (150 mm x 4,6 m, 5 mm), una velocidad de flujo de 0,7 ml/min, un volumen de inyección de 10 ml y las siguientes condiciones de elución: solvente **A**, MEOH y solvente **B**, H<sub>2</sub>O. Gradiente de elución: 0-25 min, 10% **A** y 90% **B**; 25-30 min, 100% **A**; 31-35 min, 10% **A** y 90% **B**. El rango m/z de ESI-MS fue 100-1000.

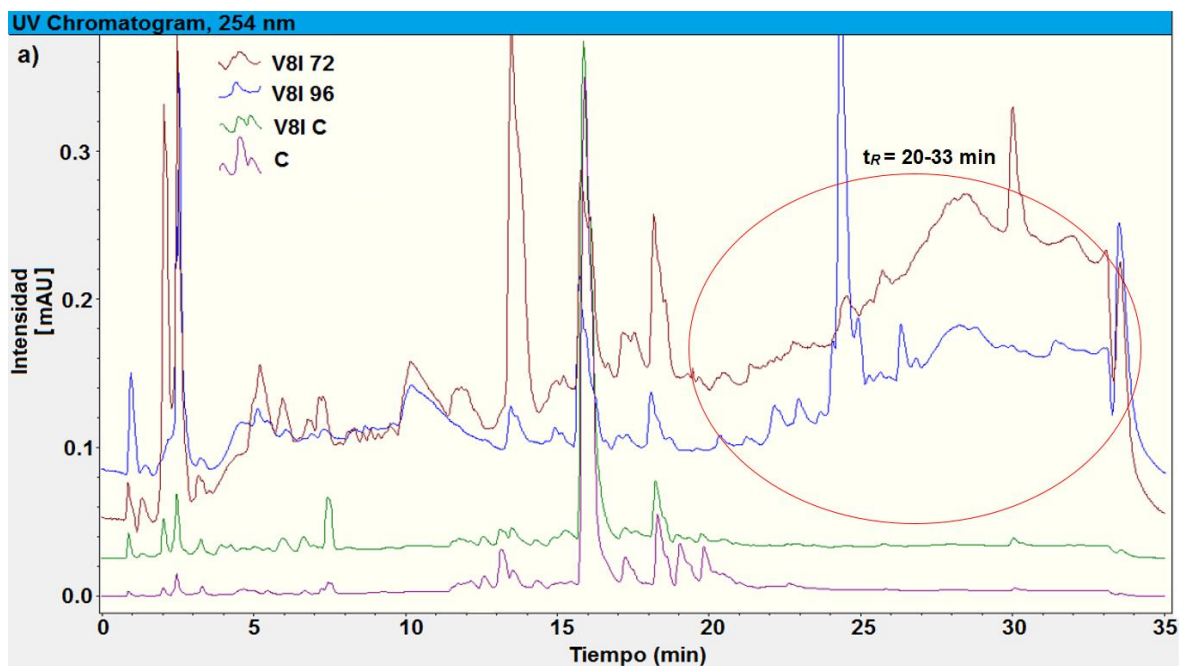


**Figura 4. 1.** Equipo HPLC Waters 2695<sup>®</sup> acoplado a un detector de fotodiodos en serie (PDA) Waters 2995<sup>®</sup>

