



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA RAÍZ DE
Acalypha gaumeri PROPAGADA ex-situ CONTRA
HONGOS FITOPATÓGENOS CARACTERIZADOS
MOLECULARMENTE**

Tesis que presenta

Edgar Gamaliel Itza Kuk

En opción al título de

Maestro en Ciencias

(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Julio 2015



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA RAÍZ DE *Acalypha gaumeri* PROPAGADA *ex-situ* CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS CARACTERIZADOS MOLECULARMENTE fue realizado en los laboratorios de Química y GeMBio del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Marcela Gamboa Angulo y el Dr. Raúl Tapia Tussell, 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, 30 de junio de 2015

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 de Yucatán, 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.

Firma: _____



Nombre: Edgar Gamaliel Itza Kuk

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marcela Gamboa Angulo, por todos sus conocimientos compartidos, por la ayuda en la redacción y revisión de la tesis, por ser la directora de este trabajo y enseñarme un mundo diferente de la ciencia “la química, como base fundamental del conocimiento”.

Al Dr. Raúl, Tapia Tussell, por su coasesoría, por los conocimientos de biología molecular que me compartió, por darme la oportunidad de trabajar independiente en el laboratorio y por gran parte de mi formación profesional.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., así como la laboratorio de Química de la unidad de Biotecnología y al laboratorio GeMBio, por proporcionar los equipos necesarios en el desarrollo del trabajo.

Al CONACYT, por la beca de manutención otorgada para realizar los estudios de maestría. No. de apoyo: 288892.

Al CONACYT por el financiamiento del Proyecto Fomix-YUC-2011-C09-168624

A la Dra. Daisy Pérez Brito, Inicialmente por aceptarme en el laboratorio Gembio, que ha sido fundamental en mi formación, así como por sus comentarios acertados en el transcurso de los tutoriales, y en la redacción y revisión del trabajo

Al Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Por formar parte del comité tutorial y por compartir sus comentarios en la parte de importancia de los hongos fitopatógenos.

A la Dra. Blondy Canto Canche, por sus comentarios acertados en la revisión del documento

A la I.Q. Irma L. Medina Baizabal, por el apoyo en la técnica de microdilución en agar y por el apoyo brindado en el laboratorio de química.

Al M. en C. Andrés Quijano Ramayo, por las observaciones, artículos y consejos aportados durante la maestría.

Al I.Q.I. Alberto Cortez Velázquez, por la ayuda técnica brindada y las facilidades para trabajar en el laboratorio biología molecular de GeMBio

A la L.A.E. Bertha Arely Ramírez González, por su apoyo en el formato electrónico de tesis.

A la IBQ. Rubí Chablé Villacis por la ayuda técnica otorgada en la parte de purificación y cultivo de hongos en el laboratorio.

A la M. en C. Teresita Valencia Yah el apoyo técnico en la purificación de hongos fitopatógenos y en la construcción de los arboles filogenéticos.

A la Dra. Claudia Torres Calzada por todas las aportaciones y observaciones realizadas durante la maestría.

Amigos de la generación, en especial a Amaranta, Pablo, y Ana con quienes compartimos momentos académicos y sociales en el transcurso de la maestría.

A Mis amigos que siempre han estado allí, sin esperar nada a cambio: A Rubí Chable, por ser cómplice de muchas decisiones que he tomado; Amaranta Girón, por todas las alegrías, por escuchar algunos de mis problemas y en poco tiempo tener una bonita amistad; A Daniela Hurtado, que siempre teníamos charlas muy interesante de diversos temas, con el café. A Sara Hernández por su amistad, por los consejos, advertencias de la tesis y por ser una persona admirable.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Gembio: Emy, Rubí, Yaqui, Sandy, Neto y Beto, Abril Anuar, Tere, Claudia, Tania, y aunque en muy corto tiempo a Edgar e Isabel.

A mis compañeros del Laboratorio de química. Arely, Dany, Ashanty, Anita, Tania, Stefany, Ana, Ángel, Lía, Cristina y Héctor. Quienes fueron una parte esencial y hacer más agradable mi estancia, en el laboratorio de química y de alguna u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

A toda mi familia que ha sido el motor en la elaboración de este trabajo. A mi Padre, Mario Humberto Itza Poot, por hacerme una persona de bien con sus consejos y por creer en

mí. A mi madre: Teresa de Jesús Kuk Be, por estar aquí, simplemente sin ella nunca hubiera llegado hasta aquí. A mis hermanos Rolando (y Lizbeth), Julio y Carlos, por lo mucho que hemos vivido y compartido; y a mis hermanitas: Sandra y Mariela, por ser parte esencial e importante en mi vida.

De una forma muy especial e importante a la ISC. Milka Abigail Romero Chel. Quién indirectamente pero en gran medida, ha sido fundamental para la elaboración de este trabajo. Quien no me ha dejado caer en cada decepción de resultados no esperados. Y me ha enseñado el Valor de la Confianza, por ser mi inspiración Y por muchas otras cosas más importantes que no podría caber en este documento, por Todo eso y más.

“El corazón del entendido adquiere sabiduría; y el oído de los sabios busca la ciencia”

Proverbios 18:15

DEDICATORIAS

Primeramente a Dios por todas las grandes cosas que creo y aun o no logramos descifrar y A mis padres que siempre han confiado en mí en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. PRODUCTOS NATURALES DE PLANTAS	2
1.2.1. Extractos vegetales	2
1.2.2. <i>Acalypha gaumeri</i> Pax & Hoffmann	3
1.2.2.1. Descripción	3
1.2.2.2. Ubicación taxonómica (Martínez <i>et al.</i> , 2006)	4
1.2.2.3. Distribución	4
1.2.2.4. Propiedades biológicas de <i>Acalypha gaumeri</i>	5
1.2.2.5. Estudios fitoquímicos de <i>A. gaumeri</i>	5
1.2.3. Bioensayos	6
1.2.3.1. Bioensayo de dilución en agar	6
1.2.3.2. Bioensayo en Microdilución	6
1.2.3.2.1. Importancia de los hongos fitopatógenos	7
1.2.3.3. Identificación taxonómica en hongos	7
1.2.3.4. Caracterización molecular	9
1.2.4. Descripción de los fitopatógenos bajo estudio	10
1.2.4.1. <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl	10
1.2.4.2. <i>Alternaria chrysanthemi</i> Simmons & Crosier	11
1.2.4.3. <i>Colletotrichum capsici</i> (Syd)	12
1.2.4.4. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz. & Sacc	13
1.2.4.5. <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) sacc	14
1.2.4.6. <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc	15
1.2.4.7. <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (Teleomorfo: <i>Athelia rolfsii</i> (Curzi))	16

1.3.	JUSTIFICACIÓN.....	18
1.4.	OBJETIVOS.....	19
1.4.1.	General	19
1.4.2.	Específicos	19
1.5.	HIPÓTESIS.....	20
1.6.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
1.7.	REFERENCIAS	22

CAPÍTULO 2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE TRES POBLACIONES DE ACALYPHA GAUMERI PROPAGADAS EX-SITU Y SU EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA..... 34

2.1.	INTRODUCCIÓN	34
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.2.1.	Colecta y preparación del material vegetal para la elaboración de los extractos.....	36
2.2.2.	Obtención de los extractos.....	37
2.2.2.1.	Extractos etanólicos	37
2.2.2.2.	Extractos hidroalcohólicos.....	37
2.2.2.3.	Extractos acuosos	37
2.2.3.	Preparación de los extractos.....	38
2.2.4.	Bioensayos	38
2.2.4.1.	Las cepas de hongos fitopatógenos	38
2.2.5.	Bioensayo en microdilución	39
2.2.5.1.	Lectura de la microplaca	40
2.2.6.	Bioensayo de dilución en agar	41
2.2.7.	Evaluación de los extractos contra la formación de esclerocios de <i>Athelia rolfsii</i>	41
2.3.	RESULTADOS	42
2.3.1.	Rendimiento de los extractos	42
2.3.2.	Evaluación de la actividad antifúngica por el bioensayo de Microdilución	42
2.3.3.	Evaluación de la actividad antifúngica por el bioensayo de dilución en agar.....	45
2.3.4.	Efecto de los extractos contra la formación de esclerocios	49
2.4.	DISCUSIÓN	51
2.5.	REFERENCIAS	54

CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS	56
3.1. INTRODUCCIÓN	56
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.2.1. Crecimiento de <i>microorganismos</i>	58
3.2.2. Aislamiento de ADN genómico.....	58
3.2.3. Integridad y pureza.....	58
3.2.4. Identificación con iniciadores específicos para <i>Colletotrichum sp.</i>	59
3.2.5. Identificación por ITS y el gen 5.8S	60
3.2.6. Secuenciación.....	60
3.2.7. Caracterización molecular.....	61
3.2.7.1. PCR- RFLP.....	61
3.2.7.2. DAMD (Directed Amplification of Minisatellite DNA)	62
3.2.8. Análisis de datos.....	63
3.3. RESULTADOS	64
3.3.1. Identificación molecular con iniciadores específicos para <i>Colletotrichum sp.</i>	65
3.3.2. Amplificación de la región ITS-5.8S.....	65
3.3.3. Secuenciación.....	65
3.3.4. PCR-RFLP.....	68
3.3.5. DAMD.....	70
3.4. DISCUSIÓN	73
3.5. REFERENCIAS	75
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	80
4.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	80
4.2. CONCLUSIONES	82
4.3. PERSPECTIVAS	83
4.4. REFERENCIAS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Planta de Acalypha gaumeri</i> propagada en el invernadero del CICY.....	3
Figura 2. <i>Distribución de Acalypha gaumeri</i> en la península de Yucatán (Imagen proporcionada por el herbario del CICY).....	5
Figura 3. <i>Estructura química de Argaumerina</i> (Vargas-Díaz et al., 2014).....	5
Figura 4. <i>Región ITS amplificados con los iniciadores ITS1-ITS4.</i>	9
Figura 5. <i>Conidios de Alternaria alternata</i> aislados de lesiones de <i>J. curcas</i> (Valencia, 2014).....	11
Figura 6. <i>A) hojas necróticas inducidas por A. chrysanthemi. B) y C) estructuras del hongo para la identificación correspondiente de A. chrysanthemi</i> Simmonn y Croisier. (Villanueva-Couoh et al., 2004).....	12
Figura 7. <i>A) Infección superficial en papaya. B) masa de conidios en la superficie del fruto y C) esporas de C. capsici.</i> (Torres-Calzada et al., 2012).....	13
Figura 8. <i>A) Infección superficial en papaya. B) masa de conidios en la superficie del fruto y C) esporas de C. gloeosporioides.</i> (Torres-Calzada et al., 2012).....	14
Figura 9. <i>Microconidios Fusarium equiseti</i> (Nelson et al., 1994).	15
Figura 10. <i>Microconidios Fusarium solani</i> (Nelson et al., 1994).....	16
Figura 11. <i>Estrategia experimental</i>	21
Figura 12. <i>Estrategia experimental de la evaluación antifúngica de los extractos de A. gaumeri.</i> ..	36
Figura 13. <i>Fórmula para evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento. Cneg: control negativo (cm); c.muestra: crecimiento de la muestra (cm).</i>	40
Figura 14. <i>Efecto de los extractos de la raíz de Acalypha gaumeri a diferentes concentraciones, contra la cepa de Alternaria chrysanthemi (Cicy004) en el ensayo en microdilución. GI-1A: EE de Oxkutzcab; GI-2A: EE de Tinum; GI-3A: EE de Yaxcabá; GI-1B: EHA de Oxkutzcab; GI-2B: EHA de Tinum; GI-3B: EHA de Yaxcabá; GI-1C: EA de Oxkutzcab; GI-2C: EA de Tinum; GI-3C: EA de Yaxcabá.</i>	43
Figura 15. <i>Actividad antifúngica de los extractos de la raíz de Acalypha gaumeri contra la cepa de Alternaria alternata (JG32) en el ensayo en microdilución. GI-1A: EE de Oxkutzcab; GI-2A: EE de</i>	

Tinum; GI-3A: EE de Yaxcabá; GI-1B: EHA de Oxkutzcab; GI-2B: EHA de Tinum; GI-3B: EHA de Yaxcabá; GI-1C: EA de Oxkutzcab; GI-2C: EA de Tinum; GI-3C: EA de Yaxcabá. 44

Figura 16. Evaluación de actividad antifúngica por el bioensayo de dilución en agar a $2000 \sim g mL^{-1}$ contra *Alternaria alternata* (JG14). GI-1A: EE de Oxkutzcab; GI-2A: EE de Tinum; GI-3A: EE de Yaxcabá; GI-1B: EHA de Oxkutzcab; GI-2B: EHA de Tinum; GI-3B: EHA de Yaxcabá; GI-1C: EA de Oxkutzcab; GI-2C: EA de Tinum; GI-3C: EA de Yaxcabá..... 45

Figura 17. Actividad antifúngica de los extractos de la raíz de *Acalypha gaumeri* a $2000 \sim g mL^{-1}$, ante la cepa de *Alternaria alternata* (JG14) en el ensayo método de dilución en agar. 46

Figura 18. Efecto del crecimiento radial de la cepa *Athelia rolfsii* AT18, ante los extractos de *Acalypha gaumeri*..... 47

Figura 19. Evaluación de actividad antifúngica por el bioensayo de dilución en agar a $2000 \sim g mL^{-1}$ contra *Athelia rolfsii* (AT18). GI-1A: EE de Oxkutzcab; GI-2A: EE de Tinum; GI-3A: EE de Yaxcabá; GI-1B: EHA de Oxkutzcab; GI-2B: EHA de Tinum; GI-3B: EHA de Yaxcabá; GI-1C: EA de Oxkutzcab; GI-2C: EA de Tinum; GI-3C: EA de Yaxcabá..... 47

Figura 20. Efecto del crecimiento radial de la cepa JG22 ante los extractos de *A. gaumeri*..... 48

Figura 21. Comparación del efecto de los extractos contra *Athelia rolfsii* y la formación de esclerocios..... 50

Figura 22. Evaluación de la formación de esclerocios con los extractos de *Acalypha gaumeri*..... 50

Figura 23. Gel de calidad e integridad del ADN genómico. 64

Figura 24. Amplificación de la región ITS-5.8S. M: marcador molecular (1 Kb), B: blanco, Línea 1: JG14, Línea 2: JG32, Línea 3: CICY004, Línea 4: AT18, Línea 5: CCP27, Línea 6: CGP6, Línea 7: JG22 y Línea 8: JG2. 65

Figura 25. Análisis filogenético basados en la secuenciación de la región ITS-5.8S gen. Los símbolos en rombo color rojo son las cepas que se utilizadas en este estudio. El análisis fue inferido usando el método UPGMA con un bootstrap de 1000 réplicas realizado en MEGA 5.2 67

Figura 26. Perfiles de digestión enzimática en la región; M: marcador molecular (1000pb), B: blanco, Línea 1: JG14, Línea 2: JG32, Línea 3: CICY004, Línea 4: AT18, Línea 5: CCP27, Línea 6: CGP6, Línea 7: JG22 y Línea 8: JG2..... 68

Figura 27. *Patrones de bandas obtenidas de los 3 iniciadores. M: marcador molecular (1 Kb), B: blanco, Línea 1: JG14, Línea 2: JG32, Línea 3: CICY004, Línea 4: AT18, Línea 5: CCP27, Línea 6: CGP6, Línea 7: JG22 y Línea 8: JG2..... 70*

Figura 28. *Dendograma obtenido con el iniciador HVA por análisis cluster (UPGMA) basado en el coeficiente de similitud de Jaccard. 71*

Figura 29. *Diagrama de dos dimensiones del análisis de coordenadas principales con todos los iniciadores (HVA, HBV y M13). 72*

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Cepas fitopatógenas utilizadas para evaluar la actividad antifúngica de los extractos de <i>Acalypha gaumeri</i> propagada ex-situ y su método de evaluación.....</i>	38
Cuadro 2. <i>Escala numérica de la inhibición del crecimiento en el bioensayo de microdilución en microplaca (NCCLS, 2002).</i>	40
Cuadro 3. <i>Rendimiento de los extractos (W extracto/100g planta seca) obtenidos de las tres poblaciones de <i>Acalypha gaumeri</i> cultivadas ex-situ.....</i>	42
Cuadro 4. <i>Comparación de la efectividad de los extractos etanólicos obtenidos de las poblaciones de <i>A. guameri</i> contra las cepas sensibles a ellos.....</i>	49
Cuadro 5. <i>Condiciones de digestión para las enzimas.....</i>	61
Cuadro 6. <i>Secuencias de los iniciadores (Verma y Rana, 2012).....</i>	62
Cuadro 7. <i>Cuantificación de ADN genómico.....</i>	64
Cuadro 8. <i>Secuencias identificadas en la base de datos de NCBI.....</i>	66
Cuadro 9. <i>Longitud en pares de bases (pb) de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP.....</i>	69

RESUMEN

Acalypha gaumeri es una planta endémica de la Península de Yucatán con alta capacidad de inhibir el crecimiento de varios hongos fitopatógenos. Con la finalidad de continuar con los estudios de esta especie y en la búsqueda de alternativas para el control de enfermedades en plantas, tres poblaciones (Oxkutzcab, Tinum y Yaxcabá) de esta especie han sido cultivadas en condiciones *ex situ*. Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue comprobar si plantas de *A. gaumeri* cultivadas en condiciones *ex situ* mantenían dichas propiedades antifúngicas, y por otro lado realizar la caracterización molecular de los hongos empleados en este estudio.

Los resultados mostraron la capacidad de los extractos etanólico (EE) e hidroalcohólico (EHA) de raíz de *A. gaumeri*, propagadas *ex situ*, de inhibir el crecimiento de las cepas de *Alternaria chrysanthemi* (CICY004), dos cepas de *Alternaria alternata* (JG14 y JG32) y *Athelia rolfsii* (AT18). La cepa de *A. chrysanthemi* fue la más susceptible, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 500 µg mL⁻¹. Los EE y EHA inhibieron la formación de esclerocios de la cepa *A. rolfsii*, un resultado interesante, ya que los esclerocios son fundamentales en el ciclo de estos patógenos. Por otro lado, las cepas de hongos se identificaron mediante las técnicas moleculares PCR-RFLP y DAMD. Los resultados moleculares permitieron observar un agrupamiento que interesantemente corresponde a las cepas sensibles a los extractos de *A. gaumeri*.

En general, los resultados de esta investigación indican que la especie *A. gaumeri* propagada *ex situ* mantiene sus propiedades antifúngicas y es una excelente candidata para el desarrollo de un agente antifúngico natural.

ABSTRACT

Acalypha gaumeri is an endemic plant of the Yucatan peninsula, whose root extracts showed antifungal activity against various fungal phytopathogens. In order to continue studies on this species and to search for alternatives to control plant diseases, three populations (Oxkutzcab, Tinum, and Yaxcabá) of this species have been grown in *ex situ* conditions. According to the above, the objectives of this work were to verify whether *A. gaumeri* plants grown in *ex situ* conditions kept their antifungal properties and to achieve the molecular characterization of fungi used in this study.

The results showed the ability of the ethanol extract (EE) and hydroalcoholic extract (EHA) to inhibit the growth of the target strains tested: *Alternaria chrysanthemi* (CICY004), two strains of *Alternaria alternata* (JG14 and JG32), and *Athelia rolfsii* (AT18). *Alternaria chrysanthemi* was the most susceptible strain, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The EE and EHA inhibited the formation of *A. rolfsii* sclerotia, a result considered remarkable, considering that sclerotia are critical in the life cycle of these pathogens. On the other hand, the fungal strains were characterized using the molecular techniques PCR-RFLP and DAMD. Interestingly, the molecular results allowed observing a group of strains sensitive to the extracts of *A. gaumeri*.

In general, the results of this investigation indicate that the species *A. gaumeri* propagated *ex situ* maintains its antifungal properties and it is an excellent candidate for the development of a natural antifungal agent.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Introducción

Los factores bióticos son una de las causas que afectan en la producción y rendimiento en cultivos vegetales de importancia agrícola. Entre estos, los hongos, bacterias, virus y nematodos patógenos, son reconocidos agentes causales de enfermedades. Sin embargo, los primeros son responsables de grandes pérdidas, precedidos únicamente por los insectos (Mentaberry, 2007). Para el control de las enfermedades causadas por los hongos, tradicionalmente se han usado los agroquímicos sintéticos por su efectividad y rapidez para controlar estas enfermedades. Con el paso del tiempo, el uso frecuente e indiscriminado de estos productos ha llevado a inducir resistencia en estos organismos, usando cada vez dosis mayores a las recomendadas (Hernandez *et al.*, 2008; Cooke *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha comprobado que son altamente residuales y tóxicos a los vertebrados incluyendo al hombre. Por tal motivo, es de gran importancia sustituir a estos productos sintéticos por otras alternativas amigables con el ambiente, tales como los metabolitos producidos por las plantas para su defensa.

