



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS FÚNGICOS EN
MODELOS INSECTICIDAS Y ANTIFÚNGICOS**

Tesis que presenta

ANA LILIA RUIZ JIMÉNEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán. Marzo 2011



Carta de reconocimiento

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Evaluación de extractos fúngicos en modelos insecticidas y antifúngicos”, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y al Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, dentro de la Opción Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

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 dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán. Marzo de 2011



Ana Lilia Ruiz Jiménez

RECONOCIMIENTOS

A la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y al Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, por compartir sus conocimientos, por su paciencia y apoyo durante el desarrollo de la tesis.

Al H. Comité revisor de tesis, integrado por Dr. Oscar Moreno Valenzuela, Dr. Jairo Cristóbal Alejo y Dr. Esau Ruiz Sánchez, por sus observaciones y sugerencias en la redacción del documento.

A la Dra. Azucena González Coloma, por su apoyo para la realización del bioensayo insecticida y por las instalaciones prestadas.

A la Lic. Gilma

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con el número 228272

El trabajo fue financiado por el proyecto Microorganismos Asociados a la Producción de Metabolitos Secundarios Bioactivos.

A la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por prestar las instalaciones.

A la Dra. María Manuela de Jesús Reyes Estebanez, por su apoyo técnico en el manejo de técnicas microbianas y por su amistad.

A la I.Q. Irma Leticia Medina Baizabal, por su apoyo en el laboratorio, Sergio Pérez y Narcedalia Gamboa por el apoyo bibliotecario.

Al QFB. Edgar Caamal Fuentes, por su ayuda y su amistad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Abril, Andrés, Angel, Arely, Carlos e Ignacio, por compartir conmigo estos últimos años.

A mis amigos y compañeros de posgrado.

DEDICATORIAS

† *A mi padre Lorenzo Ruíz Sánchez, por haberme dado la oportunidad de estar en este mundo y por creer en mí.*

A mi madre Manuela Jiménez Santiz y a su esposo Alberto Veras por su apoyo incondicional y por su gran amor.

A mis hermanos Reynaldo, Cristóbal y Manuela por todos los momentos que hemos vivido juntos y por su cariño.

A mis sobrinos Luis, Ana Aime y Jimena por ser mi motivación cada día.

Contenido

Contenido	i
Índice de cuadros	v
Índice de figuras	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Capítulo I	
ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	7
1.1 ANTECEDENTES	7
1.1.1 Daños causados por plagas	7
1.1.2 Insectos plaga de importancia agrícola en estudio	7
1.1.2.1 Características del género <i>Myzus</i>	9
1.1.2.1.1 <i>Myzus persicae</i> Sulzer (Hemiptera: Aphididae)	9
1.1.2.2 Características del género <i>Rhopalosiphum</i>	9
1.1.2.2.1 <i>Rhopalosiphum padi</i> L.....	10
1.1.2.3 Características del género <i>Spodoptera</i>	10
1.1.2.3.1 <i>Spodoptera littoralis</i> Boisduval	11
1.1.2.4 Estrategias de control de insectos plaga.....	11
1.1.3 Enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos	13
1.1.3.1 Características del género <i>Colletotrichum</i>	13
1.1.3.1.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.....	14
1.1.3.2 <i>Corynespora</i> sp.....	14
1.1.3.2.1 <i>Corynespora cassiicola</i>	15
1.1.3.3 <i>Curvularia</i> sp.....	15
1.1.3.4 <i>Helminthosporium</i> sp.	16
1.1.3.5 Estrategias de control para hongos fitopatógenos	17
1.1.4 Aislamientos fúngicos seleccionados	18
1.1.4.1 Descripción del género o especie	19
1.1.4.1.1 <i>Acremonium</i>	19
1.1.4.1.2 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	20
1.1.4.1.3 <i>Corynespora cassiicola</i>	21

1.1.4.1.4 <i>Clonostachys rosea</i> (syn. <i>Gliocladium roseum</i>).....	22
1.1.4.1.5 <i>Cylindrium</i> sp.	23
1.1.4.1.6 <i>Cylindrocarpon</i> sp.	23
1.1.4.1.7 <i>Fusarium</i> sp.	24
1.1.4.1.8 <i>Perelegomyces parviechinulatus</i>	26
1.1.4.1.10 <i>Verticillium</i> sp.	27
1.2 OBJETIVOS	31
1.2.1 Objetivo general.....	31
1.2.2 Objetivos particulares	31
1.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	32
1.4 REFERENCIAS	33