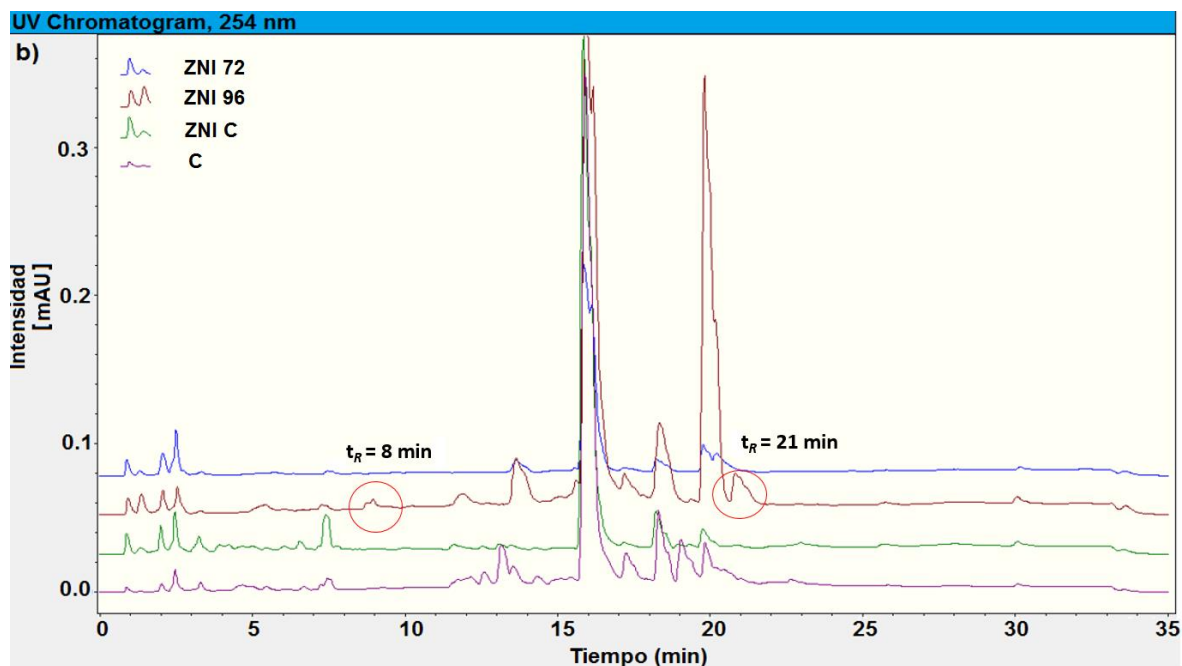
### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

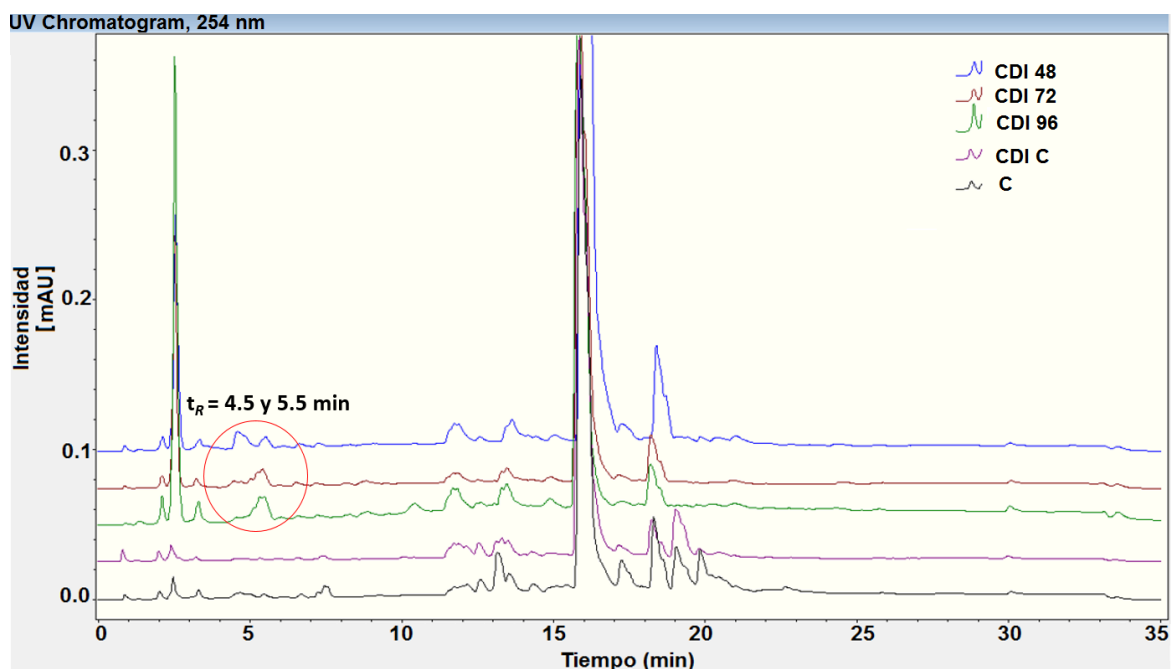
La determinación de los perfiles cromatográficos por CLAR de los diferentes extractos orgánicos crudos permitió la identificación preliminar de los principales componentes en los extractos de los diferentes cultivos, encontrándose diferencias importantes entre los perfiles de los extractos y sus respectivos controles, que podrían sugerir la presencia de componentes implicados en la fitotoxicidad de *A. dauci*. Los principales componentes no pertenecientes a los perfiles de control ( $t_R = 20-33$  min; Fig. 4.2) se ubicaron en los extractos orgánicos de cultivos de *A. dauci* en medio jugo V8 preparado con infusión de perejil, en los extractos de los cultivos en medio jugo de zanahoria preparado con infusión de perejil ( $t_R = 8$  y 21 min, Fig 4.3), en los extractos orgánicos crudos de cultivos de *A. dauci* en medio Czapek-Dox preparado con infusión de perejil ( $t_R = 4.5$  y 5.5 min, Fig. 4.4) y en los extractos de los cultivos en medio de jugo de zanahoria preparado con agua ( $t_R = 16$  y 17 min, Fig. 4.5).