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. Ellas producen diversos metabolitos secundarios, algunas de estos, se ha comprobado que actúan en forma de defensa contra fitopatógenos, por ello son atractivos como alternativas naturales. Con esta finalidad, en la unidad de Biotecnología del CICY, se han realizado estudios de la flora local para encontrar especies con efectos antifúngicos. Los resultados mostraron que la especie *Acalypha gaumeri* (Euphorbiaceae), endémica de la Península de Yucatán, tiene una notable actividad en el control de fitopatógenos. Esta planta es estudiada actualmente para conocer su espectro completo de actividad antifúngica, y está siendo evaluada su propagación en vivero (Gamboa-Angulo, 2008; Vargas Díaz, 2009).

Reportes previos han demostrado que los extractos obtenidos de las raíces de *Acalypha gaumeri* crecida *in-situ*, tienen amplia actividad biológica para el control de diferentes fitopatógenos (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Cristóbal *et al.*, 2006; Cruz-Estrada *et al.*, 2013), por lo tanto, es importante evaluar si la planta cultivada en condiciones *ex-situ* mantiene las propiedades antifúngicas y determinar su espectro de acción contra los diferentes hongos fitopatógenos previamente evaluados y contra otras cepas patógenas aisladas de plantas económicamente importantes.

1.2. Productos naturales de plantas

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas para usos medicinales y también para el control de microorganismos que dañan a sus cultivos (Ali-Shtayed *et al.*, 1998; Sanabria *et al.*, 1998; De Los Ríos *et al.*, 1999). En la actualidad se encuentran en el mercado productos y extractos de origen vegetal con actividad microbiana comprobada (Cáceres *et al.*, 1990; Dimayuga y García, 1991; Rojas *et al.*, 1992; Sanabria *et al.*, 1998).

En México existen una vasta diversidad biológica, debido a los diferentes climas y condiciones fisiográficas. Se estima que existen aproximadamente 30 000 especies de plantas, las cuales en su mayoría aún no han sido exploradas para el control de hongos fitopatógenos (Chi, 2005; Hernández *et al.*, 1998). El empleo de extractos vegetales para el control de plagas, enfermedades y arvenses en la agricultura sostenible, constituye una alternativa promisoriosa, debido a su efectividad, bajo costo y que no son contaminantes del ambiente (Regnault, 2004; Obledo *et al.*, 2004). Las plantas y sus derivados han demostrado ser buenos controladores de ácaros, insectos, hongos y otros fitopatógenos (Grainge y Ahmeds, 1998).

1.2.1. Extractos vegetales

Los extractos vegetales se caracterizan por tener metabolitos secundarios que forman parte de defensa de las plantas. Estos metabolitos, proporcionan características a los extractos que les permiten actuar como antivirales, antimicrobianos o repelentes. Los

antimicrobianos se utilizan para proteger a los cultivos e incrementar la calidad de los productos alimentarios, son de fácil degradación por el ambiente y en general presentan baja toxicidad (Philogenet *et al.*, 2004).

1.2.2. *Acalypha gaumeri* Pax & Hoffmann

1.2.2.1. Descripción

La especie *Acalypha gaumeri* es un arbusto que puede llegar a medir hasta 2.5 m de altura, con ramas y brotes en su mayoría dimórficos, hojas con peciolo cortos y dentadas, en su mayoría agrupadas en ramas. Flores pistiladas individuales, los frutos se encuentran entre los brotes laterales de la hojas, encerrados en brácteas. Es una especie dioica, la descripción de esta planta fue basada en dos colectas de individuos femeninos. El individuo masculino; cuenta con ramas leñosas, espigas axilares densas, de hasta 8 mm de largo y 1.5 mm de ancho, con pelos cortos, brácteas deltoideas, ciliadas (Bhattacharyya, 2006; Reinhard, 1924). Nombre común sak ch'ilib tuux.



Figura 1. Planta de *Acalypha gaumeri* propagada en el invernadero del CICY.

1.2.2.2. Ubicación taxonómica (Martínez et al., 2006)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Acalypha*

Especie: *Acalypha gaumeri*

1.2.2.3. Distribución

Acalypha gaumeri es considerada endémica de la Península de Yucatán y se localiza en la selva baja caducifolia, selva mediana subperennifolia y en la selva mediana subcaducifolia.



Figura 2. Distribución de *Acalypha gaumeri* en la península de Yucatán (Imagen proporcionada por el herbario del CICY).

1.2.2.4. Propiedades biológicas de *Acalypha gaumeri*

Los extractos orgánicos de *A. gaumeri* han sido evaluados contra nematodos, insectos y hongos. Los extractos de la raíz mostraron efecto fungicida contra *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus* sp; las hojas poseen actividad insecticida contra *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae*. (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Cruz-Estrada, *et al.*, 2013; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008).

1.2.2.5. Estudios fitoquímicos de *A. gaumeri*

El único estudio fotoquímico de *A. gaumeri*, indica la presencia de un alcaloide heterocíclico aromático, nombrado como argaumerina.

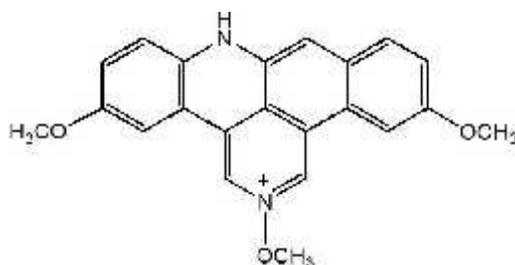


Figura 3. Estructura química propuesta para Argamerina (Vargas-Díaz *et al.*, 2014)

1.2.3. Bioensayos

En el área de estudio de química de los compuestos naturales, los bioensayos son técnicas que utilizan organismos vivos para evaluar si un compuesto, fracción cromatográfica o los extractos orgánicos, poseen alguna propiedad biológica de interés. En dicha búsqueda, la efectividad se determina inicialmente en experimentos *in vitro*. Posteriormente se extrapolan al hospedante natural o al material que debe ser protegido. Con este objetivo, han sido desarrolladas varias pruebas para evaluar la utilidad práctica de diferentes compuestos en el control de fitopatógenos. Los métodos usados para evaluar la actividad antifúngica y la elección de las pruebas, varían de acuerdo al criterio de cada investigador (Cowan, 1999; Mangena y Muyima, 1999; Panizzi *et al.*, 1993).

1.2.3.1. Bioensayo de dilución en agar

El CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) considera la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por dilución en agar, como un método de referencia para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana. Así como para determinar la capacidad inhibitoria de un agente por su acción fungicida o fungistática.

1.2.3.2. Bioensayo en Microdilución

La técnica de microdilución es un método usado para determinar la sensibilidad de productos naturales antifúngicos. En esta técnica se usa una placa de 96 pocillos con concentraciones crecientes del extracto a evaluar, inoculados con el organismo de interés. Posee las ventajas de utilizar pequeños volúmenes finales (100 ó 200 μL), las diluciones se hacen de manera automatizada, se puede realizar en corto tiempo y también se puede realizar con mayor número de muestras (NCCLS, 2002).

1.2.3.2.1. Importancia de los hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos constituyen el grupo de agentes causales que provocan las principales pérdidas económicas en las plantaciones agrícolas, precedidos sólo por los insectos. Estos organismos son capaces de ocasionar daños en toda la planta (raíces, tallos, hojas y frutos), reduciendo la calidad y los rendimientos en los cultivos, con pérdidas que oscilan entre 10 y 100% (Tun *et al.*, 2011). Por lo tanto, son uno de los problemas más importantes a resolver en las plantaciones de cultivos comerciales.

La mayoría de las especies de hongos conocidas, son estrictamente saprófitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Se considera que cerca de 8,000 especies de hongos son las que producen enfermedades en las plantas, y cada hongo parásito puede atacar a uno o más especies de plantas (Agrios, 2005). Sin embargo para poder darle un manejo adecuado a fin de controlar las enfermedades fúngicas, es necesario tener una identificación certera y confiable del organismo causal. Los métodos de identificación que más se utilizan son lo que emplean claves morfométricas y técnicas moleculares basadas en el ADN.

1.2.3.3. Identificación taxonómica en hongos

1.2.3.3.1. Identificación taxonómica tradicional

El estudio de los organismos, así como de su clasificación e identificación se ha realizado desde tiempos muy remotos y ha sido de gran importancia. Sin embargo, es a partir del siglo XVII, con la aplicación del microscopio que se comenzaron a hacer estudios más detallados en el mundo de los microorganismos (Moreno, 2005).

Con el surgimiento de la taxonomía, sistemática y cladística, se han logrado identificar a ciertas especies que no habían sido ubicadas en algún grupo taxonómico existente. En general la sistemática y cladística, son herramientas que se basan principalmente en las relaciones filogenéticas de ciertos taxos, y sus caracteres evolutivos, mientras que la taxonomía tradicional provee de datos morfológicos que sirven como marco de referencia

de cualquier estudio biológico (Hernández, *et al.*, 2001). El estudio de estas características morfológicas ha sido de los más utilizados para obtener un conocimiento profundo e integral de los organismos, y para comprender acerca de su estructura, complejidad y posible función en un hábitat determinado (Posada, *et al.*, 1996).

En la identificación de hongos, las características taxonómicas que se toman en cuenta son: color de las colonias, forma, textura de la superficie, tipos de márgenes, presencia de hifas aéreas y tasa de crecimiento. Para las esporas se evalúan: el tipo de conidiogénesis, la forma, tamaño (largo x ancho), número de septos, tipo de pared y pigmentación. Sin embargo, ésta identificación puede ser subjetiva y los estudios moleculares muestran que algunas identificaciones tempranas basadas sólo en el fenotipo han sido inexactas (Chen *et al.*, 2011).

1.2.3.3.2. Identificación molecular

Las técnicas moleculares basadas en el ADN, se han convertido en las últimas décadas en una herramienta valiosa para la identificación de hongos, complementando a las técnicas tradicionales (claves morfológicas) (Teletchea *et al.*, 2008). Estas técnicas no excluyen a la taxonomía que se basa en caracteres morfológicos, por el contrario se presentan como una herramienta complementaria, para la correcta identificación taxonómica de las especies (Padial y De la Riva, 2007).

Las regiones del ADN ribosomal (ADNr), más comúnmente estudiadas son los espacios transcritos internos o ITS (por sus siglas en inglés: Internal Transcribed Spacer) una región altamente conservada, pero variable entre especies, por lo que ha sido usada con éxito para la caracterización de especies y razas. Esta región comprende las regiones ITS1, ITS2 y el gen 5.8S (Orberá, 2004; Kurtzman y Piskur, 2006) amplificados con diferentes iniciadores universales, pero los más usados son: ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990).



Figura 4. Región ITS amplificados con los iniciadores ITS1-ITS4.

La amplificación de las región ITS y el gen 5.8 S también es muy usada para la obtención de huellas genéticas. En biología molecular, la huella genética (ADN fingerprinting) es el patrón único de fragmentos de ADN que identifica a un individuo, mediante técnicas que revelan polimorfismos múltiples en el ADN. (CIMMYT, 1996; Van der Vossen *et al.*, 2003; Libkind, 2007).

1.2.3.4. Caracterización molecular

1.2.3.4.1. Polimorfismo de la longitud en los fragmentos de restricción amplificados por PCR (PCR-RFLP)

La técnica PCR-RFLP consiste en la amplificación por PCR de una secuencia conocida del ADN, utilizando dos iniciadores homólogos en sus regiones extremas. Las secuencias de ADN amplificadas por PCR, son digeridas por enzimas de restricción. Estas reconocen la secuencia de ADN y cortan en puntos específicos de reconocimiento de dicha secuencia. Las enzimas de restricción más usadas son las del tipo II, que se unen a secuencias específicas del ADN de doble cadena, cortándolo en fragmentos de diferentes tamaños. Algunas de estas endonucleasas cortan exactamente en el eje de simetría, generando fragmentos de extremos “romos”. Otras enzimas cortan cada hebra en posiciones similares, sobre los lados opuestos del eje de simetría, creando fragmentos de ADN que tienen cadenas simples, con extremos que sobresalen, también conocidos como extremos “pegajosos” (CIMMYT, 1996; Brown, 2008).

Al digerir el amplicon del individuo bajo estudio, se obtienen fragmentos de ADN de diferentes tamaños, permitiendo detectar los polimorfismos entre ellos (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) (Orberá, 2004; Neppelenbroek *et al.*, 2006). Estos polimorfismos están dados por diferentes sitios de corte de cada enzima que puede variar entre los individuos. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas, y la existencia de patrones únicos permiten su identificación (van der Vossen *et al.*, 2003; Orberá, 2004; Neppelenbroek *et al.*, 2006).

1.2.3.4.2. Reacción de la amplificación con un único iniciador (SPAR)

Entre las técnicas usadas para la caracterización por huellas genéticas, se encuentra la reacción de la amplificación con un solo iniciador o SPAR (por sus siglas en inglés Single Primer Amplification Reaction) que se ha convertido en una herramienta eficaz para el estudio de la diversidad genética (Ranade *et al.*, 2009; Elmeer y Almalki, 2011; Mani *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2010; 2011), particularmente para especies que no han sido estudiadas o para aquellas en las que no han sido desarrollados marcadores moleculares específicos (Sharma *et al.*, 2011). Estos métodos incluyen a: la amplificación directa con ADN minisatélites (DAMD) (Heath *et al.*, 1993), los marcadores inter-microsatélites (ISSR) (Gupta *et al.*, 1994) y los fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD) (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) y han sido técnicas certeras para el estudio de la diversidad genética, que en conjunto proporcionan una descripción completa de la naturaleza y la medida de la diversidad (Devi *et al.*, 2014).

1.2.4. Descripción de los fitopatógenos bajo estudio

1.2.4.1. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl

Alternaria alternata es un hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas de 10 o más conidios (Bial-Aristegui, 2002).



Figura 5. Conidios de *Alternaria alternata* aislados de lesiones de *Jatropha curcas* (Valencia, 2014)

Es extremadamente común en abonos, plantas (fresas, crisantemos, tomates, zanahorias y espárragos), pulpa de madera y madera podrida, pero también se encuentra en alimentos y tejidos, así como en diferentes tipos de suelo. Así mismo, es responsable de considerables pérdidas económicas en el sector agrícola, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento. Es un patógeno facultativo, favorecido por el estrés, la madurez y la senescencia del hospedero (Bial-Aristegui, 2002; Pavón *et al.*, 2009)

En México principalmente afecta al tomate en la etapa de poscosecha, causando pérdidas económicas importantes (Vanderpan, 1994; Troncoso-Rojas *et al.*, 2005). Y actualmente se ha encontrado afectando a plantaciones de *Jatropha curcas* para la producción de biocombustibles (Valencia, 2014).

1.2.4.2. *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier

Las características encontradas en el aislamiento de este hongo son: micelio de color hialino, olivo pálido o café, con un diámetro de 4-8 μ . Los conidios son oscuros, frecuentemente cilíndricos, solitarios o en cadenas cortas. Las esporas se encuentran constreñidas a nivel del septo, y miden entre 25-130 μ (70 μ) de largo y entre 10-26 μ (17 μ), presentan entre 5 a 17 septos trasversales y entre cero a seis longitudinales, el septo del conidio puede tener una dimensión de 12 μ (Rao, 1969; Cabrera *et al.*, 2004).

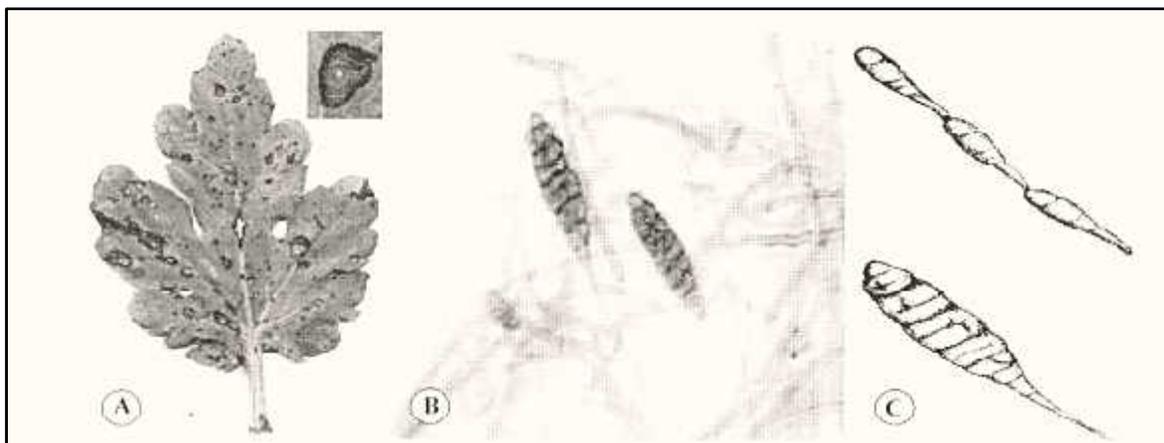


Figura 6. A) hojas necróticas inducidas por *A. chrysanthemi*. B) y C) estructuras del hongo para la identificación correspondiente de *A. chrysanthemi* Simmonn y Croisier (Villanueva-Couoh *et al.*, 2004).

Al hospedarse en las plantas, sus primeras lesiones aparecen como manchas de color café claro, las cuales crecen rápidamente, adoptando una forma de círculos irregulares, de color café a café oscuro o negro y pueden eventualmente llegar a medir 30 mm de diámetro, antes de afectar cloróticamente toda la hoja (Sobers, 1965). En los tallos las lesiones son al principio superficiales, pero después penetran profundamente causando un ahorcamiento y por consiguiente, la deshidratación de los tejidos infectados, lo que finalmente provoca la muerte de la planta. En las áreas muertas el hongo fructifica abundantemente, formando una costra negra de conidióforos y conidios que cubren la superficie epidérmica (Camargo *et al.*, 2000). *A. chrysanthemi* afecta al crisantemo, la segunda flor más importante en el comercio internacional (solamente superada en importancia por la rosa), lo que conlleva a pérdidas económicas, si no es controlada a tiempo la enfermedad. (Bautista *et al.*, 2002; Romero-Cova, 1996).

1.2.4.3. *Colletotrichum capsici* (Syd)

Colletotrichum capsici es el agente causal de la antracnosis de un amplio rango de plantas (Shenoy *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2001; A-li Chai *et al.*, 2014). Se caracteriza

por presentar acérvulos elípticos o circulares, de 85 a 245 μm de diámetro, distribuidos alrededor de la lesión, subepidermales, con masas de esporas de color gris. Los conidios alcanzan tamaños de 17-26 μm de longitud por 3-4 μm de ancho, son hialinos y falcados con ápices con forma (Shenoy *et al.*, 2007). La antracnosis es una enfermedad de importancia agrícola que afecta a cultivos tropicales tales como el chile, papaya y *Jatropha curcas* (Pakdeeveraporn *et al.*, 2005; Torres-Calzada *et al.*, 2012; Valencia, 2014).

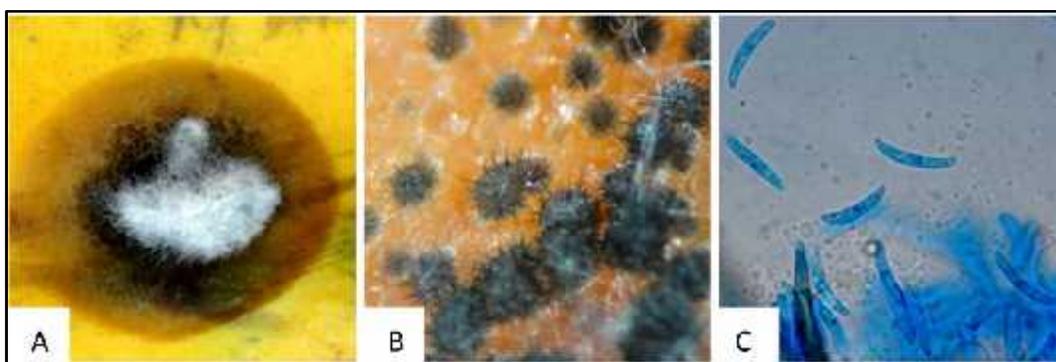


Figura 7. A) Infección superficial en papaya. B) masa de conidios en la superficie del fruto y C) esporas de *C. capsici*. (Torres-Calzada *et al.*, 2012)

1.2.4.4. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc.