Capítulo II

CONSERVACIÓN, CULTIVO DE CEPAS FÚNGICAS Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ORGANICOS	41
2.1 INTRODUCCIÓN.....	41
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.2.1 Medios de cultivo	43
2.2.2 Reactivación y conservación de cepas.....	44
2.2.3 Microcultivos	45
2.2.4 Cultivo de las cepas fúngicas en medio sólido (AF).....	45
2.2.4.1 Suspensión de esporas y/o micelio.....	45
2.2.4.2 Cultivo en arroz fermentado.....	46
2.2.5 Preparación de los extractos orgánicos.....	46
2.2.5.1 Obtención de los extractos de acetato de etilo.....	46
2.2.5.2 Obtención de extractos metanólicos	46
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
2.4 CONCLUSIONES	54
2.5 REFERENCIAS	55

Capítulo III

EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA	57
3.1 INTRODUCCIÓN.....	57
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	59

3.2.1 Estandarización del bioensayo en microdilución con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	59
3.2.1.1 Inducción de la esporulación de <i>C. gloeosporioides</i>	59
3.2.1.2 Bioensayo antifúngico en microdilución contra <i>C. gloeosporioides</i>	59
3.2.2 Bioensayo de dilución en agar contra <i>Corynespora cassiicola</i> (ITC-03), <i>Curvularia</i> sp (ITC-01) y <i>Helminthosporium</i> sp. (ITC-04).....	60
3.2.3.1 Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial	61
3.3.1 Establecimiento del bioensayo en microdilución para <i>C. gloeosporioides</i>	61
3.3.2 Evaluación de extractos contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (CICY 02) por la técnica de microdilución.....	63
3.3.3 Evaluación de los extractos contra <i>Corynespora cassiicola</i> (ITC-03), <i>Curvularia</i> sp. (ITC-01) y <i>Helminthosporium</i> sp. (ITC-04) en dilución en agar.....	65
3.4. DISCUSIÓN.....	69
3.5 CONCLUSIONES.....	74
3.6 REFERENCIAS	75

Capítulo IV

EVALUACIÓN INSECTICIDA	79
4.1 INTRODUCCIÓN.....	79
4.2 OBJETIVOS	81
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
4.3.1 Cría de insectos	81
4.3.1.1 <i>Myzus persicae</i>	81
4.3.1.2. <i>Rophalosiphum padi</i>	81
4.3.1.3 Insecto masticador	81
4.3.2 Bioensayo de establecimiento de <i>Myzus persicae</i> y <i>Rophalosiphum padi</i>	82
4.3.3 Bioensayo antialimentario contra <i>Spodoptera littoralis</i>	83
4.3.4 Cromatografía de capa delgada (CCD)	84
4.4 RESULTADOS	85
4.4.1 Bioensayo de inhibición de establecimiento contra <i>Myzus persicae</i>	85
4.4.2 Bioensayo de inhibición de establecimiento contra <i>Rophalosiphum padi</i>	87
4.4.3 Bioensayo antialimentario contra <i>Spodoptera littoralis</i>	88
4.4.4 Cromatografía de capa delgada de los extractos más activos	88