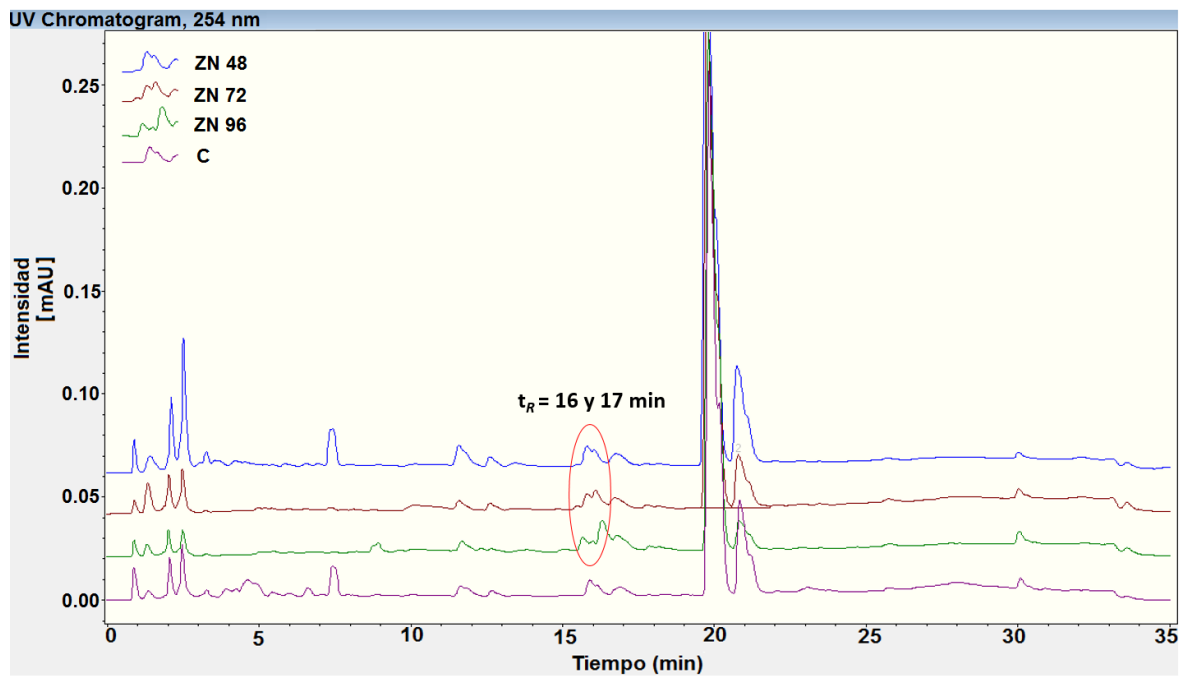
**Figura 4. 2.** Perfil cromatográfico por HPLC de extractos orgánicos de *A. dauci* crecido en medio jugo V8I a las 72 y 96 h con sus respectivos controles.



**Figura 4. 3** Perfil cromatográfico por HPLC de extractos orgánicos de *A. dauci* crecido en medio jugo de ZNI a las 72 y 96 h con sus respectivos controles.