Las colonias de *C. gloeosporioides* se presentan micelio de color blanco, que se vuelve grisáceo a gris oscuro al reverso de la caja Petri. El micelio se oscurece con la edad, y puede tomar color anaranjado cuando se ha formado el acérvulo maduro, algunas veces pueden observarse colonias de color rosa. Los conidios son hialinos, cilíndricos, ovoides elípticos, falcados, o encorvados, con ápices redondeados, unicelulares, su tamaño varía de 7 a 20 μm de largo y de 2.5 a 5 μm de ancho (Acosta, 2002). Es un patógeno oportunista, capaz de infectar a un gran grupo de hospederos, entre ellos papaya, mango, cítricos, guanábana aguacate, entre otros (Tapia-Tussell *et al.*, 2008; Torres-Calzada *et al.*, 2012). Por lo tanto, es el responsable de pérdidas económicas importantes en

diversos cultivos de regiones tropicales y subtropicales del mundo (Jeffries *et al.*, 1990; Ploetz, 1994; Prusky *et al.*, 2000) y de causar daños postcosecha en diversos frutos.

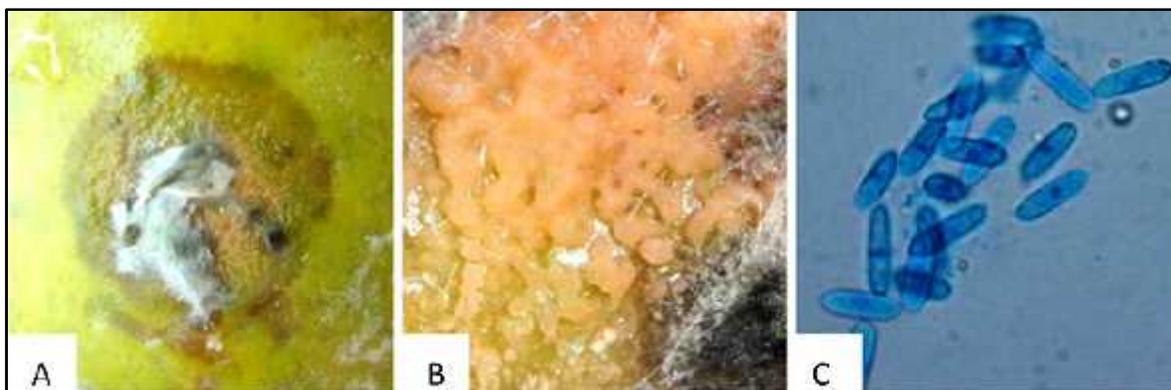


Figura 8. A) Infección superficial en papaya. B) masa de conidios en la superficie del fruto y C) esporas de *C. gloeosporioides*. (Torres-Calzada *et al.*, 2012)

1.2.4.5. *Fusarium equiseti* (Corda) sacc

Fusarium equiseti es cosmopolita, habitante natural del suelo y puede ser aislado de diversos hospederos (Kosiak *et al.*, 2005). Se caracteriza por poseer abundantes microconidios formados en esporodocios, lo que facilita su identificación. Los microconidios poseen una curvatura dorsiventral, y usualmente tienen de 5 a 7 septos, con una célula basal distintiva en forma de pie. Su tamaño puede variar entre 25-120 μm , los macroconidios pueden ser también producidos por monofiálides o en conidióforos bifurcados (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 9).

Es un saprofito común del suelo, asociado con enfermedades de los cultivos de importancia agrícola, que abarcan la mayoría de los cereales y recientemente fue encontrado en plantaciones de *Jatropha* (Punja *et al.*, 2008; Valencia, 2014).

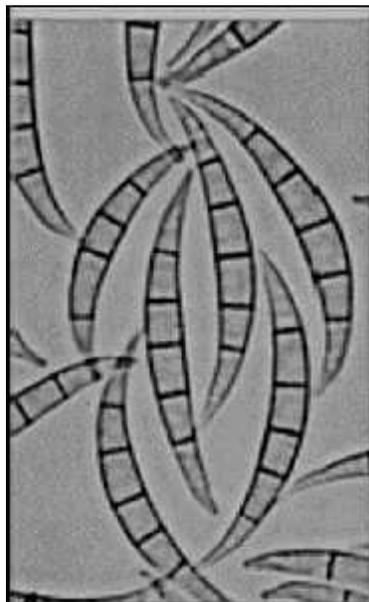


Figura 9. Microconidios de *Fusarium equiseti* (Nelson *et al.*, 1994).

1.2.4.6. *Fusarium solani* (Mart.) Sacc

Fusarium solani es uno de los principales patógenos que causan enfermedades de pudrición en plantas (Agris, 2005; Gupta *et al.*, 2004.; Gaetan *et al.*, 2007). Se caracteriza por presentar, cuando se cultiva en medio Agar papa dextrosa (PDA), micelio blanco crema, los macroconidios tienen entre tres y cuatro septos en promedio, ligeramente curvados, bastante anchos, de pared gruesa, y con un extremo apical ligeramente romo (Fig. 10). Los microconidios son abundantes, ovalados en forma de riñón, y forman cabezas falsas en monofiliades muy largas. Las clamidosporas son abundantes (Luginbuhl, 2010). Se ha encontrado infectando a soya, frijol, yuca, papa, entre otros. Causa podredumbre de las frutas y raíces, así como marchitamiento de las partes superiores de la planta (Oliveira y Costa, 2002; Poltronieri *et al.*, 2002). Recientemente fue aislados en plántulas de *Jatropha* en Muna, Yucatán (Valencia, 2014).

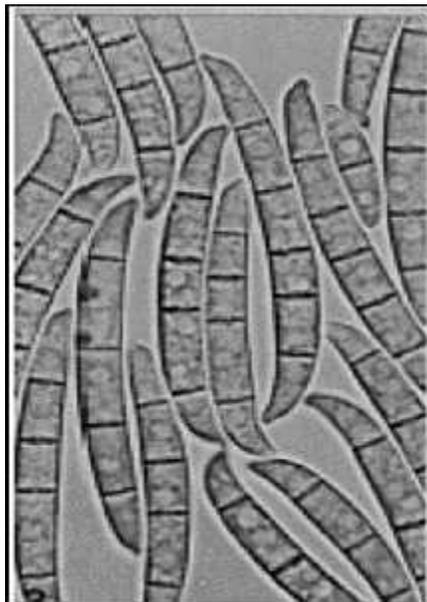


Figura 10. Microconidios *Fusarium solani* (Nelson *et al.*, 1994).

1.2.4.7. Sclerotium rolfsii Sacc. (Teleomorfo: Athelia rolfsii (Curzi))

Es un hongo fitopatógeno, habitante del suelo, que causa daño a una amplia gama de cultivos agrícolas de gran importancia económica (a más de 500 especies de plantas en todo el mundo) (Cilliers *et al.*, 2000). Este patógeno es un fenómeno generalizado en las regiones templadas y subtropicales del planeta.

Esta especie produce esclerocios y micelio estéril; los esclerocios, se caracterizan por ser pequeños, esféricos, de color marrón oscuro o negro (Punja y Rahe, 1992) de tamaño aproximado de 4-7 por 3-5 μm . La masa de micelio que se produce, segrega ácido oxálico, así como enzimas pectinolíticas, celulolíticas, y algunas otras enzimas que matan y desintegra tejidos, antes de que realmente penetre el hongo en el huésped, razón por la cual causa un efecto de putrefacción de los tejidos afectados. Una vez establecido en las plantas, genera micelio y esclerocios con bastante rapidez (los esclerocios se empiezan a desarrollar de 4 a 7 días del crecimiento micelial), especialmente en alta humedad y alta temperatura (entre 30 y 35 °C) (Agrios, 2005). Entre las hortalizas que afecta, se

encuentran el pimiento, la berenjena, diversas lechugas, melón, pepino, sandía, alcachofa, remolacha, cebolla, rábano, zanahoria, apio, coliflor y numerosas plantas ornamentales. En México se ha encontrado en cebolla, apio, maní, tomate, tabaco, perejil, rábano, etc. (Flores-Moctezuma *et al.*, 2006). Recientemente, fue encontrado afectando plantaciones de Stevia, planta con un gran potencial económico, debido a las características del sabor dulce que poseen sus hojas (Jarma *et al.*, 2005).

1.3. Justificación

Los hongos fitopatógenos constituyen uno de los problemas principales en la agricultura, las enfermedades causadas por estos organismos son tradicionalmente controladas con agroquímicos sintético. Sin embargo se ha comprobado que provocan daños al ambiente y toxicidad en mamíferos. Una de las alternativas promisorias a esta problemática es la búsqueda de productos naturales antimicrobianos de origen vegetal, más amigables con el ambiente. Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios para defenderse, son menos persistentes e inoocuos que los productos sintéticos utilizados en la agricultura.

Estudios previos de plantas nativas de la Península de Yucatán, han demostrado que los extractos obtenidos de las raíces de *Acalypha gaumeri* colectadas en campo, tienen amplia actividad biológica para el control de diferentes fitopatógenos, principalmente hongos. Por lo tanto, es importante evaluar si la planta cultivada en condiciones *ex-situ* mantiene las propiedades antifúngicas contra diferentes hongos fitopatógenos.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Evaluar la actividad antifúngica de la raíz de *Acalypha gaumeri* cultivada *ex-situ* contra hongos fitopatógenos caracterizados molecularmente.

1.4.2. Específicos

- Obtener extractos acuosos, etanólicos e hidroalcohólicos (de tres poblaciones) de *A. gaumeri* propagadas *ex-situ*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *A. gaumeri* contra diferentes hongos fitopatógenos.
- Identificar y caracterizar molecularmente a los hongos fitopatógenos evaluados contra los extractos de *A. gaumeri*.

1.5. Hipótesis

Los extractos obtenidos de las raíces de *Acalypha gaumeri* propagadas en condiciones *ex-situ* mantienen sus propiedades antifúngicas.

1.6. Estrategia Experimental

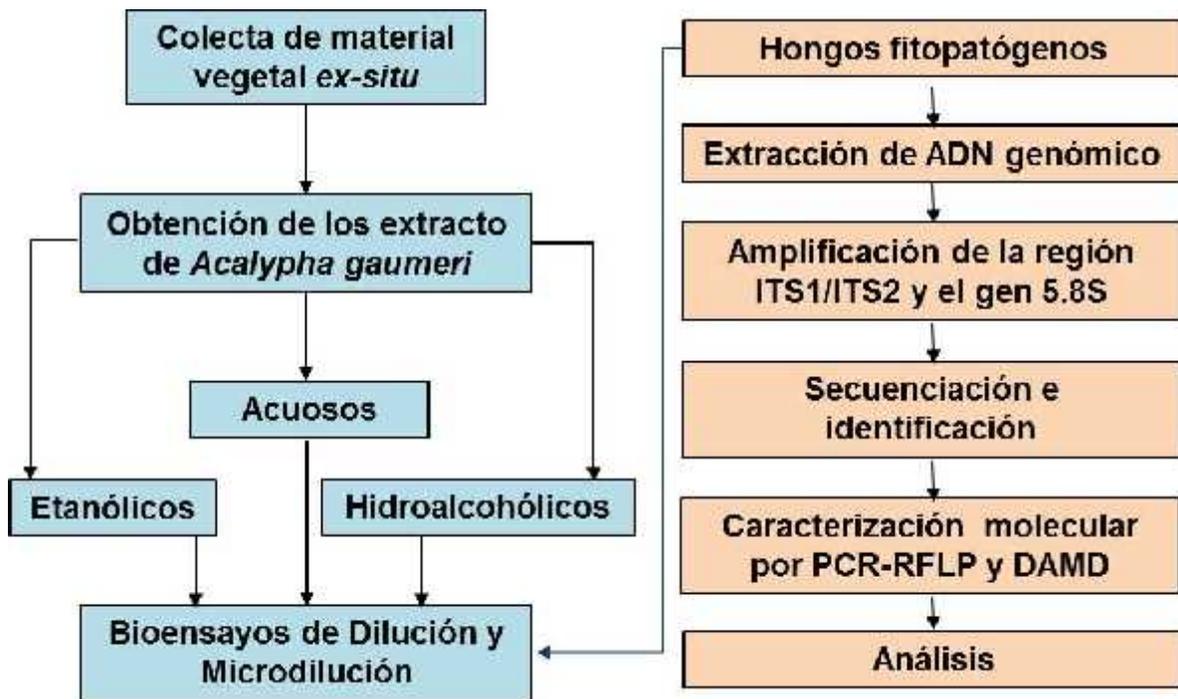


Figura 11. Estrategia experimental

1.7. Referencias

- Acosta, M. (2002). La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del mango (*Mangifera indica* L) cv. Haden, patogenicidad, control químico, manejo y epidemiología. Tesis de doctorado. Colegio de posgraduados. Estado de México 131p.
- Agrios, N. G. (2005). Plant pathology. Dreilbebis, D. (Ed). Quinta Edición. San Diego California 993 pp.
- A-Li Chai, Yan-Jie Zhao, Yan-Xia Shi, Xue-Wen Xie & Bao-Ju Li (2014) Identification of *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler causing anthracnose on pumpkin in China, Canadian Journal of Plant Pathology, 36: 121-124
- Ali-Shayehd, M., R. Yaghmour, Y. Faidi, K. Salem y M. Al-Nuri (1998). Antimicrobial Activity of 20 Plants used in Folkloric Medicine in the Palestinian Area. Journal of Ethnopharmacology 60: 265-271.
- Applied Molecular Genetics Laboratory, CIMMYT, int. (1996). Molecular marker applications to plant breeding. Workshop, 14 October-1 November, 1996. CIMMYT Headquarters, El Batán, México, pp. 6-7.
- Bailey, J. A., R. J O'Connell,.; R. J. Pring,. y C. Nash. (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. Biology, Pathology and Control. (ed). CAB International, Wallingford, UK. pp. 88-120.
- Bailey, J. A. y M. J. Jeger. (1992). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB Berlin, Stuttgart: J. Cramer in der Gebr. Borntraeger science publisher. pp. 134-166.
- Bautista, M. N., Alvarado, J. L. Chavarín, y Sánchez A. S. (2002). Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 237 p.

- Bial-Aristegui. (2002). *Alternaria alternata* (Fries) Keissler. Revista Iberoamericana de Micología. 46 p.
- Cabrera, M.G., R. E. Álvarez, N. T. Sosa de Castro y L. A. Sosa (2004). Patógenos de *Chrysanthemum* sp. en cultivos de las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A028.
- Cáceres A., A. Álvarez, A. Ovando y B. Samayoa (1991). Plant used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram positive bacteria. Journal Ethnopharmacology 31: 193-208
- Camargo, S., V. García y R. Muciño (2000). ¿Qué es la Fitopatología? Hongos entomopatógenos del crisantemo (*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvelev), un estudio de caso. Contacto S. 37: 9-22
- Chen, Y., B. A. Prior, G. Shi, y Z. Wang (2011). A rapid PCR-Based Approach for Molecular Identification of Filamentous Fungi. The Journal of Microbiology, 49: 675-679.
- Cooke D.E.L., V. Young, P.R.J. Birch, R. Toth, F. Gourlay, J.P. Day, S.F. Carnegie, y J.M. Duncan. (2003). Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995–97). Plant Pathology. 52:181–192
- Chi Romero F. (2005). Evaluación del potencial fungicida de los extractos etanólicos de diez plantas nativas de la Península de Yucatán. Tesis en la opción al título de químico industrial. Facultad de ingeniería Química. 41p.
- Cilliers, A. J., L. Herselman, y Z. A. Pretorius (2000). Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. Phytopathology, 90: 1026-1031.

- Cristóbal, A. J., J. M. Suarez, S. C. Moguel, N. M. Marbán, L. B. Medina, P.P. Sima, S. R. Peraza y M. M. Gamboa, A (2006). *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. *Nematropica* 36: 89-98.
- Cruz-Estrada A., M. Gamboa-Angulo, R. Borges-Argáez. y E. Ruiz-Sánchez (2013). Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). *Electronic Journal of Biotechnology*. 16: 1-9.
- De Los Ríos C, D. Hidalgo, M. Quintero, G. Márques y O. Crescente (1999). Estudio preliminar *in vitro* de la actividad biológica de *Chromolaena voglii* (Robinson) H. Huber. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 36: 2-5.
- Dimayuga R. y García. (1991). Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal Ethnopharmacology*. 31: 181-182.
- Domsch, K. H.; W. Gams y T. H. Anderson: *Compendium of Soil Fungi*, Acad. Press, vol. 1, 1980.
- Dunlap, J. C., K. A. Borkovich, M. R. Henn, G. E. Turner, M. S. Sachs, N. L. Glass, K. McCluskey, M. Plamann, J. E. Galagan, B. W. Birren, R. L. Weiss, J. P. Townsend, J. J. Loros, M. A. Nelson, R. Lambreghts, H. V. Colot, G. Park, Y. P. Collopy, C. Ringelberg, C. Crew, L. Litvinkova, D. DeCaprio, H. M. Hood, S. Curilla, M. Shi, M. Crawford, M. Koerhsen, P. Montgomery, L. M. LarsonPearson, T. Kasuga, C. Tian, M. Basturkmen, L. Altamirano y J. Xu (2007). Enabling a community to dissect an organism: overview of the neurospora functional genomics project. *Advances in Genetics*. Academic Press. 57: 49-96.
- Elmeer K y A. Almalki (2011). DNA finger printing of *Prosopis cineraria* and *Prosopis juliflora* using ISSR and RAPD techniques. *American Journal of Plant Sciences*. 2: 527-534.

- Flores–Moctezuma, H.E., R. Montes–Belmont, y R. Nava–Juarez (2006). Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico and its potential control through solarization and organic amendments. *Crop Protection* 25: 195-201.
- Fries, E. (1832). *Systema Mycologicum*, Vol.I. Officina Berlingianalund, p.520.
- Gadanho, M., J. Almeida, y J. P. Sampaio (2003). Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek*. 84: 217-227.
- Gadanho, M. y J. P. Sampaio (2002). Polyphasic taxonomy of the *basidiomycetous* yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis sensu stricto* and *Rh. dairenensis*. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*. 2: 47-58.
- Gaetan, S.A., M.S. Madia y A. Perez (2007). Recent outbreak of *Fusarium crown* and root rot caused by *Fusarium solani* on marjoram in Argentina. *Australian Plant Disease Notes*. 2: 15-16.
- Gamboa-Angulo, M. M., A. J. Cristóbal, L. Medina, R. F. Chi, G. R. Méndez, P. P. Sima, y P. May (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 24: 1955-1959.
- Giani, C. (1997). Usual clinical features of fingernail infection by *Fusarium oxysporum*, *Mycoses*. 40: 455-459
- Gupta M.L., H. O. Mishra, A. Kalra y S. P. S. Khanuja (2004) Root rot and wilt: a new disease of Ashwagandha (*Withania somnifera*) caused by *Fusarium solani*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science* 26: 285-287.
- Gupta, M., Y.S. Chyi, J.R. Severson, J. L. Owen (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 89: 998-1006.