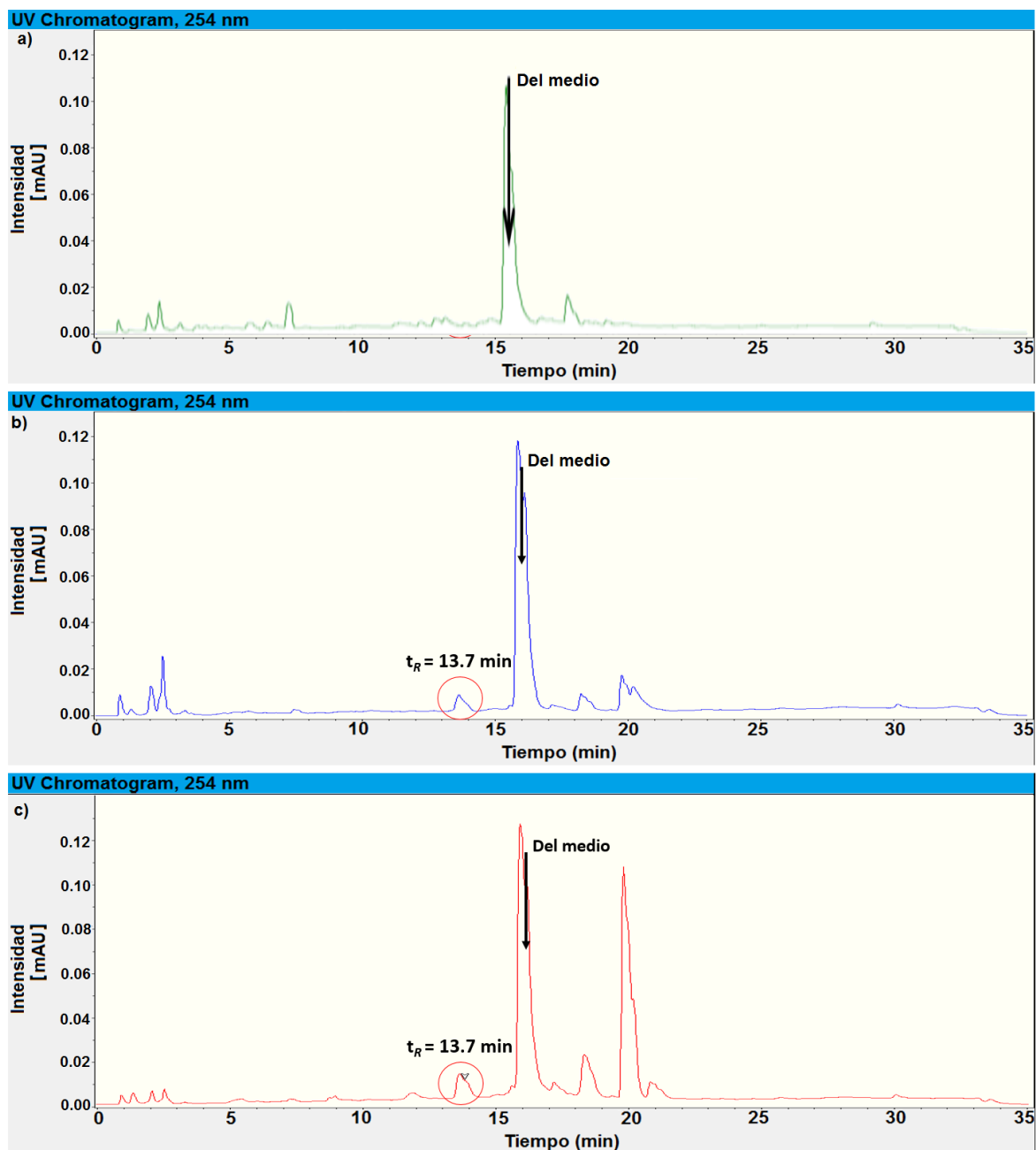
**Figura 4. 4** Perfil cromatográfico por HPLC de extractos orgánicos de *A. dauci* crecido en medio CDI a las 48, 72 y 96 h con sus respectivos controles.



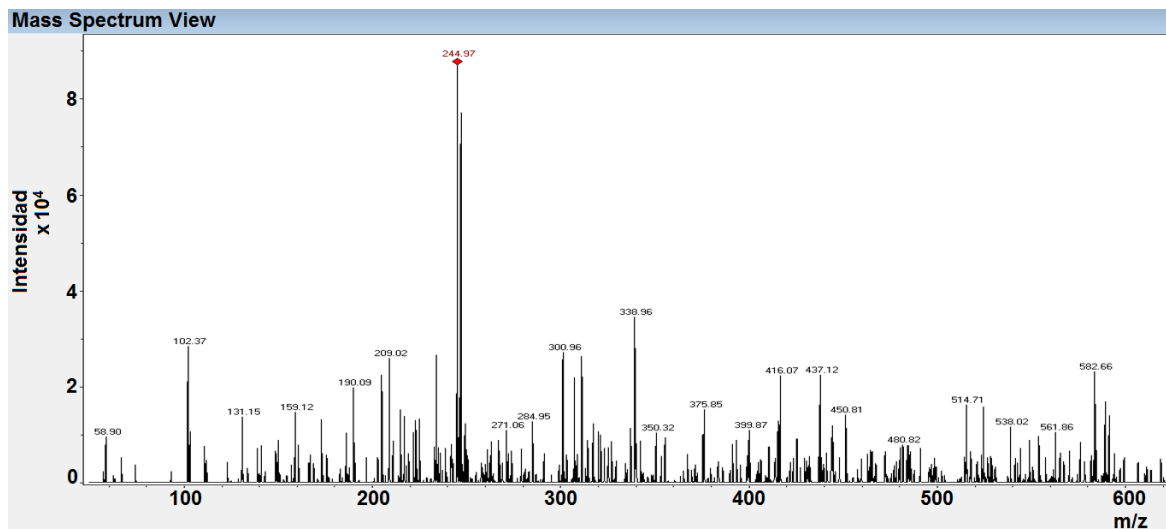
**Figura 4. 5** Perfil cromatográfico por HPLC de extractos orgánicos de *A. dauci* crecido en medio medio jugo de ZN a las 48, 72 y 96 h con sus respectivos controles.