- Heath, D.D., G. K. Iwana y R. H. Delvin (1993). PCR primed with VNTR core sequences yield species specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acids Research*. 21: 5782-5785.
- Hernández, H. M., A. N. Garcia Aldrete., F. Alvarez y M. Ulloa (2001). Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Instituto de Biología, UNAM, México, pp. 15-37.
- Hernández, C.F.D., S. R. H. Lira., C. L. Cruz, M. G. Gallegos, C. M. E. Galindo, C.E. Padrón y S. M. Hernández (2008). Antifungal potential of *Bacillus* sp. strains and *Larrea tridentata* extracts against *Rhizoctonia solani* in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 77: 119-126
- Hernández, J.T., M. Sanabria, J. Quintos, García y N. Romero (1998). Estudio preliminar de especies vegetales contra fitopatógenos. En: Resúmenes del IX Congreso Mexicano de Etnobiología. La Asociación de Etnobiológica Mexicana y el Instituto Tecnológico Agropecuario N 23, Xoxocatalán, Oaxaca. p 49.
- Hyde K.D., L. Cai, P. F. Cannon, J. A. Crouch, P. W. Crous, U. Damm, P. H. Goodwin, H. Chen, P. R. Johnston, E.B.G. Jones, Z. Y. Liu, E. H. C. McKenzie, J. Moriwaki, P. Noireung, S. R. Pennycook, L. H. Pfening, H. Prihastuti, T. Sato, R. G. Shivas, Y. P. Tan, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, Y. L. Yang y J. Z. Zhang (2009). *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.
- Jarma, A., T. Rengifo, y H. Araméndiz-Tatis (2005). Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. *Agronomía Colombiana*, 23: 207-216.
- Jeffries, P., J. C. Dodd, M. J. Jeger, y R.A. Plumbly (1990). The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology* 39: 343–366.

- Keissler, K. V. (1912). Zun Kenntnis den Pilzflora Krains. Beihefte zum Botanischen Centralblatt, 29: 395-400.
- Kosiak E. B., A. Holst-Jensen, T. Rundberget, M.T. Gonzalez Jaen, M. Torp. (2005). Morphological, chemical and molecular differentiation of *Fusarium equiseti* isolated from Norwegian cereals. Journal Food Microbiology, 99:195–206
- Kurtzman, C. P. y J. Piskur (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts en: Topics in Current Genetics. Stefan Hohmann (Eds).USA. Springer Berlin Heidelberg. pp 24-41.
- Libkind, D. (2007). Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. Revista Argentina de Microbiología. 39:133-137.
- Luginbuhl, S. (2010). *Fusarium solani*. NC State University. A class project for PP728 Soilborne Plant Pathogens.
- Leslie, J. F. y B. A. Summerell (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell publishing. p 369.
- Mani, A., R. Mishra y G. Thomas (2011). Elucidation of diversity among *Psidium* species using morphological and SPAR methods. Journal phytopathology. 3: 53-61.
- Marín, D., R. Romero, M. Guzmán y T. Sutton (2003) Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Disease, 87: 208–222
- Mentaberry, A. (2007). Curso: Resistencia a hongos fitopatógenos mediante ingeniería genética. Universidad de Buenos Aires: Departamento de Fisiología, Biología Molecular y celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Nelson, P., M. C. Dignan y E. J. Anaissie (1994). Taxonomy, biology and clinical Aspect of *Fusarium* species. Clinical Microbiology Review, 7: 479-504

- Neppelenbroek, K. H., N. H. Campanha, D. M. P. Spolidorio, L. C. Spolidorio, R. S. Seo y A. C. Pavarina (2006). Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Diseases*. 12: 242-253.
- Oliveira, V.C., y J. L. S. Costa (2002). Restriction analysis of rDNA (ARDRA) can differentiate *Fusarium solani* f. sp. phaseoli from *F. solani* f. sp. glycines. *Fitopatologia Brasileira*, 27:631-634,
- Orberá, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21:15-19.
- Padial, J. M., y De La Riva (2007). Integrative Taxonomists Should Use and Produce DNA Barcodes. *Systematic Biology*, 1586: 67-68.
- Pardo, G.A. y O. E. Duran (1999). Revisión taxonómica del género *Fusarium*. *Revista de investigaciones, Universidades de Pamplona*, 3:133-146
- Pavón-Moreno, M. A., R Martín de Santos. y T García Lacarra (2009). Diferenciación de grupos de especies del género *Alternaria* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3:119-128
- Ploetz, R.C. (1994). Anthracnose. p. 35–36. In: R.C. Ploetz, GA. Zentmyer, W.T. Nishijima, K.G. Rohrbach and H. D. Ohr (eds). *Compendium of tropical fruit diseases*. APS Press. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 88 p.
- Poltronieri, L.S., Trinidad, D.R., Albuquerque, F.C., Duarte, M.L.R. y Cardoso, S.S. (2002). Incidence of *Fusarium solani* in annulled in the State of Pará, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 544.
- Prusky, D., S. Freeman y M. B. Dickman (2000). *Colletotrichum* Host specificity, pathology, and host–pathogen interaction. APS Press, the American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 393 p.

- Meneses-Morales, y R.T. Hanlin (1996). Appresoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) sacc. Causal agent of anthracnoses diseases. *Revista de microbiologia*. 27: 247-251.
- Punja, ZK, J.E. Rahe (1992). *Sclerotium*. In: Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. (Eds.): L.L. Singleton, J.D. Mihail and C.M. Rush. St. Paul: APS Press. pp. 166-170.
- Ralph, D. y M. McClelland (1998). Arbitrarily Primed Methods for Studying Bacterial Diseases en: *Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications*. Woodford, N. y Johnson, A. P. (Eds). USA. Humana Press Inc. pp 83-101.
- Rao, V. G. (1969). The Genus *Alternaria*-from India. *Nova Hedwigia*, 17: 219-258.
- Ranade, S.A., T. S. Rana. y D. Narzary (2009). SPAR profiles and genetic diversity amongst pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15:61-70.
- Romero-Cova, S. (1996). *Plagas y Enfermedades de Ornamentales*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. 244 p.
- Sanabria, A., A. Mendoza y A. Moreno (1998). Actividad microbiana in vitro de angiospermas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 27: 47-51.
- Shahid-Ahmed, K., I. Sheikh-Muhammad y Abida-Akram. (2006). *In vitro* efficacy of plant leaf extracts against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Mycopathology*. 4: 51-53
- Sharma, S.K., D. Rawat, S. Kumar y A. Kumar (2010). Single primer amplification reaction (SPAR) reveals intra-specific natural variation in *Prosopis cineraria* (L.) Druce. *Trees structure function*. 24: 855-864.

- Sharma, S.K., S. Kumaria, P. Tandon y S. R Rao (2011). Single primer amplification reaction (SPAR) reveals inter- and intra-specific natural genetic variation in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Gene*. 483: 54-62.
- Shenoy, B. D., R., W. H. Jeewon, D. J. Lam, P. P. Bhat, P. W. J. Than, Taylor y K.D., Hyde (2007). Morphomolecular characterisation and epitypification of *Colletotrichum capsici*, causal agent of anthracnose in chilli. *Fungal Diversity*, 27:197-211.
- Sidow, H. (1913). Beitrage Zur Kenntnis der pilzflora des siidlinchen Ostindiens I. *Annales Mycologici*. 11: 329-330
- Sobers, E. K. (1965). *Alternaria chrysanthemi* in Florida. Annual meeting of the Florida State Horticultural Society, 78: 419-422
- Summerell B.A., J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden y L. W. Burgués (2001). *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium: American Phytopathological society press. St, Paul, Minnessota. USA, 408 pp.
- Torres-Calzada, C., R. Tapia-Tussell, I. Higuera-Ciapara y D. Perez-Brito (2012). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *Europe Journal Plant Pathology*. 135:67-79
- Tosti, A, B. M. Piraccini y Lorenzi S. (2000). Onycomycosis causated by no dermatophytic molds clinical features and response to treatment of 59 cases. *Journal of American Academic Dermatology*, 42:217-124.
- Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada A., Ruelas, C., García, H.S. and Tiznado-Hernández, M. (2005). Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1427-1434

- Tun, S.J., P. M. Castillo, A. J. Cristóbal y M. L. Latournerie (2011). Etiología de la mancha foliar del chile dulce (*Capsicum annuum* L.) y su control in vitro en Yucatán. *Fitosanidad*.15: 5-9
- Vanderpan, S. (1994). A look inside a new Tomato. *Journal Food Agriculture Environment* 7:2-5
- Van der Vossen, J. M., B. M. Rahaoui, H. de Nijs, y B. J Hartog (2003). PCR methods for tracing and detection of yeast in the food Chain. In: *Yeast in Food*. (Boekhout, T. and Robert, V. ed.) CRC Press LLC, Boca Ratón, FL, USA, pp 123-138.
- Van Hemelrijck, W., J. Debode, K. Heungens, M. Maes y P. Creemers (2010). Phenotypic and genetic characterization of *Colletotrichum* isolates from Belgian strawberry fields. *Plant Pathology*, 59:853-861.
- Vargas Díaz, A. A. (2009). Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* and croser. En V. D. A., Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* Simmon and croser. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 123p
- Waller, J. M. (1992). *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In Bailey, J. A. and Jeger, M. J. [Eds.] *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 167-185.
- Welsh, J., y M. McClelland (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18: 7213–7218.
- Williams, J.G.K., A.R. Rubelik, K. J. Livak, A. Rafalski y S. V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531–6535.
- William, C. B. (1996). Statistical analysis of arbitrarily primed PCR patterns in molecular taxonomic studies in methods in molecular biology. *Species diagnostics protocols*

PCR and other nucleic acid methods. (Clapp, J. P. Eds). USA. Humana Press Inc.
pp 39-55.

CAPÍTULO 2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE TRES POBLACIONES DE ACALYPHA GAUMERI PROPAGADAS EX-SITU Y SU EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA

2.1. Introducción

Uno de los grandes problemas que existe en las plantaciones comerciales, es la disminución de los rendimientos esperados. Estas mermas son causadas muchas veces por enfermedades y plagas, siendo las enfermedades fúngicas las más devastadoras. Los fitopatógenos fungosos han tenido un impacto importante en la historia, se estima que aproximadamente el 70% de todas las enfermedades de los cultivos principales son causadas por hongos (Hanson, 2008). El daño que ocasionan no sólo se limita a las pérdidas desde el punto de vista económico, sino también a las pérdidas biológicas. Lo anterior se refiere, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes de estos organismos, así como también a la afectación de los diferentes órganos que se destinan para el consumo (como flores y frutos) e incluso a las pérdidas postcosecha en frutas y granos almacenados (Rodríguez, 2001).

Para controlar las enfermedades causadas por los hongos, desde hace varias décadas, se han usado los productos agroquímicos sintéticos (fungicidas) y recientemente semisintéticos, que continúan siendo el factor de mayor importancia para asegurar la producción. Sin embargo, se ha comprobado que el uso de los agroquímicos provoca diversos efectos secundarios, entre los que se incluyen: resistencia en los organismos patógenos (Hernández-astillo *et al.*, 2008), eliminación de enemigos naturales, acumulación de residuos tóxicos en los productos agrícolas y contaminación del ambiente (Hernández-Astillo *et al.*, 2008, Gossen y Rimmer, 2001).

Por lo anterior, se ha incrementado la necesidad de buscar alternativas amigables con el ambiente. Una estrategia que está cobrando fuerza, es la aplicación de productos naturales de origen botánico. Esto debido a que las plantas han demostrado la capacidad de biosintetizar metabolitos con propiedades biológicas de interés y a su baja residualidad en el ambiente.

En trabajos previos en los laboratorios de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., se evaluaron plantas endémicas de la península de Yucatán con propiedades antifúngicas. La especie *Acalypha gaumeri* demostró ser prometedora con los resultados antifúngicos que se obtuvieron al evaluar los extractos de su raíz (Gamboa-Angulo, *et al.*, 2008). Esto se comprobó posteriormente con los resultados reportados por Vargas-Díaz, (2014), la cual evaluó extractos de *A. gaumeri* colectados en campo, contra diferentes hongos fitopatógenos aislados en diferentes cultivos. Paralelamente, se propagaron por esqueje, plantas provenientes de tres poblaciones diferentes de *A. gaumeri*.

Por todo lo anterior, el presente trabajo se enfoca en obtener los extractos de plantas de *A. gaumeri* que fueron sembradas en invernadero, en condiciones controladas, y evaluar si mantienen dichas propiedades antifúngicas. La finalidad del presente trabajo es dar un uso sustentable a la planta y al mismo tiempo controlar las enfermedades causadas por hongos, sin causar daño al ambiente.

2.2. Materiales y métodos

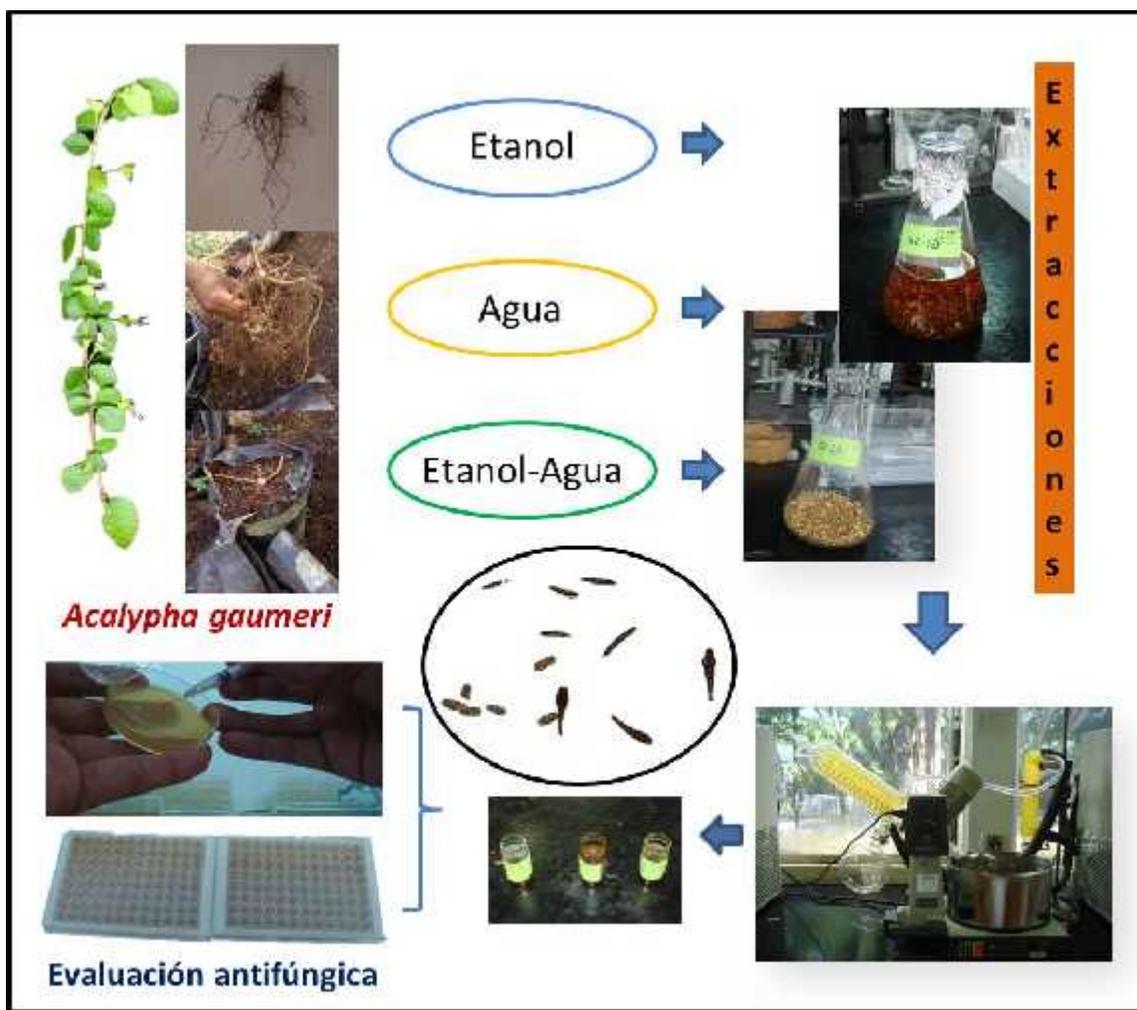


Figura 12. Estrategia experimental de la evaluación antifúngica de los extractos de *A. gaumeri*.

2.2.1. Colecta y preparación del material vegetal para la elaboración de los extractos

Las plantas de *A. gaumeri* se colectaron en el invernadero del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., a dos años cultivo (Vargas-Díaz, 2014 Comm. Pers). Cabe mencionar que estas plantas se colectaron originalmente de tres diferentes poblaciones en el estado de Yucatán (Oxkutzcab, Tinum y Yaxcabá).

Una vez colectado el material vegetal, se separó la parte radicular para el estudio. Se eliminó manualmente la mayor parte posible de suelo y posteriormente se lavaron las raíces con abundante agua, se dejaron secar por 15 días, y se trituraron con un molino de cuchillas marca Pagani, con malla número 5. Las raíces se pesaron, embolsaron y etiquetaron y se almacenaron hasta su uso.

2.2.2. Obtención de los extractos

2.2.2.1. Extractos etanólicos

La obtención del extracto etanólico (**EE**) de *A. gaumeri* se realizó de la siguiente manera: 10 g de raíces de la planta se maceraron a temperatura ambiente con 300 mL de etanol (EtOH), a los tres días, se decantó y se filtró a través de papel de filtro (Whatman no. 1). El disolvente se eliminó a vacío en un rotavapor (marca Büchi, modelo 461) con baño María a 40 °C, hasta evaporar la mayor cantidad posible del disolvente presente en la muestra. Esto se realizó tres veces, hasta obtener el extracto crudo seco (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). El extracto se transfirió a viales y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

2.2.2.2. Extractos hidroalcohólicos

Los extractos hidroalcohólicos (**EHA**) se obtuvieron de igual manera que los extractos etanólicos (metodología descrita en la sección 2.2.2.1), usando como disolvente orgánico etanol-Agua destilada (1:1). El etanol se eliminó en un rotavapor con baño María y la parte acuosa se liofilizó hasta obtener el EHA completamente seco, por último se transfirió a un vial y se almacenó hasta su uso

2.2.2.3. Extractos acuosos

El extracto acuoso (**EA**) fue obtenido de la siguiente manera: se pesaron 3 g de raíces y se colocaron en un matraz al cual se agregaron 100 mL de agua a punto de ebullición (100 °C), se dejó reposar durante 20 min y posteriormente, la infusión obtenida se filtró a través de papel filtro, por último se aforó nuevamente a 100 mL. Para esterilizar los

extractos acuosos, se pasaron por una columna de filtrado de 0.22 μm de la marca Sterivex™, y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2.2.3. Preparación de los extractos.

Los extractos EA y EHA se prepararon a una concentración de $80\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para realizar los bioensayos en microdilución. En el caso del extracto acuoso, se esterilizó a través de un filtro Millipore de $0.22\ \mu\text{m}$, como se describió anteriormente.

2.2.4. Bioensayos

2.2.4.1. Las cepas de hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos utilizados en la evaluación de actividad antifúngica, fueron suministrados por el Laboratorio GeMBio y el cepario de la unidad de Biotecnología, del Centro de investigación Científica de Yucatán A.C. Estas cepas corresponden a aislamientos fungosos obtenidos de plantas de la región.

Cuadro 1. Cepas fitopatógenas utilizadas para evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Acalypha gaumeri* propagada *ex-situ* y su método de evaluación.

Cepa	Clave	Hospedero	Medio de cultivo	Bioensayo usado
<i>Alternaria Alternata</i>	JG14	<i>Jatropha curcas</i>	PDA	Dilución en agar
<i>Alternaria Alternata</i>	JG32	<i>Jatropha curcas</i>	V8	Microdilución
<i>Alternaria chrysanthemi</i>	CICY004	<i>Dendranthema grandiflorum</i>	V8	Microdilución
<i>Athelia rolfsii</i>	AT18	<i>Stevia rebaudiana</i>	PDA	Dilución en agar
<i>Colletotrichum capsici</i>	CCP27	<i>Carica papaya</i>	PDA	Microdilución
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CGP6	<i>Carica papaya</i>	PDA	Microdilución
<i>Fusarium equiseti</i>	JG22	<i>Jatropha curcas</i>	PDA	Dilución en agar
<i>Fusarium solani</i>	JG2	<i>Jatropha curcas</i>	PDA	Microdilución

<i>Athelia rolfsii</i>	AT18	<i>Stevia rebaudiana</i>	PDA	Dilución en agar
------------------------	------	--------------------------	-----	------------------

2.2.5. Bioensayo en microdilución

Los EE y EHA disueltos en DMSO (dimetilsulfóxido) se transfirieron a una microplaca estéril de 96 pozos. Inicialmente, a los pozos de la primera fila de la microplaca se les adicionaron 190 μL de medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) marca Sigma. Posteriormente, se les adicionó 10 μL de los extractos ($80 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Un volumen total de 100 μL de esta mezcla homogénea, se transfirieron a los pozos de la segunda fila en los que se habían colocado previamente 100 μL de RPMI 1640 y así sucesivamente hasta la fila No. 4, de la cual se desecharon 100 μL de cada pozo. Finalmente, se adicionaron 100 μL en cada pozo de la suspensión de esporas del hongo fitopatógeno a evaluar, para obtener un volumen total de 200 μL por pozo, con una concentración final de 2000, 1000, 500 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de los extractos orgánicos.