#### **4.3.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-ESI-MS)**

Se observaron picos diferentes a los controles en el análisis por CLAR en los diferentes extractos orgánicos. Sin embargo, el perfil cromatográfico por LC-MS del extracto orgánico del medio jugo de zanahoria preparado con infusión de perejil mostró la presencia de un componente a  $t_R = 13.77$  min, que no se observa en el perfil del correspondiente medio de cultivo control (Fig. 4.6b-4.6c). El patrón de fragmentación mostró un ion molecular protonado  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  245 uma (Fig. 4.7).



**Figura 4. 6** Perfiles cromatográficos por HPLC (LC2695 Waters®) acoplado a un espectrómetro de masas (Bruker®). a) Perfil cromatográfico del extracto orgánico del medio jugo de zanahoria con infusión de perejil. Se indica el tiempo de retención correspondiente a un componente en común de los diferentes extractos b) perfil cromatográfico del extracto orgánico de *A. dauci* en medio jugo de ZNI-72 c) perfil cromatográfico del extracto orgánico de *A. dauci* en medio ZN-96I



**Figura 4. 7** El espectro de masas del componente a  $t_R$  13.7 min del extracto orgánico ZN-72I muestra un ion molecular protonado  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  245 uma, correspondiente a un peso molecular neutro de 223 uma. Detección de electro spray positivo MS (ESI-MS)



#### 4.4. DISCUSIÓN

Tomando en cuenta la importancia de las fitotoxinas como factores de virulencia durante el proceso infeccioso, y que su aislamiento, identificación y caracterización contribuye al conocimiento de la interacción planta-patógeno, el objetivo de este capítulo consistió en llevar a cabo el análisis por HPLC y LC-MS de los extractos orgánicos crudos de diferentes cultivos de *A. dauci* crecidos en diferentes medios de cultivo; para esto se compararon los perfiles cromatográficos por CLAR y LC-MS de los diferentes extractos orgánicos, observándose la presencia de un componente particular en el perfil cromatográfico por LC-MS del extracto orgánico del medio jugo de zanahoria preparado con infusión de perejil. El peso molecular impar de 223 uma de este componente principal sugiere la incorporación de, al menos, un átomo de nitrógeno a su estructura.

#### 4.5. CONCLUSIÓN

Se encontraron diferencias importantes entre los perfiles de los extractos orgánicos crudos y sus respectivos controles al analizar los perfiles cromatográficos por CLAR y por LC-MS, pues permitió la identificación preliminar de los principales componentes en los extractos de los diferentes cultivos de *A. dauci*, que podrían sugerir o no la presencia de componentes implicados en la fitotoxicidad de *A. dauci*.

Estos análisis sugieren una vez más, que el hongo produce diferentes metabolitos secundarios que son detectados en cada uno de los perfiles cromatográficos de los diferentes extractos orgánicos crudos y que su producción depende de la naturaleza del medio de cultivo.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1. CONCLUSIONES GENERALES

La producción de micelio mostró que no existe una relación directa en cuanto a la producción de metabolitos lipofílicos, pues el rendimiento más alto de extracto orgánico se obtuvo al cultivar el fitopatógeno en medio Czapek-Dox que a su vez el crecimiento del microorganismo es pobre en este medio. Sin embargo, resulta ser el medio con mayor actividad fitotóxica al evaluar los filtrados crudos en el bioensayo de viabilidad con células en suspensión de zanahoria.