En el caso de los extractos acuosos, a la primera fila de pozos se les adicionaron 150 μL de medio RPMI 1640, y posteriormente 50 μL del extracto acuoso al 12 % (120 mg mL^{-1}). Un volumen total de 100 μL de esta mezcla homogénea se transfirió de cada pozo a la segunda fila, que previamente contenía 100 μL de RPMI 1640 y así sucesivamente hasta la fila No. 3, logrando de esta manera las diluciones. Finalmente, se adicionaron 100 μL de la suspensión de esporas del hongo fitopatógeno en cada pozo, para obtener un volumen total de 200 μL con una concentración final de 3, 1.5, y 0.75% de los extractos acuosos (30, 15 y 7.5 mg mL^{-1}).

En todos los bioensayos se emplearon controles de esterilidad del medio, como control negativo de crecimiento se empleó el blanco, medio RPMI 1640 y la suspensión de esporas con DMSO al 2.5 %; como control positivo se usó el fungicida comercial Mirage a concentraciones de 2000, 1000, 500 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las microplacas se incubaron a diferentes condiciones de temperatura y fotoperíodo, dependiendo del fitopatógeno a evaluar. La concentración final de la suspensión de esporas evaluadas varió de acuerdo a las características de cada fitopatógeno: *Alternaria alternata* y *Alternaria chrysanthemii*: 2.5×10^4 ; *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium solani*: 5×10^4 .

El ensayo terminó a las 96 horas, seguidamente se realizó la lectura de la placa. Las pruebas se realizaron por cuadruplicado y se observaron a las 24, 48, 72 y 96 horas (NCCLS, 2002).

2.2.5.1. Lectura de la microplaca

La lectura se realizó mediante la escala numérica establecida por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Primero se verificó que en los controles de medio RMPI 1640 con el fitopatógeno, la germinación y crecimiento micelial fueran exitosos (control negativo); por el contrario estos parámetros se inhiben con el fungicida comercial (control positivo), donde debía haber ausencia de germinación y de elongación hifal. El porcentaje de inhibición de la germinación y del crecimiento micelial se determinaron mediante la siguiente fórmula, y con la escala establecida por el NCCLS.

$$\% \text{ IC} = \frac{C_{\text{neg}} - c. \text{ muestra}}{C_{\text{neg}}} \times 100$$

Figura 13. Fórmula para evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento. Cneg: control negativo (cm); c.muestra: crecimiento de la muestra (cm).

Cuadro 2. Escala numérica de la inhibición del crecimiento en el bioensayo de microdilución en microplaca (NCCLS, 2002).

Parámetros	Escala asignada
Crecimiento normal	4
Ligera reducción del crecimiento o que contiene un 75% de crecimiento comparado con el control negativo.	3
Prominente reducción del crecimiento o un 50% comparado con el control negativo.	2
Poco crecimiento con tan solo el 25% del crecimiento del control negativo.	1

Inhibición total, comparando con el control negativo.	0
---	---

2.2.6. Bioensayo de dilución en agar

Los extractos se mezclaron en Agar dextrosa y papa (PDA); MCD LAB™ estéril, cuando estaban a 50 °C, aproximadamente, con una concentración final de 2000 µg mL⁻¹. Posteriormente se dosificaron 10 ml del medio con extracto en una placa Petri de 60 x 15, se dejaron gelificar y se esperaron 24 horas para comprobar su esterilidad. Transcurrido este período, se inocularon las placas, colocando un disco de 0.6 cm de diámetro del hongo a evaluar en el centro de las mismas. Los experimentos se hicieron con cuatro réplicas por cada extracto evaluado y se midió el crecimiento micelial cada 24 horas perpendicularmente. El experimento concluyó hasta observar que el control positivo cubriera toda la placa Petri, y por último se aplicó la fórmula para reportar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM).

2.2.7. Evaluación de los extractos contra la formación de esclerocios de *Athelia rolfsii*

La evaluación se realizó por la técnica de dilución en agar, inoculando un esclerocio en el centro de las placas Petri con PDA. Como control negativo de crecimiento se empleó el medio inoculado con un esclerocio; y como control positivo se usó Mirage a 0.25 µg mL⁻¹. Las placas se incubaron a 25 ± 2 °C con fotoperiodo 12h/12h por 25 días. Las pruebas se realizaron por cuadruplicado.

2.3. Resultados

2.3.1. Rendimiento de los extractos

Los mayores rendimientos se observaron con los EE de plantas originarias de Tinum con 4.04% de rendimiento total, como se puede observar en el cuadro 3. Los rendimientos más bajos correspondieron a los EA de plantas provenientes del municipio de Yaxcabá.

Cuadro 3. Rendimiento de los extractos (peso del extracto/100g planta seca) obtenidos de las tres poblaciones de *Acalypha gaumeri* cultivadas *ex-situ*.

Extractos	Oxkutzcab			Tinum			Yaxcabá		
	Clave	w (g)	Rend. (%)	Clave	W (g)	Rend. (%)	Clave	w (g)	Rend. (%)
Etanólicos	GI-1A	1.11	3.7	GI-2A	1.22	4.04	GI-3A	1.05	3.05
Hidroalcohólicos	GI-1B	0.95	3.18	GI-2B	0.94	3.15	GI-3B	0.94	3.13
Acuosos	GI-1C	0.185	3.08	GI-2C	0.176	2.93	GI-3C	0.2	3.28

1: Oxkutzcab A: Etanólicos
 2: Tinum B: Hidroalcohólicos
 3: Yaxcabá C: Acuosos

2.3.2. Evaluación de la actividad antifúngica por el bioensayo de Microdilución

A continuación se detallan los resultados obtenidos de los ensayos antifúngicos en microdilución contra *Alternaria alternata* (JG32), *Alternaria chrysanthemii* (CICY 004), *Colletotrichum gloeosporioides* (CGP6), *Colletotrichum capsici* (CCP27) y *Fusarium solani* (JG2).

Alternaria chrysanthemii

Los mejores resultados de las evaluaciones se detectaron con los EE de las poblaciones de Oxkutzcab y Yaxcabá a una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; seguida por la población de Tinum a una CMI de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 9). El efecto producido por el extracto etanólico se catalogó como fungicida. En el caso de los EHA, los

tres extractos de las diferentes poblaciones (GI-1B, GI-2B y GI-3B), presentaron una CMI a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, el EHA de Tinum mostró un 87% de inhibición del crecimiento de *A. chrysanthemi* a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Finalmente los EA (GI-1C, GI-2C y GI-3C), no demostraron efecto alguno contra *A. chrysanthemi* (Figura 14).

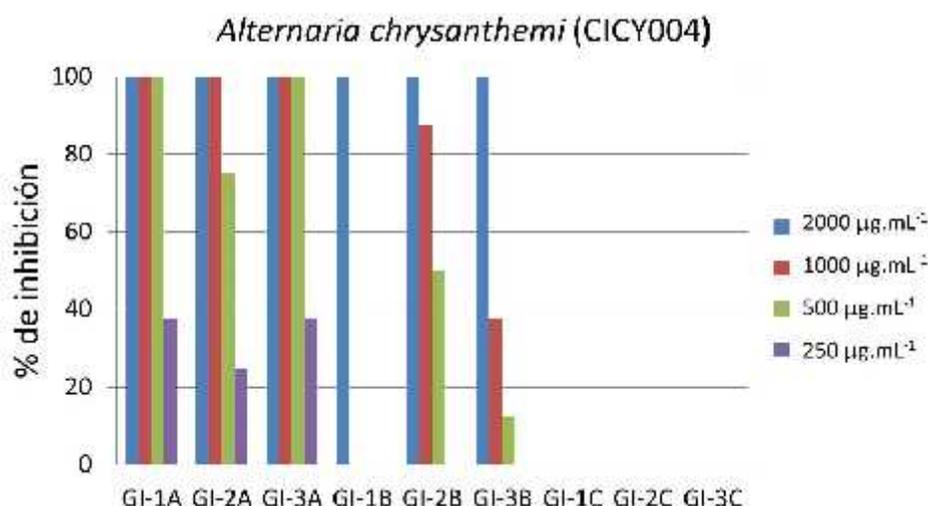


Figura 14. Efecto de los extractos de la raíz de *Acalypha gaumeri* a diferentes concentraciones, contra la cepa de *Alternaria chrysanthemi* (Cicy004) en el ensayo en microdilución. GI-1A: EE de Oxkutzcab; GI-2A: EE de Tinum; GI-3A: EE de Yaxcabá; GI-1B: EHA de Oxkutzcab; GI-2B: EHA de Tinum; GI-3B: EHA de Yaxcabá; GI-1C: EA de Oxkutzcab; GI-2C: EA de Tinum; GI-3C: EA de Yaxcabá.

***Alternaria alternata* (JG32)**

Esta cepa se evaluó por el método de microdilución contra *A. chrysanthemi*. El EE de Oxkutzcab mostró el mayor efecto de Inhibición del Crecimiento (IC) con una CMI de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los EE de Tinum y Yaxcabá también afectaron a esta cepa con una CMI a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. En el caso de los EHA el efecto de IC fue bajo, (IC = 50%) a una concentración de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los EA tuvieron una nula efectividad contra la cepa JG32 como se aprecia en la figura 15.

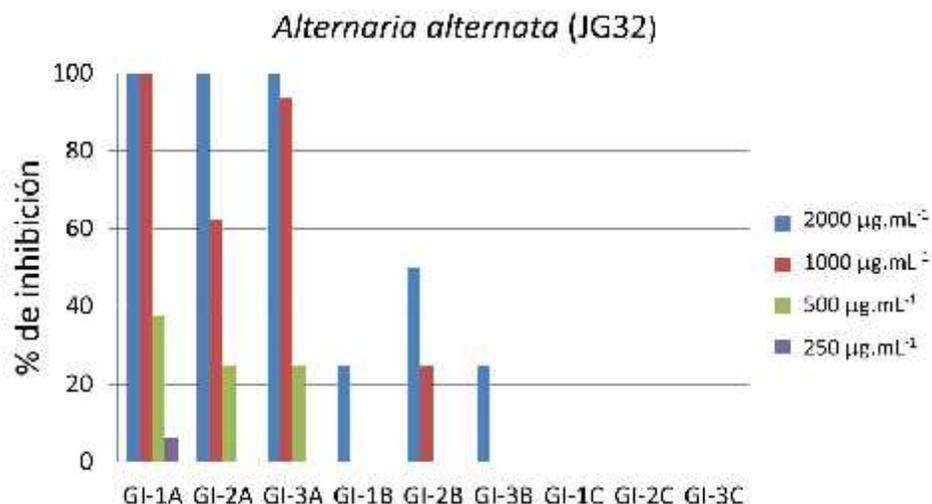


Figura 15. Actividad antifúngica de los extractos de la raíz de *Acalypha gaumeri* contra la cepa de *Alternaria alternata* (JG32) en el ensayo en microdilución. GI-1A: EE de Oxkutzcab; GI-2A: EE de Tinum; GI-3A: EE de Yaxcabá; GI-1B: EHA de Oxkutzcab; GI-2B: EHA de Tinum; GI-3B: EHA de Yaxcabá; GI-1C: EA de Oxkutzcab; GI-2C: EA de Tinum; GI-3C: EA de Yaxcabá.

Colletotrichum capsici y Colletotrichum gloeosporioides

Ninguno de los EE, EHA y EA de *A. gaumeri* presentó actividad antifúngica contra las cepas de *Colletotrichum capsici* y *Colletotrichum gloeosporioides* (IC > 31%) a 2000 µg mL⁻¹.

Fusarium solani

Las evaluaciones antifúngicas de los EE, EHA y EA de *A. gaumeri* contra *Fusarium solani* no presentaron actividad inhibitoria a una concentración de 2000 µg mL⁻¹

2.3.3. Evaluación de la actividad antifúngica por el bioensayo de dilución en agar

A continuación se detallan los resultados obtenidos de los ensayos antifúngicos en dilución contra *Alternaria alternata* (JG32), *Fusarium equiseti* (JG22) y *Athelia rolfsii* (AT18)

Alternaria alternata JG14

Los EE de *A. gaumeri* demostraron capacidad para inhibir el crecimiento de *A. alternata* JG14 (79 -89 %) a una concentración de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los EHA de las tres poblaciones también tuvieron una notable actividad con una IC del 77 – 85% a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Confirmando nuevamente que los EA no tuvieron efecto inhibitorio significativo, como se puede observar en la figura 16 y 17.

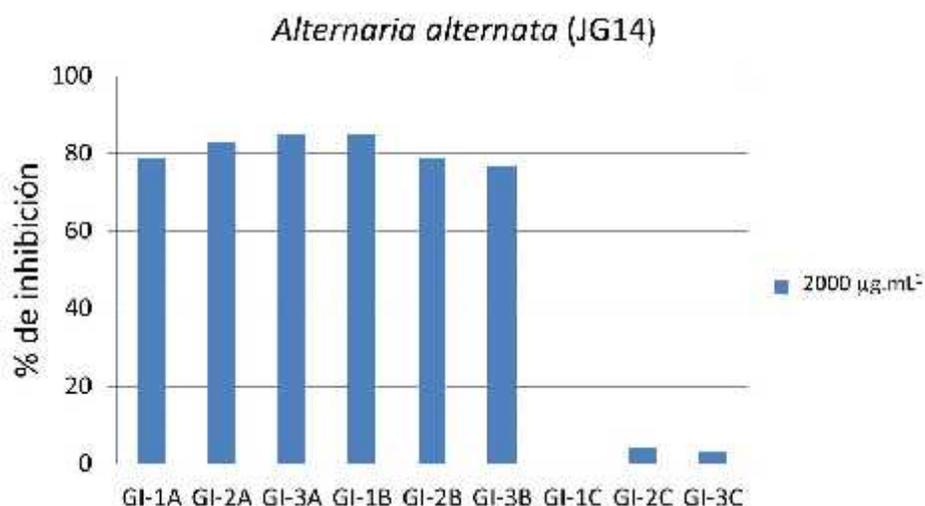


Figura 16. Evaluación de actividad antifúngica por el bioensayo de dilución en agar a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Alternaria alternata* (JG14). GI-1A: EE de Oxkutzcab; GI-2A: EE de Tinum; GI-3A: EE de Yaxcabá; GI-1B: EHA de Oxkutzcab; GI-2B: EHA de Tinum; GI-3B: EHA de Yaxcabá; GI-1C: EA de Oxkutzcab; GI-2C: EA de Tinum; GI-3C: EA de Yaxcabá.

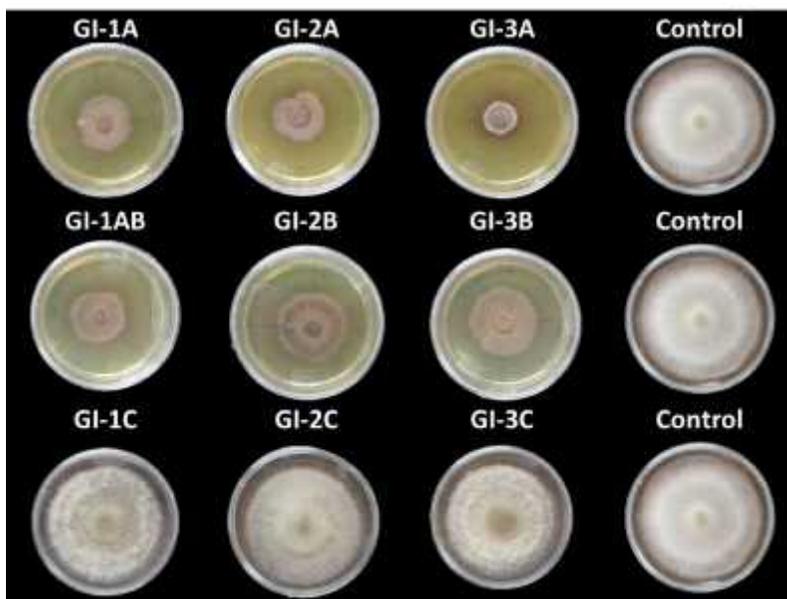


Figura 17. Actividad antifúngica de los extractos de la raíz de *Acalypha gaumeri* a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, ante la cepa de *Alternaria alternata* (JG14) en el ensayo método de dilución en agar.

Athelia rolfsii AT18

Los EE de *A. gaumeri* mostraron efecto inhibitorio del crecimiento de *A. rolfsii* (IC = 73 -77 %) a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otra parte, los EHA evaluados a la misma concentración mostraron un efecto similar (IC = 65 -79%): Los extractos acuosos no tuvieron capacidad antifúngica contra este patógeno (Figura 18 y 19).

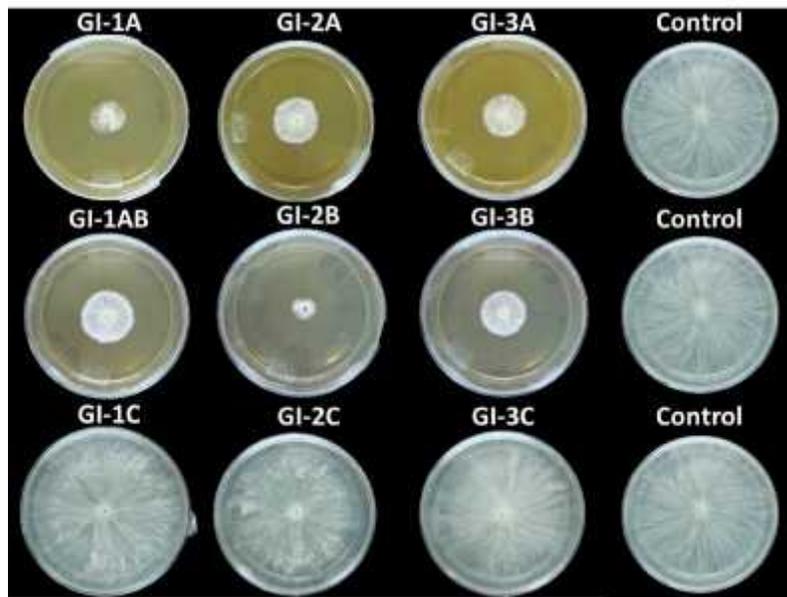


Figura 18. Efecto del crecimiento radial de la cepa *Athelia rolfsii* AT18 ante los extractos de *Acalypha gaumeri*.

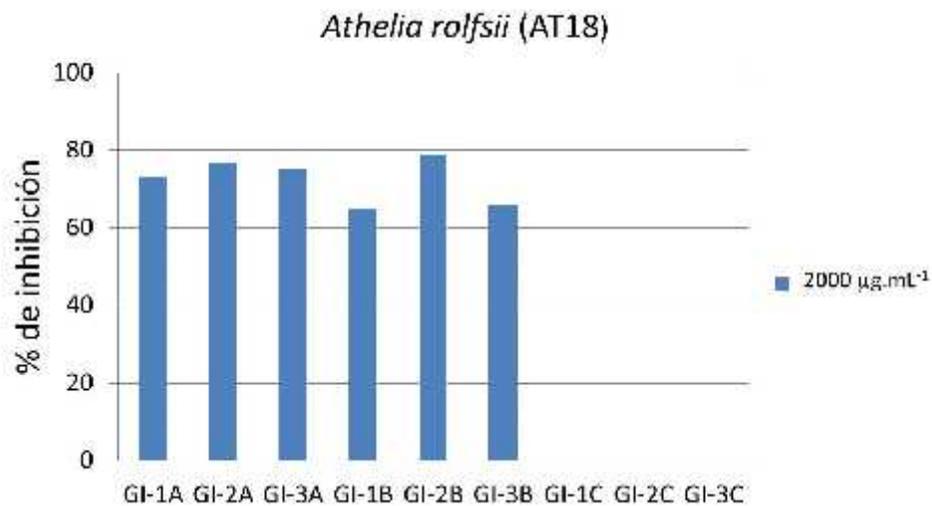


Figura 19. Evaluación de actividad antifúngica por el bioensayo de dilución en agar a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Athelia rolfsii* (AT18). GI-1A: EE de Oxkutzcab; GI-2A: EE de Tinum; GI-3A: EE de Yaxcabá; GI-1B: EHA de Oxkutzcab; GI-2B: EHA de Tinum; GI-3B: EHA de Yaxcabá; GI-1C: EA de Oxkutzcab; GI-2C: EA de Tinum; GI-3C: EA de Yaxcabá.

Fusarium equiseti (JG22)

Todos los extractos de *A. gaumeri* ocasionaron menos del 50% de inhibición de crecimiento de *F. equiseti*, por lo que se catalogaron como no activos (Figura 20).

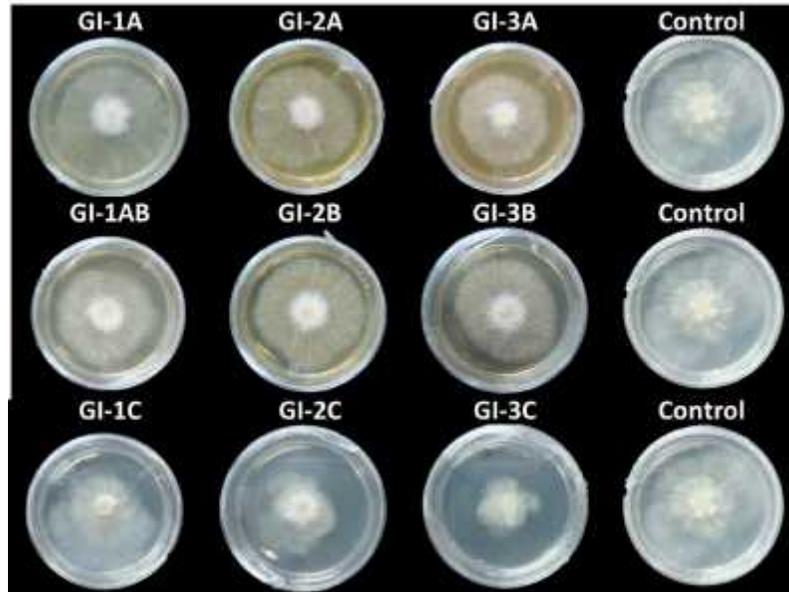


Figura 20. Efecto del crecimiento radial de la cepa JG22 ante los extractos de *A. gaumeri*.

Los extractos de las tres poblaciones de *A. gaumeri* evaluadas mostraron tener actividad contra cuatro de los patógenos evaluados (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de la efectividad de los extractos etanólicos obtenidos de las poblaciones de *A. gaumeri* contra las cepas sensibles a ellos.

Patógeno	Población de <i>A. gaumeri</i>	Concentración ~g mL ⁻¹	% ICM
<i>Alternaria alternata</i> (JG32)	Oxkutzcab	1000	100
	Tinum	1000	63
	Yaxcabá	1000	95
<i>Alternaria alternata</i> (JG14)	Oxkutzcab	2000	79
	Tinum	2000	83
	Yaxcabá	2000	85
<i>Alternaria chrysanthemi</i> (CICY004)	Oxkutzcab	500	100
	Tinum	500	75
	Yaxcabá	500	100
<i>Athelia rolfsii</i> (AT18)	Oxkutzcab	2000	73
	Tinum	2000	77
	Yaxcabá	2000	75

2.3.4. Efecto de los extractos contra la formación de esclerocios

Basados en los resultados después de 25 días del experimento con *A. rolfsii* se observó una inhibición completa de los esclerocios con los EE y EHA, en comparación con el control. Por lo contrario los extractos acuosos estimularon la formación de esclerocios comparados con el control. (Figura 21 y 22).

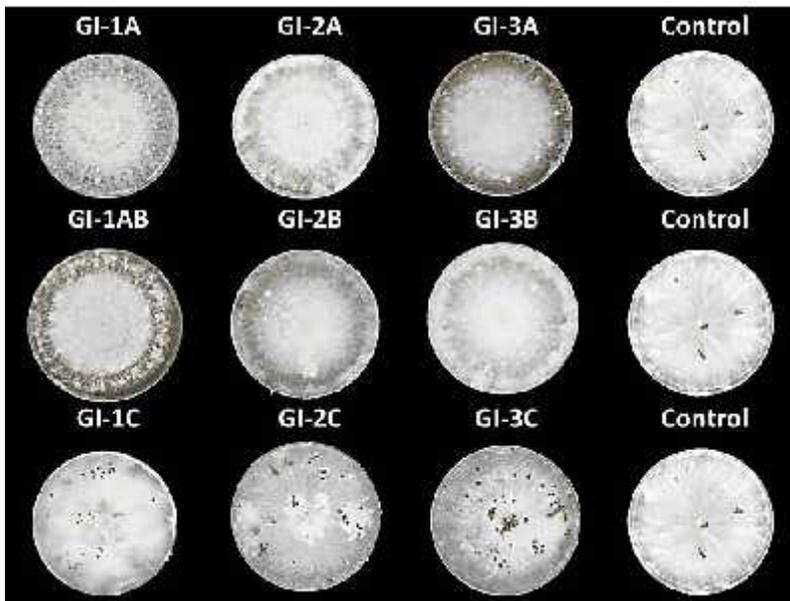


Figura 21. Comparación del efecto de los extractos contra *Athelia rolfsii* y la formación de esclerocios.

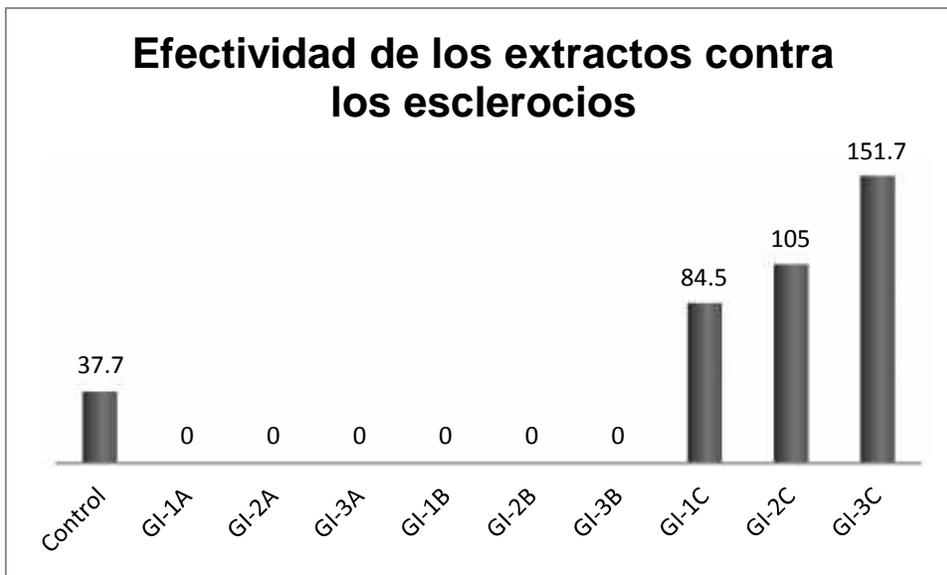


Figura 22. Evaluación de la formación de esclerocios con los extractos de *Acalypha gaumeri*

2.4. Discusión

Ante la cantidad de material vegetal y de extractos obtenidos de las poblaciones cultivadas *ex-situ*, en el presente trabajo se usaron los bioensayos de microdilución y dilución en agar para la evaluación antifúngica. El bioensayo de microdilución tiene la ventaja de ser rápido, permite analizar un gran número de muestras simultáneamente, requiere pequeñas cantidades de extracto, y evalúa la inhibición de germinación de esporas así como la elongación del micelio. Por otro lado, la técnica de dilución de agar, aunque requiere cantidades mayores de muestra, evalúa la capacidad de inhibición del extracto sobre el crecimiento micelial y no es necesario obtener esporas para realizar el bioensayo.

Los resultados de los bioensayos mostraron la inactividad de todos los extractos acuosos contra las ocho cepas patógenas evaluadas. Los extractos hidroalcohólicos a una concentración de 2000 mg mL^{-1} sí fueron capaces de detener el crecimiento de *A. chrysanthemi*, *A. alternata* (JG32) y *A. rolfsii* (AT18). Este es el primer trabajo realizado evaluando actividad antifúngica con los extractos hidroalcohólicos de *A. gaumeri*, aunque estos no presentaron los más altos porcentajes de inhibición. Esos datos sugieren que *A. gaumeri* produce compuestos polares que la mezcla etanol:agua es capaz de extraer.

Los mejores resultados se obtuvieron con los EE, observando la CMI más baja a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ con la población de Oxkutzcab (GI-1A) y Yaxcabá (GI-3A) contra *A. chrysanthemi*. Este mismo extracto mostró una CMI de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ con *A. alternata* JG32; y aunque no inhibió completamente el crecimiento micelial de *A. alternata* JG14., el extracto sí tuvo efecto a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ con una ICM de 79 a 83%.

Estos resultados que se obtuvieron en los bioensayos de actividad antifúngica de *A. gaumeri* propagadas *ex-situ* contra *A. chrysanthemi*, son similares a los reportados por Vargas-Díaz (2014) con EE de plantas colectadas en campo. Los extractos en ambas condiciones (*in-situ* y *ex-situ*) presentaron efectividad a una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esto demuestra la producción continua de metabolitos por las raíces de *A. gaumeri* mantenidas en invernadero. Vargas-Díaz, 2014 reportó a partir de la raíz de

A. gaumeri el aislamiento e identificación de un compuesto denominado argaumerina, de naturaleza heterocíclica nitrogenada, activo contra *A. chrysanthemi* y *Mycosphaerella fijiensis*. En general en el género *Acalypha* se han reportado algunos alcaloides (Nahrstedt *et al.*, 1982, Taufiq-Yap *et al.*, 2000, Hungeling *et al.*, 2009).

Las cepas fitopatógenas más resistentes a los extractos fueron las de las especies *C. gloeosporioides* (CGP6), *C. capsici* (CCP27), *F. solani* (JG2) y *F. equiseti* (JG22). En trabajos anteriores (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008) se reportaron datos similares contra *C. gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* ante el EE de la raíz de *A. gaumeri*, utilizando el bioensayo de difusión en discos de papel filtro. Por el contrario, Vargas-Díaz (2014) reporta efectividad inhibitoria contra otras cepas de *C. gloeosporioides* y *C. capsici*, con %ICM de 68 y 86% respectivamente.

Se ha encontrado que las cepas de *C. capsici* y *C. gloeosporioides* muestran una gran diversidad en su patogenicidad y comportamiento ante fungicidas comerciales (Torres-Calzada, 2015), esto sugiere la necesidad de evaluar diferentes cepas de *Colletotrichum* sp para confirmar si este género es sensible a los extractos de *A. gaumeri*.

Los EE y EHA de *A. gaumeri* tuvieron un efecto a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Athelia rolfsii* con una reducción del crecimiento micelial del 66 a 79 %. Por otro lado, Zamora-Natera en el 2005, realizó un estudio evaluando la actividad antifúngica de extractos crudos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* contra *Sclerotium rolfsii*, las concentraciones evaluadas fueron de 3000, 4000 y 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se observó reducción del crecimiento micelial del 17.5, 52.5 y 100% respectivamente. Por otra parte, los mismos extractos EE y EHA de *A. gaumeri* a la misma concentración (2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inhibieron por completo la formación de esclerocios, estos mismos resultados fueron observados con extractos de Jengibre y Neem a concentraciones de 2000, 1000 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, teniendo la mayor inhibición a concentraciones de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ojaghian *et al.*, (2014) donde se obtuvo un efecto inhibitorio con los extractos etanólicos de hojas de Neem, en la formación de esclerocios de *S. sclerotiorum* después de 15 días, en comparación con el control. Comparando estos

resultados con los obtenidos en este trabajo, permitió señalar que los extractos de *A. gaumeri* son prometedores contra *A. rolfsii*. Cabe resaltar que estas son las primeras evaluaciones realizadas con los extractos de *A. gaumeri* contra este hongo fitopatígeno. Los esclerocios, como bien se sabe, son muy importantes en el ciclo de los patógenos que los producen (Adams, 1975). Actualmente *A. rolfsii* ha estado afectando a plantaciones comerciales de Stevia (*Stevia rebaudiana*), cultivo que ha tomado gran auge por sus propiedades como edulcorante natural. Los resultados del presente trabajo con esta cepa hasta el momento son prometedores, ya que de ser efectivo a nivel de vivero y campo, sería un gran aporte para el control de la pudrición de la raíz de *Stevia*.

Respecto a la efectividad evaluada de los diferentes extractos etanólicos, obtenidos de las poblaciones de *A. gaumeri* cultivadas *ex-situ*, pero procedentes de diferentes localidades, se encontró que los extractos de las plantas provenientes de las poblaciones de Oxkutzcab y Yaxcabá tuvieron los mayores efectos antifúngicos. Es interesante destacar que el EE de *A. gaumeri* afecta principalmente a los patógenos pertenecientes al género *Alternaria*.

Lo anterior concuerda con Vargas-Díaz, (2014) que evaluó las propiedades fungicidas de los EE de *A. gaumeri* de tres poblaciones y con diferentes épocas de colecta, las cuales mostraron un comportamiento similar en todas las poblaciones, sin embargo las concentraciones efectivas dependieron de la época de colecta. Por lo tanto, se recomienda seguir los estudios de las plantas *ex-situ*, realizando pruebas para seleccionar la mejor población. Así mismo, es importante la caracterización total de *A. gaumeri* para explotar al máximo sus propiedades antifúngicas.

2.5. Referencias

- Adams, P.B. (1975). Factors affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Plant Diseases Reporter* 59:599–603.
- Cristóbal-Alejo, J., J. M. Tun-Suarez, S. Moguer-Catzin, N. Marbán-Mendoza, I. L. Medina-Baizabal, P. Simá-Polanco, S. R. Peraza-Sánchez y M. M. Gamboa-Angulo (2006). In vitro sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. *Nematropica*, 36: 89-97.
- Hanson, J. R. (2008). *The Chemistry of Fungi*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge pp 1-17
- Hernández-Castillo, F. D., R. H. Lira-Zaldívar, L. Cruz-Chávez, G. Gallegos-Morales, M. E, Galindo-Cepeda, E. Padrón-Corral, y M Hernández-Suárez (2008). Antifungal potencial of *Bacillos* sp. *trinas* and *Larrea tridentina* extracto aginas *Rhizoctonia solani* on potato (*Solanum tuberosum* L.) crop. *International Journal of Experimental Botany*, 77: 241-252
- Hungeling, M., M. Lechtenberg, F. R. Fronczek, y A. Nahrstedt (2009). Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*, 70:270–277.
- Gamboa-Angulo, M. M., J. Cristóbal-Alejo, I. L. Medina-Baizabal, F. Chi-Romero, R. Méndez-González, P. Sima-Polanco y F. May-Pat (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1955-1959.
- Gossen, B. D. y S. R. Rimmer (2001). First report of resistance to benomyl fungicides in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 85: 1206
- Nahrstedt, A., J. D. Kant y V. Wray (1982). Acalyphin, a cyanogenic glucoside from *Acalypha indica*. *Phytochemistry*, 21: 101-105.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Ojaghian M. R., L. Wang, Z. Cui, C. Yang, T. Zhongyun y G. Xie (2014). Antifungal and SAR potential of crude extracts derived from neem and ginger against storage carrot rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Industrial Crops and Products*. 55: 130-139
- Rodríguez-Guzman, M. P. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana*, 1: 53-78.
- Taufiq-Yap, Y. H., T. H. Peh, G. C. L. Ee y M. Rahmani (2000). Chemical investigation of *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Oriental Journal Chemistry*, 16: 249-251
- Torres-Calzada, C., R. Tapia-Tussell, I. Higuera-Ciapara, y D. Pérez-Brito (2013). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*, 135: 67-79.
- Vargas-Díaz, A. A. (2014). Estudio integral de *Acalypha gaumeri* Pax y K. Hoffm. dirigido a sus propiedades. Tesis de doctorado. Centro de investigación Científica de Yucatán. México, 135 p.
- Zamora, F., A. Bernal, M. Ruiz, M. Soto, A. Escalante y H. Vibrans (2005). Perfil de alcaloides de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la evaluación antifúngica del extracto alcaloideo y lupanina contra fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 124-129.

CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS

3.1. Introducción

Actualmente se estima que en México existen cerca de 200 000 especies de hongos, de las cuales solamente se conoce aproximadamente el 5%, según datos mencionados por Guzmán (1998), y de estos, 1500 especies son hongos fitopatógenos. Tomando en cuenta que aproximadamente el 70% de todas las enfermedades de los cultivos principales son causadas por hongos (Hanson, 2008), es de gran importancia el control de las enfermedades causadas por estos fitopatógenos, a fin de evitar las pérdidas económicas que ocasionan. La identificación certera y confiable permite facilitar las estrategias de manejo de las enfermedades causadas por hongos en las plantaciones. Tradicionalmente los hongos han sido identificados por sus características morfológicas tales como la presencia o ausencia de setas, formas de conidio, color y tamaño de la colonia, etc. (Adaskaveg y Hartin 1997). Sin embargo estos criterios no siempre son adecuados, porque pueden variar bajo diferentes condiciones ambientales (Cannon *et al.*, 2000).

Por otra parte, las técnicas moleculares permiten una identificación certera y confiable, ya que se basan en las características genéticas de los hongos, esto aunado a su gran sensibilidad y especificidad. Dentro de estas técnicas resalta la búsqueda de huellas genéticas, que es el conjunto de técnicas moleculares por el cual, un individuo puede ser identificado de manera única, mediante pruebas que revelan polimorfismos múltiples en el ADN.

La caracterización por PCR-RFLP ha sido utilizada en la diferenciación de especies de hongos y combina la amplificación de una región objetivo con la posterior digestión enzimática de la misma (Carter *et al.*, 2000; Rampersad, 2011). Igualmente la caracterización por DAMD ha sido usada tanto en plantas como en hongos. Se ha reportado que con estos marcadores moleculares se pudieron diferenciar aislados de la misma especie de acuerdo a su origen (Luchi *et al.*, 2008), así como, diferenciar e identificar por géneros y especies a hongos que provocaban síntomas similares (Luchi *et*

al., 2014). Por todo lo anterior, el objetivo de este capítulo es la identificación a nivel especie de los hongos fitopatógenos y la caracterización molecular de los mismos por las técnicas de PCR-RFLP y DAMD.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Crecimiento de microorganismos

Se seleccionaron cepas de hongos patógenos de cultivos de importancia económica de la región como son: papaya (*Carica papaya*), piñón (*Jatropha curcas*) y estevia (*Stevia rebaudiana*). Los hongos fueron cultivados en PDA (Potato Dextrose Agar. BD Bioxon®). Inoculados en cajas Petri de 100 X 15 mm y almacenados en un cuarto de cultivo en condiciones de fotoperíodo (12 h luz: 12 h oscuridad) a temperatura de 25 ± 2 °C. A los 15 días de la inoculación, el micelio de cada cepa fue raspado de las cajas y transferido a tubos de 2 mL y almacenado en un ultracongelador a -80 °C, hasta la extracción del ADN.

3.2.2. Aislamiento de ADN genómico

La obtención del ADN genómico se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Tapia-Tussell *et al.*, 2006. Se tomó 1 mg de micelio de cada aislado fungoso, se depositó en un tubo eppendorf de 2 mL. Se añadieron 1000 μ L de buffer de extracción de Dodecil Sulfato Sódico (SDS), se incubó a 65°C durante 30 minutos, con inversión ocasional. Posteriormente se adicionaron 500 μ L de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) y los tubos se agitaron durante 10 minutos, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio de 1.7 mL. Se adicionaron 700 μ L de isopropanol frío a cada tubo y se incubaron las muestras a -20 °C por 10 minutos, luego se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de etanol al 70%. Las pastillas de ADN se lavaron y centrifugaron nuevamente por 5 minutos a 8,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se secó al vacío en un DNA 110 Speed Vac. Finalmente el ADN fue resuspendido en 50 μ L de agua libre de DNasas y RNasas.