Aunque los cultivos en medio jugo V8 producen la mayor cantidad de biomasa de *Alternaria dauci* en un corto periodo de tiempo, no poseen una actividad fitotóxica marcada a nivel celular, por lo que no constituye un medio adecuado para la producción de metabolitos fitotóxicos de *A. dauci*.

Por otra parte, la incorporación de infusión de perejil no resultó del todo en un aumento significativo en la producción de biomasa micelial ni en la estimulación en la producción de fitotoxinas, con excepción de los filtrados del medio jugo de zanahoria al evaluarse en el bioensayo de gota en los que se observa una actividad fitotóxica particularmente alta, por lo que es posible proponer que la incorporación de infusión de un hospedero del medio de cultivo no provee del todo un estímulo para la producción de biomasa y además la producción de fitotoxinas.

Los resultados de la evaluación del tiempo de crecimiento en la producción de metabolitos fitotóxicos de *A. dauci* mostró que en general este parámetro no parece incidir de manera crítica en la actividad fitotóxica observada en los diferentes bioensayos.

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad fitotóxica de los diferentes filtrados en cada uno de los bioensayos, sugieren que los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica detectada son diferentes en cada caso y que su producción depende de la naturaleza del medio de cultivo. Esto se confirma con el análisis por CLAR y por LC-MS donde se encontraron diferencias importantes entre los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos crudos y sus respectivos controles.

Asimismo, estos resultados sugieren que la actividad fitotóxica detectada puede originarse como consecuencia de diferentes mecanismos o sitios de acción. Esta nueva perspectiva considera la importancia de evaluar al conjunto de los diferentes metabolitos producidos por el fitopatógeno, como un grupo de componentes implicados en los procesos de patogénesis.

Finalmente, este trabajo constituye el primer reporte sobre la optimización de las condiciones de cultivo de *A. dauci*, para la futura producción, identificación y estudio de sus metabolitos fitotóxicos implicados en los procesos de patogénesis.

## 5.2. PERSPECTIVAS

La detección de probables metabolitos secundarios de *Alternaria dauci* a partir de su naturaleza química evaluando la actividad fitotóxica en células en suspensión de zanahoria permite proponer algunos puntos que servirán de base para estudios posteriores.

Se propone escalar la producción de fitotoxinas mediante cultivo masivo de *A. dauci* en las condiciones de cultivo óptimas reportadas en el presente trabajo; con el propósito de aislar e identificar los metabolitos fitotóxicos producidos por el hongo, de ser posible también realizar estudios de estructura-actividad y además, determinar los mecanismos de fitotoxicidad que se desencadenan en sus hospederos una vez que las fitotoxinas de *A. dauci* se encuentran en contacto con las células vegetales.

Adicionalmente, los filtrados crudos reportados como responsables de actividad fitotóxica pueden ser purificados e identificados, con el fin de reconocer los metabolitos que ya han sido reportados en otras especies de *Alternaria* o proponer la participación de nuevos metabolitos fitotóxicos en la interacción *Alternaria dauci-Daucus carota*.

Los filtrados que presentan actividad fitotóxica pueden ser empleados como herramientas de selección *in vitro* de líneas celulares de *D. carota* resistentes a la infección por este fitopatógeno, o para ensayos de inducción de tolerancia utilizando suspensiones celulares o callos de *D. carota*.

A largo plazo, teniendo la disposición y el conocimiento de las fitotoxinas secretadas *in vitro* de *A. dauci*, se podrían determinar el rol y el mecanismo de acción de las mismas en el desarrollo de los síntomas característicos responsables del “tizón foliar”.



---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Agrios, G. (2005). Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokio, pp. 175-248.
- Andersen, B., Kroger, E., y R. Roberts (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research, 3, 291–299.
- Asai, T., Stone, J., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., J. Sheen y F. Ausubel (2000). Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplast requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. The Plant Cell, 12, 1823-1835.
- Ávila, Z., Mello, S., Ribeiro, Z., y E Fontes (2000). Production of *Alternaria cassiae* inoculum. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35, 533-541.
- Barash, I., Mor, H., Netzer, D., y Y. Kashman (1981). Production of zinniol by *Alternaria dauci* and its phytotoxic effect on carrot. Physiological Plant Pathology, 19, 7-16.
- Berger, S., Sinha, A., y T. Roitsch (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. Journal of Experimental Botany, 58, 4019-4026.
- Boedo, C., Benichou, S., Berruyer, R., Bersihand, S., Dongo, A., Simoneau, P., Lecomte, M., Briard, M., V. Le Clerc y P. Poupard (2012). Evaluating aggressiveness and host range of *Alternaria dauci* in a controlled environment. Plant Pathology, 61, 63-75.
- Boedo, C., Berruyer, R., Lecomte, M., Bersihand, S., Briard, M., Le Clerc, V., P. Simoneau y P. Pascal (2010). Evaluation of different methods for the characterization of carrot resistance to the alternaria leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*) revealed two qualitatively different resistances. Plant Pathology, 59, 368-375.