3.2.3. Integridad y pureza

La medición de la concentración y pureza del ADN obtenido se realizó con un espectrofotómetro, a longitudes de onda de 260/280 nm (ADN/proteínas). La integridad de ADN, se determinó en una corrida electroforética por 30 minutos a 100 V de un gel de

agarosa al 0.8% en buffer TBE (tris-borato-EDTA), el gel fue posteriormente teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualizado en un transiluminador UV. Las imágenes fueron capturadas y analizadas en un sistema de documentación de geles UVP BioImaging System.

3.2.4. Identificación con iniciadores específicos para *Colletotrichum* sp.

La identificación molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* se realizó utilizando el iniciador específico CgInt (5'- GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG -3') en conjunto con el iniciador universal ITS4 (Talhinhas *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 1992). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, que contuvo 25 ng de ADN, 1x de amortiguador (10x: 200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen), 0.20 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, 1 µM de iniciador y 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen). La amplificación consistió de una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 2 min a 62 °C y 2 min a 72 °C, y un paso final de extensión de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR esperados para una identificación positiva son de aproximadamente 450 pb.

La identificación de *Colletotrichum capsici* se realizó utilizando el iniciador específico CcapF (5' -GTA GGC GTC CCC TAA AAA GG-3') y CcapR (5'-CCC AAT GCG AGA CGA AAT G-3') (Torres-Calzada *et al.*, 2011). Las reacciones de PCR se llevaron a un volumen final de 25 µl, que contuvo 50 ng de ADN, 1x de amortiguador (10x: 200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4; Promega), 0.20 mM de cada dNTP (Invitrogen), 2.5 mM de MgCl₂ (Promega), 1 µM de iniciador y 1.25 U de *Go taq Flexi* DNA polimerasa (Promega). La amplificación consistió de una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C y 2 min a 72 °C, y un paso final de extensión de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR esperados para una identificación positiva son de aproximadamente 394 pb.

En todos los casos los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v), se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se visualizaron en un

transiluminador UV. Las imágenes fueron capturadas y analizadas en un sistema de documentación de geles UVP BioImaging System.

3.2.5. Identificación por ITS y el gen 5.8S

Para la identificación molecular fue amplificada la región ITS completa (ITS1, el gen 5.8S y ITS2) usando los oligonucleótidos universales ITS1 (5'- TTC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), descritos por White *et al.*, (1990). La reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25 μ L, conteniendo 1 \times de amortiguador (10 \times : 200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4) (Invitrogen), 0.20 mM de cada dNTP, 2.50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 1 pmol de cada iniciador, 1.25 U *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 100 ng de ADN objetivo.

La amplificación consistió en un primer paso de amplificación a 94°C por un minuto, seguido por 30 ciclos de un minuto a 94°C, 2 minutos a 58°C (temperatura de alineamiento) y un minuto a 72°C, y un paso final de extensión de cinco minutos a 72°C. El producto de amplificación obtenido se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) a 1.5% (p/v) en amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA), a 100V por 50 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se visualizaron en un transiluminador UV. Las imágenes fueron capturadas y analizadas en un sistema de documentación de geles UVP BioImaging System.

3.2.6. Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a MacroGen Inc. (Corea), con las concentraciones especificadas por el laboratorio. Posteriormente las secuencias obtenidas se procesaron con el programa BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) y se compararon con la base de datos del GenBank, usando BLASTn en el NCBI, para confirmar la identidad de los aislados.

Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método UPGMA y se expresaron en unidades de sustituciones de bases por sitio. El soporte de las ramas fue medido con un análisis de bootstrap de 1000 repeticiones. Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

3.2.7. Caracterización molecular

La caracterización molecular, se llevó a cabo mediante la huella genética, con las técnicas PCR-RFLP y DAMD.

3.2.7.1. PCR- RFLP

Los productos de amplificación de la región ITS fueron digeridos con las siguientes enzimas de restricción: *Alu* II, *Rsa* I, *Mse* I, *Hae* III, *Taq* I y *Hind* III. El volumen final de reacción fue de 20 μ L, de los cuales 10 μ L fueron del amplicón. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones recomendadas por el proveedor como se indica en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Condiciones de digestión para las enzimas.

Enzimas	Agua libre de RNAsas y DNAsas	Enzima de Restricción (2U/ μ L)	Amortiguador 10x	BSA	Amplicón
<i>Alu</i> I	7.6 μ L	0.2 μ L	2.0 μ L	0.2 μ L	10 μ L
<i>Rsa</i> I, <i>Hae</i> III, <i>Mse</i> I, <i>Taq</i> I y <i>Hind</i> III	7.8 μ L	0.2 μ L	2.0 μ L	No aplica	10 μ L

Las condiciones de reacción para la *Taq* I, fueron: incubación a 70°C durante 2 horas e inactivación de 10 min a 4°C, el resto de las enzimas fueron incubadas a 37° C durante 2 horas e inactivadas a 70° C durante 10 min.

Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa Ultrapure 1000 (Invitrogen) al 3% (p/v) en amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA), a 100 V por 90

minutos. Se utilizó como marcador de peso molecular la escalera 1 Kb plus (Invitrogen). Los geles teñidos previamente con bromuro de etidio, se visualizaron en un transiluminador UV. Las imágenes fueron capturadas y analizadas en un sistema de documentación de geles UVP BioImaging System.

3.2.7.2. DAMD (Directed Amplification of Minisatellite DNA)

Los análisis de amplificación directa en la región de minisatélites del ADN, DAMD (por sus siglas en inglés, Directed Amplification of Minisatellite DNA) se realizaron con cinco iniciadores que se describen en el cuadro 6.

Cuadro 6. Secuencias de los iniciadores (Verma y Rana, 2012).

Iniciadores	Secuencia (5'-3')
HVR	CCTCCTCCCTCCT
HBV	GGTGTAGAGAGGGGT
HVA	AGGATGGAAAGGAGGC
M13	GAGGGTGGCGTTCT
33.6	AGGGCTGGAGG

El volumen final de cada reacción fue de 25 μ L, que contenían amortiguador de PCR 1x (Invitrogen), 0.25 mM de dNTPs (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de iniciador, 60 ng de ADN genómico y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). La reacción fue realizada en un termociclador de marca GeneAmp, PCR System 9700, con las siguientes condiciones; un paso de desnaturalización inicial a 95° C por 5 minuto, seguido de 40 ciclos a 92° C por 1 minuto, para la alineación 55° C por 2 minutos, para la extensión 72° C por 2 minutos; y con una extensión final de 72° C por 7 minutos.

Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v). Todos los geles se tiñeron previamente con bromuro de etidio, la electroforesis se corrió en amortiguador TBE (Tris-borato-EDTA) a 100V por 60

minutos, utilizando un marcador de peso molecular de escalera 1 Kb plus (Invitrogen). Los geles se visualizaron en un transiluminador UV. Las imágenes fueron capturadas y analizadas en un sistema de documentación de geles UVP BioImaging System.

3.2.8. Análisis de datos

Se registraron las bandas obtenidas para cada individuo y se clasificaron en base a los tamaños de los fragmentos observados. Por último se hizo una matriz binaria con los datos obtenidos con DAMD registrando la presencia (1) o ausencia (0) de las bandas.

Los datos de las matrices binarias de cada iniciador se combinaron y fueron procesados usando el método UPGMA para generar un dendrograma basado en el Coeficiente de similitud de Jaccard (Jaccard, 1908), en la aglomeración secuencial (SAHN) módulo de agrupación jerárquica y anidada del software PC NTSYS. El análisis principal de coordenadas PCoA (por sus siglas en inglés: Principal Coordinate Analysis), fue utilizado para probar la correlación de los datos obtenidos de los marcadores moleculares usados en este estudio, utilizando la versión de software NTSYS-pc 2.02e (Rohlf, 2009).

3.3. Resultados

En la extracción del ADN genómico de las cepas de hongos bajo estudio, se obtuvo un rango de concentración desde 220 ng/ μ L hasta 800 ng/ μ L y los valores de pureza estuvieron entre 1.5 y 2.0 (Cuadro 7). En la Fig. 23 se puede apreciar la integridad del ADN de todas las muestras.

Cuadro 7. Cuantificación de ADN genómico.

Clave	Concentración (ng/ μ L)	DO (260/280)
JG14	349	1.60
JG32	800	1.50
CICY 004	749	1.80
AT18	357	1.80
CCP27	334	1.90
CGP6	603	1.60
JG22	288	1.80
JG2	220	2.00

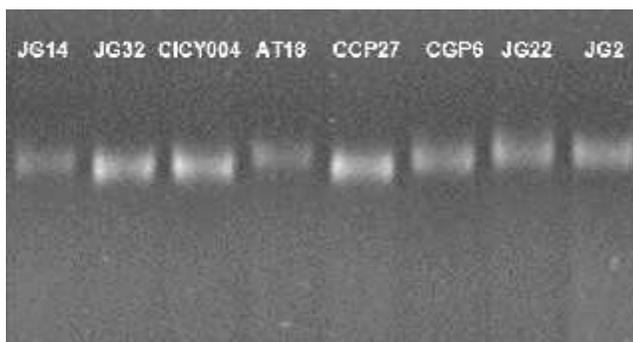


Figura 23. Gel de calidad e integridad del ADN genómico.

3.3.1. Identificación molecular con iniciadores específicos para *Colletotrichum* sp.

Las cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum capsici* fueron identificadas con iniciadores específicos, ya que se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 450 pb y 394 pb respectivamente, confirmando la identificación de estas especies.

3.3.2. Amplificación de la región ITS-5.8S

Los productos de la región ITS-5.8S amplificados para la secuenciación, tuvieron un tamaño de 550 a 650 pb. como se aprecia en la figura 24.



Figura 24. Amplificación de la región ITS-5.8S. M: marcador molecular (1 Kb), B: blanco, Línea 1: JG14, Línea 2: JG32, Línea 3: CICY004, Línea 4: AT18, Línea 5: CCP27, Línea 6: CGP6, Línea 7: JG22 y Línea 8: JG2.

3.3.3. Secuenciación

El análisis de las secuencias permitió identificar a nivel de especie a las diferentes cepas utilizadas en este estudio (Cuadro 8). Es importante señalar que la cepa de *A. chrysanthemi* (CICY004) no fue secuenciada, porque ya había sido identificada a nivel especie en trabajos anteriores (Vargas-Díaz *et al.*, 2014, Villanueva-Couoh *et al.*, 2005).

Cuadro 8. Secuencias identificadas en la base de datos de NCBI.

Claves	Especie identificada	Valor E	% de identidad
JG14	<i>Alternaria alternata</i>	0	99
JG32	<i>Alternaria alternata</i>	0	99
AT18	<i>Athelia rolfsii</i>	0	100
JG22	<i>Fusarium equiseti</i>	0	99
JG2	<i>Fusarium solani</i>	0	97

Para corroborar la identidad de las cepas se realizó un análisis filogenético por el método de UPGMA, el árbol resultante se aprecia en la figura 25. Como se observa, se formaron dos clados principales (1 y 2). En el clado1 se agruparon las cepas de *Athelia rolfsii*, mientras que el segundo clado lo conformaron el resto de la cepas bajo estudio. Este clado por su parte se dividió en dos subclados (2A y 2B) con un coeficiente de similitud de 0.3 y un soporte de las ramas de 100 %, en el subclado 2A se agruparon todas las cepas del genero *Fusarium* y en el subclado 2B se agruparon las cepas del genero de *Alternaria*. El subclado 2A se subdividió en 2A1 y 2A2, donde se encontraron las cepas de *F. equiseti* y *F. solani*, respectivamente. Todas las ramas tuvieron un alto porcentaje de robustez (100-99 %) lo que permite inferir la identidad de todas las cepas utilizadas en este estudio.

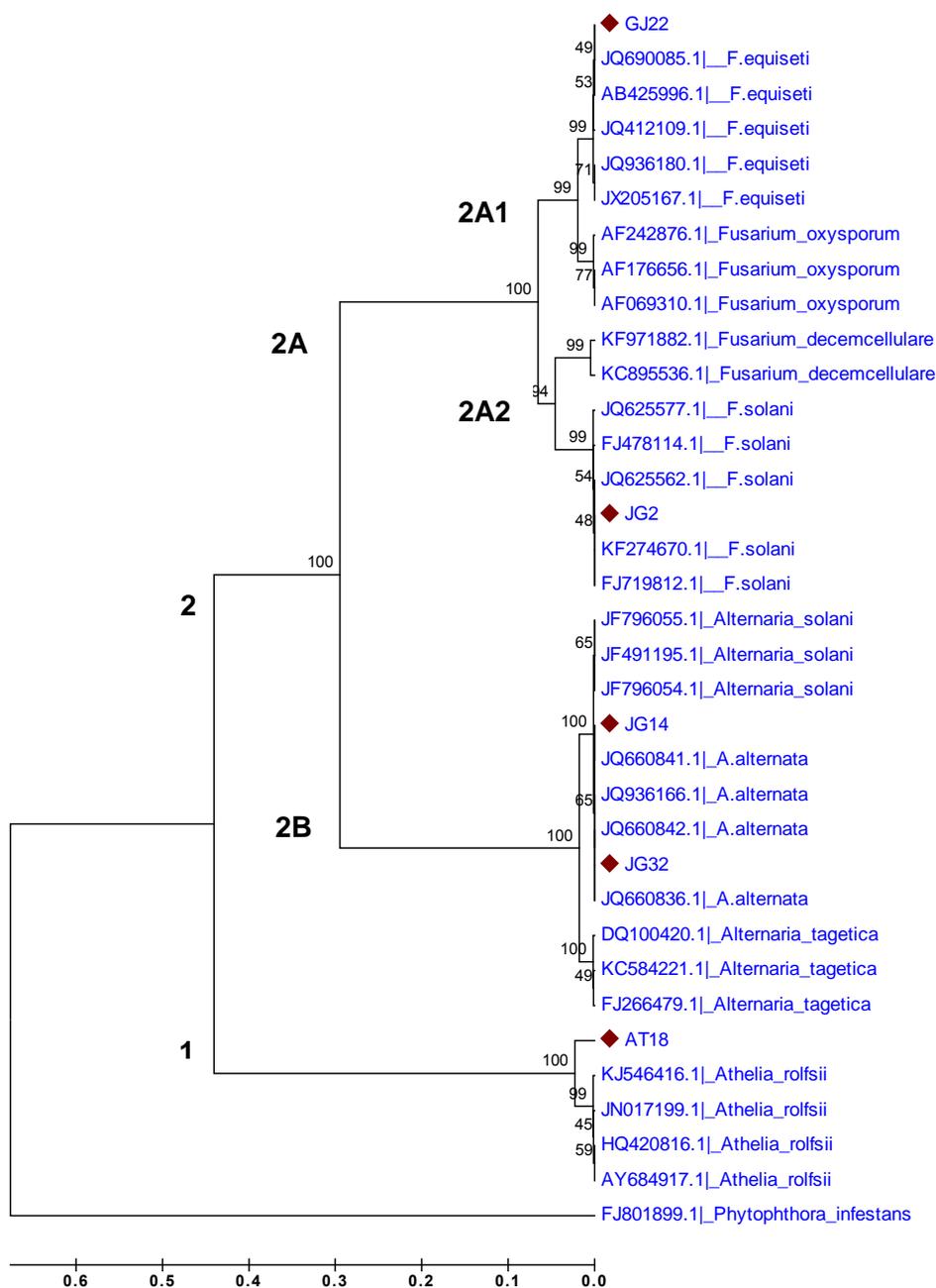


Figura 25. Análisis filogenético basados en la secuenciación de la región ITS-5.8S gen. Los símbolos en rombo color rojo son las cepas que se utilizadas en este estudio. El análisis fue inferido usando el método UPGMA con un bootstrap de 1000 réplicas realizado en MEGA 5.2

3.3.4. PCR-RFLP

Los perfiles de la digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS-5.8S se muestran en la figura 26.

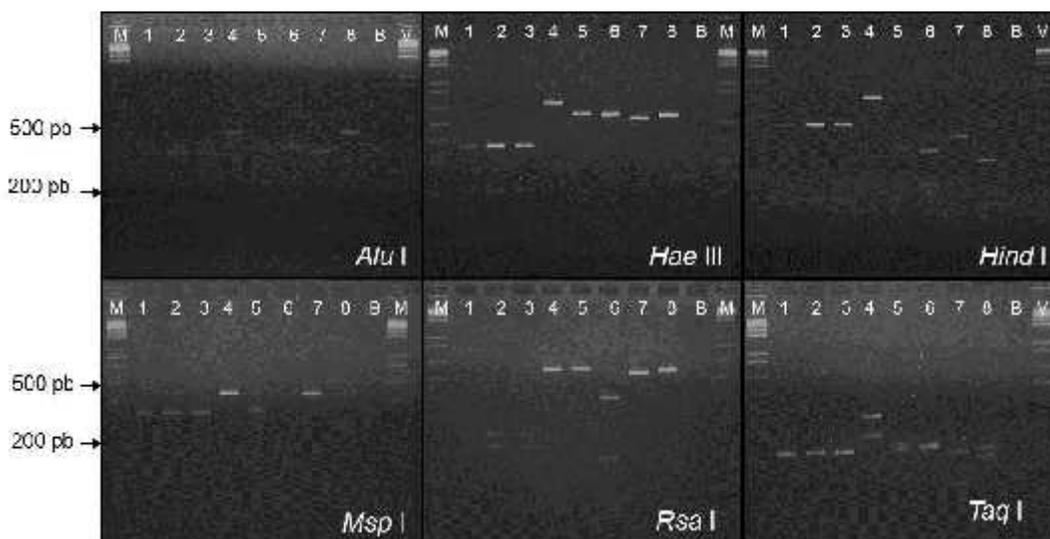


Figura 26. Perfiles de digestión enzimática en la región; M: marcador molecular (1000pb), B: blanco, Línea 1: JG14, Línea 2: JG32, Línea 3: CICY004, Línea 4: AT18, Línea 5: CCP27, Línea 6: CGP6, Línea 7: JG22 y Línea 8: JG2.

Todas las cepas del género *Alternaria* (JG14, JG32 Y CICY004) mostraron un único perfil de restricción, monomórfico para cada enzima.

Las cepas CCP27 y CGP6, identificadas previamente con iniciadores específicos, como *Colletotrichum capsici* y *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente, mostraron perfiles diferentes al ser digeridas con las enzimas de restricción. La única enzima que no fue capaz de reconocer sitios de restricción para estas especies fue la *Hae III*, mientras que *Rsa I* y *Msp I* fueron las más resolutivas para diferenciar entre ambas especies (Cuadro 9).

Las cepas JG22 y JG2 identificadas como *F. equiseti* y *F. solani* respectivamente, mostraron perfiles de restricción diferentes con 4 de las 6 enzimas empleadas (*Alu I*, *Hind III*, *Msp I* *Taq I*) (Cuadro 9)

Por su parte la cepa AT18, identificada como *Athelia rolfsii*, produjo un perfil diferente con todas las enzimas al resto de las cepas.

Cuadro 9. Longitud en pares de bases (pb) de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP

Cepas	Alu I	Hae III	Hind III	Msp I	Rsa I	Taq I
JG14	360	360	420	430	250	220
JG32	180	210	130	90	200	210
CICY004						
AT18	520 80	Nd	Nd	550 100	530 70	300 240 60
CCP27	360 210	Nd	310 180 90	350 200	Nd	250 220 70
CGP6	360 210	Nd	300 180 90	250 200 90	390 180	250 230 70
JG22	380 150	Nd	380 120 70	Nd	Nd	210 180 80 70
JG2	420 120	Nd	250 120 90 70	350 210	Nd	240 190 60 55

3.3.5. DAMD

De los cinco iniciadores DAMD seleccionados, tres fueron resolutivos y polimórficos para este estudio. Los iniciadores seleccionados amplificaron un total de 178 bandas, con un promedio de 59.3 bandas por iniciador. (Fig. 27).



Figura 27. Patrones de bandas obtenidas de los tres iniciadores. M: marcador molecular (1 Kb), B: blanco, Línea 1: JG14, Línea 2: JG32, Línea 3: CICY004, Línea 4: AT18, Línea 5: CCP27, Línea 6: CGP6, Línea 7: JG22 y Línea 8: JG2.

El iniciador HVA fue el más resolutivo, por lo que fue utilizado para generar el dendograma que se muestra en la Figura 28. Como se aprecia, en el clado 1, se agruparon las tres cepas del género *Alternaria*, que a su vez se subdivieron en dos subclados en base a las diferentes especies, con un coeficiente de distancia genética de 0.45. Es importante señalar que las cepas JG14 y JG32 de la especie *A. alternata* que no pudieron ser diferenciadas por PCR-RFLP, muestran un coeficiente de distancia genética de 0.63 lo que indica que son diferentes. En el clado 2, se formaron tres subclados, a una distancia de 0.45, separándose las cepas de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium*. En cuanto a la cepa AT 18 (*Athelia rolfsii*) se encuentra separada del resto con un coeficiente de distancia genética de 0.1, lo que indican su poca relación genética con las otras especies.

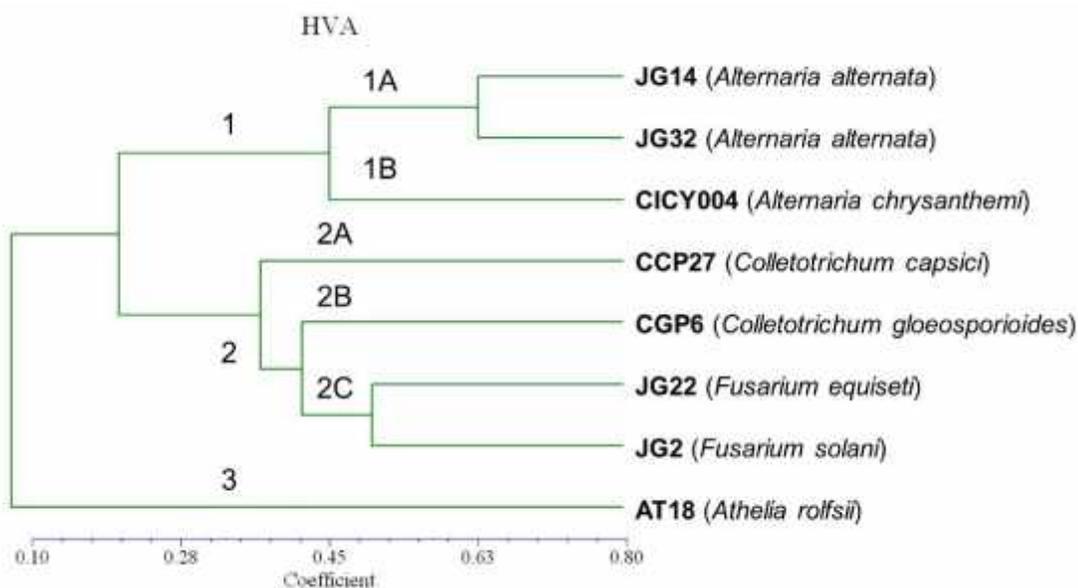


Figura 28. Dendrograma obtenido con el iniciador HVA por análisis cluster (UPGMA) basado en el coeficiente de similitud de Jaccard.

En el análisis de Coordenadas principales PCoA (Fig. 29) se aprecian tres agrupaciones (círculos verdes) que correspondieron a tres géneros diferentes de este estudio (*Fusarium*, *Alternaria* y *Colletotrichum*). Mientras que la cepa AT18 se ubicó nuevamente muy distante de las demás. Al mismo tiempo se observó que las cepas que fueron sensibles a los extractos de *A. gaumeri* (círculo café) están más cercanas en el agrupamiento, el cual se incluyó a la cepa AT18.

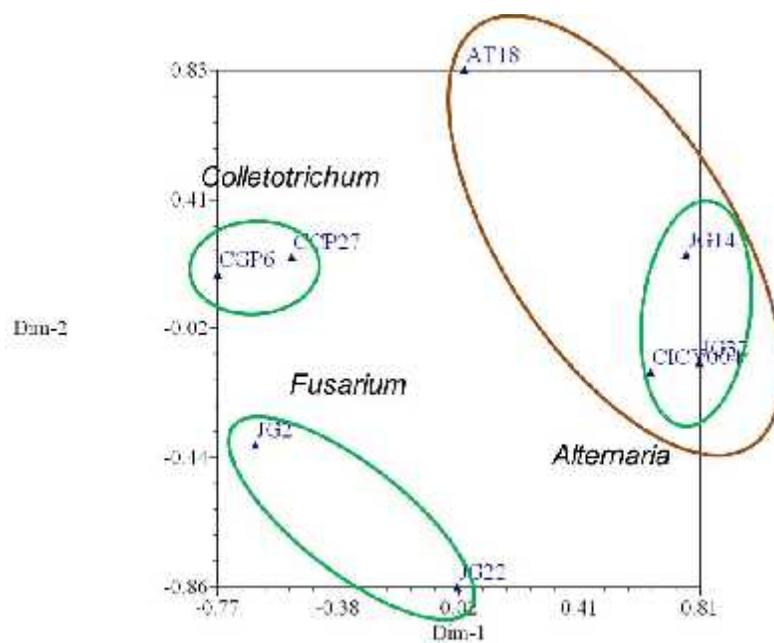


Figura 29. Diagrama de dos dimensiones del análisis de coordenadas principales con todos los iniciadores (HVA, HBV y M13).

3.4. Discusión

El análisis de las secuencias de la región ITS (ITS1/ITS2; 5.8S gen) del ADNr de las cepas evaluadas ante los diferentes extractos de *Acalypha gaumeri*, permitió identificarlas inequívocamente como: *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Alternaria alternata* y *Athelia rolfsii*. La región ITS es frecuentemente secuenciada para estudios de identificación de hongos e investigación relacionada con la sistemática, filogenia de cepas a niveles específico e intraespecífico (Nilsson *et al.*, 2008; Simon y Weiß, 2008).

En nuestro estudio la técnica de PCR-RFLP fue muy útil para diferenciar entre las especies de los géneros *Fusarium* y *Colletotrichum*, ya que arrojaron perfiles de restricción que coinciden con lo reportado para estas especies en estudios previos (Tapia-Tussell *et al.*, 2008; Valencia, 2014) y que permitieron diferenciar inequívocamente a las cepas de este estudio. Sin embargo, con esta técnica, específicamente con las seis enzimas de restricción utilizadas, no fue posible diferenciar a nivel inter-específico a las cepas del género *Alternaria*. Por ello en la caracterización molecular de microorganismos, se recomienda realizar un estudio polifásico, donde se incluyan diferentes técnicas a fin de tener un “barrido” más amplio del genoma de las cepas bajo estudio (Talhinhas *et al.*, 2002; Tapia-Tussell *et al.*, 2008).

La caracterización molecular utilizando cinco iniciadores DAMD, nos permitió diferenciar a nivel intra-específico, a todas las cepas bajo estudio y complementar la información obtenida con los estudios hechos con los otros marcadores.

El iniciador HVA fue el que mostró un mayor grado de polimorfismo para todas las cepas y fue capaz de diferenciar entre las tres cepas del género *Alternaria*, lo cual no se había logrado con las otras técnicas empleadas. Esto coincide con lo reportado por Valencia, (2014) para la especie *Alternaria alternata* aislada del mismo hospedero en diferentes localidades de la Península de Yucatán.

Esta diferenciación genética permitió a su vez, la formación de agrupamientos a nivel de especie tanto en el dendograma como en el PCoA, donde en los grupos 1 y 3 se

encontraron las cepas que resultaron susceptibles a diferentes concentraciones de los extractos de *A. gaureri*. Mientras que el grupo 2 se formó con las especies de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium*, que fueron resistentes para todos los extractos evaluados. Reportes similares en cuanto a nivel de resistencia de microorganismos, dentro de la misma especie, se han encontrado para *Colletotrichum capsici* ante diferentes fungicidas (Torres-Calzada, 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio, fortalecen la importancia y necesidad de realizar la caracterización molecular de los patógenos, utilizando diferentes técnicas. Esto para garantizar una identificación certera y una diferenciación inequívoca a nivel intra-específico. La finalidad es evitar trabajar con aislamientos redundantes, para profundizar en la interacción de los compuestos bioactivos producidos por las diferentes cepas de patógenos, que están presentes en la región. Esto llevará a trabajar para un control efectivo de estos patógenos en los diferentes cultivos de importancia económica.

3.5. Referencias

- Adaskaveg, J. E., y R. J. Hartin (1997). Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, 87: 979-987.
- Cannon, P. F., P. D. Bridge, y E. Monte (2000). Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In D. Prusky, S. Freeman, & M. B. Dickman (Eds.), *Colletotrichum* host specificity, pathology and host pathogen interaction St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society. pp. 1–20
- Carter, J. P., H. N. Rezanoor, A. E. Desjardins y P. Nicholson (2000). Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathology*, 49: 452-460.
- Chandelier, A., F. Laurent, D. Dantinne, L. Mariage, M. Etienne y M. Cavelier (2003). Genetic and molecular characterization of *Verticillium dahliae* isolates from woody ornamentals in Belgian nurseries. *Europe Journal Plant Pathology*. 109: 943-952
- Chehri, K., B. Salleh, T. Yli-Mattila, K. R. N. Reddy y S. Abbasi (2011). Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 341-351.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Guzmán, G. (1998). Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). In *La diversidad biológica de Iberoamérica II*, G. Halffter (ed.). *Acta Zoológica Mexicana*, nueva serie vol. Especial, CYTED e Instituto de Ecología, Xalapa. p. 111-175

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hanson, J. R. (2008). *The chemistry of fungi*. the royal society of chemistry, Thomas Graham house, Cambridge, 1-17
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*. 44: 223-270.
- Lee, Y. M., L. Y. Choi, y B. R. Min (2000). PCR-RFLP and sequence analysis of rDNA its region in the *Fusarium* spp. *Journal of Microbiology*. 38: 66-73.
- Luchi, N., C. M. Oliveira Longa, R. P. DantiCapretti, y G. Maresi (2014). *Diplodia sapinea*: the main fungal species involved in the colonization of pine shoots in Italy. *Forest Pathology*, 44: 372-381
- Luchi, N., M. E. Sánchez y P. Capretti (2008). Preliminary notes on the population structure of *Heterobasidion abietinum* from *Abies pinsapo* in Spain *Phytopathologia Mediterranea*, 47:277-281
- Mills, P. R., S. Sreenivasaprasad y A. E. Brown (1992). Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 98: 137-144.
- Moretti, M., M. Saracchi y G. Farina (2004). Morphological, physiological and genetic diversity within a small population of *Cercospora beticola* Sacc. *Annals of Microbiology*, 54: 129-150.
- Maharaj, A., y S. N. Rampersad (2011). Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsium annuum* L.) based on ITS PCR-RFLP fingerprinting. *Molecular Biotechnology*. 50: 237-49

- Nilsson, R.H., E. Kristiansson, M. Ryberg, N. Hallenberg y K. H. Larsson. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 4: 193-201
- Singh, N. Rajesh Bajpai, K. S. Mahar, Vandana Tiwari, D. K. Upreti, T. S. y Rana (2014) ISSR and DAMD markers revealed high genetic variability within *Flavoparmelia caperata* in Western Himalaya (India). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 20:501-508.
- Rampersad, S. N. (2011). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of papaya in Trinidad. *Plant Disease*, 95, 1244–1254.
- Rohlf, F. J. 2009. NTSYSpc: numerical taxonomy system. ver. 2.21c. Exeter Software: Setauket: New York
- Saitou, N. y M. Ne. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Santini, A., A. Montagni, G. G. Vendramin y P. Capretti (2004). Analysis of the Italian Dutch elm disease fungal population. *Journal of phytopathology*, 153: 73-79
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque y D. Schindel,. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 6241–6246.
- Singh, N., R. Bajpai, K. .S Mahar, V. Tiwari, D. K. Upreti y T. S. Rana (2014). ISSR and DAMD markers revealed high genetic variability within *Flavoparmelia caperata* in Western Himalaya (India). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20: 501-508.

- Simon, U. K., y M. Weiß (2008). Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 2251-2254.
- Suga, H., T. Hasegawa, H. Mitsui, K. Kageyama y M. Hyakumachi (2000). Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycological Research*, 104, 1175-1183.
- Talhinhas, P., S. Sreenivasaprasad, J. Neves-Martin y H. Oliveira (2002). Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology*, 92: 986-996.
- Tamura, K., D Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kuma (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tapia-Tussell, R., A. Quijano-Ramayo, A. Cortes-Velazquez, P. Lappe, A. Larqué-Saavedra y D. Perez-Brito (2008). PCR-Based Detection and Characterization of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* Causing Anthracnose in Papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Molecular Biotechnology*, 40: 293–298.
- Torres-Calzada, C., R. Tapia-Tussell, A. Nexticapan-Garcez, R. Matin-Mex, A. Quijano-Ramayo, A. Cortés-Velázquez., Higuera-Ciapara, I., y Perez-Brito, D. (2011). First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in *Jatropha curcas* in Yucatan, Mexico. *New Disease Reports*, 23: 6.
- Van Hemelrijck, W., J. Debode, K. Heungens, M. Maes y P. Creemers. (2010). Phenotypic and genetic characterization of *Colletotrichum* isolates from Belgian strawberry fields. *Plant Pathology*, 59: 853-861.

- Vargas-Díaz, A. A (2014). Estudio integral De *Acalypha gaumeri* Pax Y K. Hoffm dirigido a sus propiedades fungicidas. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México, 135 p.
- Verma, S. y T. S. Rana 2012. Genetic relationships among wild and cultivated accessions of curry leaf plant (*Murraya koenigii* (L.) Spreng), as revealed by DNA fingerprinting method. *Molecular Biotechnology*, 53: 139-149.
- Villanueva-Couoh, E., M. de los A. Sánchez-Briceño, J. Cristóbal-Alejo, E. Ruiz-Sánchez y J.M. Tún-Suárez (2005) Diagnostico y alternativas de manejo químico de tizon foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmos y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23:49-59.
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A Levesque y D. Schindel (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 6241-6246.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.), Academic Press. New York. USA. 315-322.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

4.1. Discusión general

El uso de los productos naturales para el control de enfermedades fungosas en la agricultura, es considerado una alternativa interesante para sustituir a los fungicidas sintéticos, debido a su naturaleza de especificidad, biodegradabilidad y baja toxicidad residual en el ecosistema (Ogba & Ovibo, 2008). Por otra parte, las plantas son ricas en diversidad de metabolitos secundarios, tales como los taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides, los cuales han probado que tienen propiedades antimicrobianas (Ashraf & Javaid 2007). Sin embargo, existen pocos reportes en la exploración de especies de plantas nativas de la Península de Yucatán para el control de plagas y enfermedades de los cultivos.

En el presente trabajo, se evaluaron los extractos de las raíces de *Acalypha gaumeri* (especie endémica de Yucatán) cultivada *ex-situ*, contra ocho cepas de hongos de importancia económica. Los extractos etanólicos obtenidos de plantas cultivadas en condiciones *ex-situ* mantuvieron sus propiedades antifúngicas. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Vargas-Díaz, (2014), al evaluar extractos etanólicos de raíces de *A. gaumeri* colectadas *in situ*. Además en el presente trabajo se demostró que los extractos hidroalcohólicos tuvieron también actividad antifúngica ante las especies de hongos probadas.

Vargas-Díaz, (2014) demostró que al menos dos compuestos están involucrados en la actividad antifúngica de *A. gaumeri*, y dilucidó la estructura de uno de ellos reportando que es de naturaleza heterocíclica nitrogenada. Esto permite hipotetizar que la planta en condiciones *ex-situ* continua produciendo este tipo de compuestos. No obstante sería importante realizar otras pruebas analíticas para corroborar esta hipótesis.

Los hongos evaluados en este trabajo fueron identificados y caracterizados molecularmente. Al agruparlos, usando los datos genéticos obtenidos mediante la técnica DAMD, se pudo observar que aún cepas de la misma especie se diferenciaron

genéticamente y que se formaron tres grupos bien definidos, Dos de estos grupos (1 y 3) correspondieron a las cepas que resultaron susceptibles a los extractos, mientras que el grupo 2, se formó con las especies de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium* que fueron resistentes para todos los extractos evaluados. En el grupo 1 donde se ubicaron las dos especies de *Alternaria*, se encontró una diferencia notable en cuanto a sus susceptibilidades, ya que se logró la inhibición a diferentes concentraciones. Corroborando que a pesar de que son de la misma especie, los aislamientos son diferentes y su respuesta ante el producto bioactivo fue diferente. Reportes similares en cuanto a nivel de resistencia dentro de la misma especie, se han encontrado para *Colletotrichum capsici* ante diferentes fungicidas (Torres-Calzada, 2015)

Los resultados de este trabajo muestran la consistencia (*in-situ* y *ex-situ*) en la producción de los metabolitos activos con propiedades antifúngicas de *A. gaumeri*, lo que sienta las bases para continuar los estudios sobre esta planta y la producción masiva de estos compuestos.

4.2. Conclusiones

Las raíces de las tres poblaciones de *Acalypha gaumeri* (Oxkutzcab, Tinum y Yaxcabá), propagada en condiciones *ex-situ* mantienen su actividad antifúngica.

Para las tres poblaciones evaluadas los extractos etanólicos e hidroalcohólicos fueron los que mostraron actividad antifúngica. Los hongos sensibles a estos extractos de *A. gaumeri* fueron *Alternaria alternata* (JG14 y JG32), *Alternaria chrysanthemi* (CICY004) y *Athelia rolfsii* (AT18).

Los extractos etanólicos e hidroalcohólicos a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, inhibieron la formación de esclerocios en la cepa de *Athelia rolfsii*.

Los hongos evaluados en este estudio fueron identificados molecularmente a nivel de especie como: *Colletotrichum capsici* (CCP27), *Colletotrichum gloeosporioides* (CGP6), *Alternaria alternata* (JG14 y JG32), *Fusarium equiseti* (JG22), *Fusarium solani* (JG2) y *Athelia rolfsii* (AT18).

La caracterización molecular de los hongos estudiados, reveló la diferencia genética entre las distintas cepas, que formaron tres clados, los cuales coinciden con el agrupamiento de las especies por su sensibilidad ante los extractos de *A. gaumeri*.

4.3. Perspectivas

Corroborar la presencia de los metabolitos antifúngicos de *Acalypha gaumeri* reportados de campo en las plantas cultivadas *ex –situ*.

Realizar estudios de toxicidad con organismos benéficos de los extractos de *A. gaumeri*

Continuar la evaluación de cepas de *Athelia rolfsii* de diferentes hospederos para confirmar la inhibición de los esclerocios.

Realizar formulados con el extracto etanólico de *A. gaumeri* y evaluar su efectividad en vivero y campo.

Continuar los estudios sobre la especie *A. gaumeri*, para seleccionar los fenotipos con mayor producción de metabolitos antifúngicos y obtener su huella genética.

4.4. Referencias

- Ashraf, H. y Javaid A. (2007). Evaluation of antifungal activity of Meliaceae family against *Macrophomina phaseolina*. Mycopath, 5:81-84.
- Ogba, E.M. y A. E. Ovibo (2008). Effects of three plants extracts (*Ocimum gratissimum*, *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha macrostachya*) on post-harvest pathogen of *Persea americana*. Journal of Medicinal Plants Research, 2: 311-314.
- Singh, N., R. Bajpai, K. S. Mahar, V, Tiwari, D. .K Upreti y T. S. Rana (2014). ISSR and DAMD markers revealed high genetic variability within *Flavoparmelia caperata* in Western Himalaya (India). Physiology and Molecular Biology of Plants. 20: 501-508
- Torres-Calzada, C. G. (2015). Estudio de la diversidad genética y de la variabilidad patogénica entre aislados de *Colletotrichum truncatum* (Syn. *C. capsici*) de diferentes hospederos. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México, 98p.
- Valencia-Yah, T. (2014). Identificación y caracterización molecular de los hongos patógenos que afectan a *Jatropha curcas* en el estado de Yucatán. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México, 112 p.
- Vargas-Díaz, A.A. (2014). Estudio integral de *Acalypha gaumeri* Pax y K. Hoffm. dirigido a sus propiedades. Tesis de doctorado. Centro de investigación Científica de Yucatán. México, 135 p.
- Villanueva-Couoh, E., M. de los A. Sánchez-Briceño, J. Cristóbal-Alejo, E. Ruiz-Sánchez y. J. M. Tún-Suárez (2005) Diagnostico y alternativas de manejo químico de tizon foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmos y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) kitamura en Yucatán, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 23: 49-59.

Woudenberg, J.H.C., J. Z. Groenewald y M. Binder (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75: 171-212.