- Boedo, C., Le Clerc, V., Briard, M., Simoneau, P., Chevalier, M., S. Georgeault y P. Pascal (2008). Impact of carrot resistance on development of the *Alternaria* leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*). *Plant Pathology*, 121, 55-66.
- Bundale, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T. y A. Upadhyay (2015) Optimization of Culture Conditions for Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces* spp. Isolated from Soil. *Advances in Microbiology*, 5, 441-451
- Colmenares, A.J., Aleu, J., Durán-Patrón, R., Gollardo, I.G. y R. Hernandez-Galán (2002). The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinérea*. *Journal of Chemical Ecology*, 28(5), 997-1005.
- Cotty, P. y J. Misaghi (1984). Zinniol production by *Alternaria* species. *Phytopathology*, 74, 785-788.
- Cruz, C. A (2009). Aislamiento e identificación de fitotoxinas hidrofílicas producidas por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 99 p.
- Díaz Dellavalle, P., Cabrera, A., Alem, S., Larrañaga, P., Ferreira, F., y M Dalla Rizza (2011). Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71, 231-239.
- Díaz P. (1966) Estudios sobre una especie de *Alternaria* infecciosa en tuberculos de papas. *Agronomía Tropical*, 16(4), 255-262.
- Di-Mavungu, J., Monbaliu, S., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van-Petghem, C. y S. De Saeger. (2009). LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxins determination in food supplements. *Food Additives and Contaminants*, 26(6), 885-895.
- Escobedo, R. y M. Miranda-Ham (2003). Analysis of elicitor-induced cell viability changes in *Lycopersicon esculentum* Mill. Suspension culture by different methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 236-239.
- Farrar, J., Pryor, B y M. Davis (2004). *Alternaria* disease. *Plant Disease*, 88, 776-784.



- Gamboa-Angulo, M., Alejos-González, F., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., G. Delgado-Lamas y L. Peña Rodríguez (2000). Novel dimeric metabolites from *Alternaria tagetica*. *Journal of Natural Products*, 63, 1117-1120.
- Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas y L. Peña-Rodríguez (2002). Natural zinniol derivatives from *Alternaria tagetica*. Isolation, and structure-activity correlation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1053-1058.
- García, V (2005). Introducción a la microbiología. Editorial Universidad Estatal a distancia. p. 103.
- Glazebrook, J (2005). Contrasting mechanisms of disease against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
- Haraguchi, H., Abo, T. Fukuda, A., N. Okumura y A. Yagi (1996). Mode of phytotoxic action of altersolanols. *Phytochemistry*, 43, 989-992.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycology Research*, 105(12), 1422-1432.
- Hebert, T. y E. French (1980). Inóculo e inoculación, en: Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, San José, Costa Rica. pp. 172-175.
- Herrera, T. y M. Ulloa (1998). El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica, S.A de C.V. pp. 375-377.
- Huang, J-S. (2001). "Phytotoxins and plant pathogenesis", in: *Plant pathogenesis and resistance*. Klumer Academic Publisher pp 291-383.

- Indurm, A, y B. J. Howlett (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 241-255.
- Jackson, A. y C. Taylor. (1996). Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *The Plant Cell*, 8, 1651-1668.
- Jacyn, C y M. Norton (1994). An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell*, 39, 7-12.
- Jeng-Sheng, H. (2001). *Plant Pathogenesis and resistance: Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions*. Klumer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. pp. 292-383.
- Knogge, W. (1996). Fungal infection of plants. *The Plant Cell*, 8, 1711-1722.
- Kohmoto, K, y H. Otani (1991). Host recognition by toxigenic plant pathogens. *Experientia*, 47, 755-764.
- Kohmoto, K. y S. Nishimura (1983). Host specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Rev Phytopathology*, 21, 87-116.
- Lecomte, M., Hamama, L., Voisine, L, Gatto, J., Helesbeux, JJ., Seraphin, D., Peña-Rodriguez, L., Richomme, P., Boedo, C., Yovanopoulos, C., Melvina , G., Briardz, M., Simoneau, P., Poupard, P., y R. Berruye (2014). Partial resistance of carrot to *Alternaria dauci* correlates with *in vitro* cultured carrot cell resistance to fungal exudates. *PloS ONE*, 9, 1-15.
- Loescher, C., Moton, D., Razic, S., y S. Agatonovic (2014). High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*- advantages and limitations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98, 52-59.
- Manzi, L.V. y J.C. Mayz. (2003). Valorando los microorganismos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23, 85-88.

- Masoud Zaker (2012). Screening some medicinal plant extracts against *Alternaria sesami*, the causal agent of Alternaria leaf spot of sesame. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. 3, 1-8.
- Moscatiello, R., Baldan y L. Navazio (2013). Plant cell suspension cultures, in: *Plant mineral nutrients*, Maathius J.M.F. (ed). Human Pres. York, UK. pp. 77-94.
- Novacky, A (1991). The plant membrane and its response to disease, in: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Springer science, New York. pp. 363-375.
- Otani, H., M. Kodama y K. Kohomoto (1995). "Physiological and molecular aspects of *Alternaria* host-specific toxin and plant interactions", in: *Molecular Aspects of Pathological Resistance: Require Signal Transducción*. Mills, D. (ed). APS Press, Minnesota. pp 257-267.
- Panigrahi, S. (1997). "*Alternaria* toxins", in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Felix, J.P (ed). CRS Press, Boca Raton, pp. 319-336.
- Pedras, M. S. C., Biedenthal y Zaharia (2000). Comparision of the phytotoxic activity destruxin B and four natural analogs. *Plant Science*, 156: 185-192.
- Prell, H.H y P.R. Day (2000). *Plant-fungal pathogen interaction: a classical and molecular view*. Springer, Heidelberg, Tokio. pp. 1-4, 57-64.
- Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. y M. Lodovica (2013). Anew method for detection of five alternaría toxins in foof matrices based on LC-API-MS. *Food Chemistry*, 140, 161-167.
- Puch, M. A. (2001). Evaluación de la actividad fitotóxica en cultivos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet mediante el uso de diferentes técnicas de bioensayo. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 72 p.

- Qui, J. A (2008). Metabolitos fitotóxicos en la interacción planta-patógeno: El caso de *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee y *Tagetes erecta* L. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 124 p.
- Qui, JA., Castro-Concha, LA., García-Sosa, K., Miranda-Ham, ML., y Peña-Rodríguez, LM. (2010) Is zinniol a true phytotoxic? Evaluation of its activity at the cellular level against *Tagetes erecta*. *Journal of General Plant Pathology*, 76, 94-110.
- Riveros, A (2010). *Inducción de resistencia en plantas*. IICA, Tolima, Colombia, 239 p.
- Rodrigues, T., Maffia, L., Dhingra, O. y E. Mizubuti (2010) *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology*, 35, 203-212.
- Scott, P. M., Weber, D y Kanhere, S. R. (1997). Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. *Journal of Chromatography*, 765, 255-263.
- Shaw, D (1981). Production and isolation, in: *Toxins in plant disease*, Durbin, R.D.(ed). Academic Press, New York, pp. 21
- Strange, R (2007). Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Nat. Prod. Rep.* 24, 127-144.
- Strobel, G., Kenfield, D., Bunkers, G., Sugawara, F y J. Clardy (1991). Phytotoxins as potential herbicides. *Experientia*, 47, 819-826.
- Taiz, L. y E. Zeiger (2006). *Fisiología vegetal*. Castelló de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I, U.S.A. pp. 529.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M., y H. Otani (2013). *FEMS Microbiology Reviews.*, 37 44–66.
- Van Kan, L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11, 247-253.

- Vargas, A., Gamboa, M., medina, L., Pérez, D., Cristóbal J., y S. Ruiz (2014). Evaluation of Native Yucatecan Plant Extracts against *Alternaria chrysanthemi* and Antifungal Activity Spectrum of *Acalypha gaumeri*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32.
- Wolpert, T.J., Dunkle, L.D. y L.M., Ciuffetti (2002). Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annual Review of Phytopathology*, 40, 251–285.
- Xie, G.Y., Zhu, Y., Shu, P., Qin, X.Y., Wu, G., Wang, Q., y M.J. Qin (2014) Phenolic metabolite profiles antioxidants assay of three Iridaceae medicinal plants for traditional chinese medicine “She-gan” by on-line HPLC-DAD coupled with chemiluminescence (CL) and ESI-Q-TOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98: 40-51.