4.5 DISCUSIÓN.....	90
4.6 CONCLUSIONES.....	93
4.7 REFERENCIAS.....	94

Capítulo V

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	97
ANEXOS.....	104

Índice de cuadros

Cuadro 1. Características de insectos plaga seleccionados como modelos a evaluar.	8
Cuadro 2. Agroquímicos comerciales usados en el control de insectos.	12
Cuadro 3. Características de las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos.	13
Cuadro 4. Fungicidas comerciales empleados en el control de hongos fitopatógenos.	17
Cuadro 5. Actividad biológica reportada de hongos selectos (De la Rosa-García, 2007 y Reyes-Estebanez, 2009).	19
Cuadro 6. Metabolitos con actividad biológica reportados para los géneros y/o especies fúngicas en estudio.	29
Cuadro 7. Estado de las cepas en estudio.	45
Cuadro 8. Tiempo de crecimiento de las cepas seleccionadas en diferentes medios de cultivo.	48
Cuadro 9. Rendimiento de los extractos fúngicos en AcOEt (ECA) y metanol (ECM) de las cepas cultivadas en arroz fermentado (AF) por 40 días (% mg extracto/g AF).	53
Cuadro 10. Escala numérica para la lectura de la inhibición del crecimiento en el bioensayo en microdilución en microplaca (NCCLS, 2002).	60
Cuadro 11. Comparación de los resultados de la evaluación antifúngica de los extractos seleccionados por los métodos de microdilución y de disco.	64
Cuadro 12. Resultados de la evaluación antifúngica de los extractos fúngicos por el método de difusión en agar contra tres cepas fitopatógenas a 1,000 µg/mL.	66
Cuadro 13. Composición de la dieta artificial para <i>S. littoralis</i>	82
Cuadro 14. Evaluación de los extractos fúngicos frente a <i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Myzus persicae</i> y <i>Rhopalosiphum padi</i> a concentraciones de 100 µg/disco.	86
Cuadro 15. Determinación de la CL ₅₀ y CL ₉₀ de los extractos más activos contra <i>M. persicae</i>	87
Cuadro 16. CL ₅₀ y CL ₉₀ de los extractos contra <i>R. padi</i>	88
Cuadro 17. Rf de los extractos más activos contra hongos fitopatógenos y/o insectos.	96

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras de agroquímicos sintéticos utilizados en el control de insectos plagas.....	12
Figura 2. A) Conidio, B) Germinación del conidio y C) Conidióforo. Escala de 50 mm (Kwon et al., 2001).	15
Figura 3. <i>C. senegalensis</i> , A) Conidióforos y B) Conidios.....	16
Figura 4. <i>H. maydis</i> , A y B) Conidióforos, C) y D) Conidios (A, B y C = 100×; D = 400×).17	
Figura 5. Estructuras de agroquímicos sintéticos utilizados en el control de hongos fitopatógenos.....	18
Figura 6. <i>A. kiliense</i> , conidióforos y masa de conidios.....	20
Figura 7. A) Macro y microconidióforos, B) ramoconidio y cadenas de conidios. Escala 10 μ m.....	21
Figura 8. A) Conidióforos de forma verticilada y B) Conidióforos de forma penicilada.	22
Figura 9. <i>C. pauciseptatum</i> . (A–C) Clamidosporas. (D) Micelio aéreo. (E–G) Macroconidio. (H–J) Conidióforo del micelio aéreo formando macroconidios. (K–L) Conidióforos verticilados, espododoquio formando macroconidios.....	24
Figura 10. Macroconidios de <i>F. acuminatum</i> (1), <i>F. equiseti</i> (2) y <i>F. graminearum</i> (3). Microconidios de <i>F. fujikuroi</i> (4), <i>F. proliferatum</i> (5) y <i>F. verticillioides</i> (6). Clamidosporas de <i>F. oxysporum</i> (7), <i>F. equiseti</i> (8) y <i>F. solani</i> (9). Adaptado de Nelson et al. (1994).....	25
Figura 11. A, B) Conidióporos; C-F) Células conidógenas poliblasticas; H, I) Macro, micro y blastoconidio y G) Clamidosporas.....	26
Figura 12. Conidióforo con cabezuela fértil.....	26
Figura 13. A) Fiálides y B) Conidios en masa.....	27
Figura 14. <i>V. hahajimaense</i> , A) Conidióforo con fiálides verticiladas, B) Parte apical del conidióforo, C) Conidios y D) Clamidosporas en cadenas. Escala: 10 μ m (A, B y D), 5 μ m (C).....	28
Figura 15. Crecimiento fúngico en TSA, libres de bacterias (A, B) y con bacteria (C).....	47
Figura 16. Crecimiento fúngico en PDA (A) y en TSA (B).....	48
Figura 17. Crecimiento fúngico en los diferentes medios de cultivo; MAM: Agar maíz; MEA: Agar extracto de malta y PDA: Agar papa dextrosa.....	49
Figura 18. Metabolitos fúngicos reportados con actividad antifúngica.....	58

Figura 19. Bioensayo en microplaca para determinar la concentración del inóculo a emplear.	62
Figura 20. Observación el microscopio de A: Esporas; B: Hifas.	62
Figura 21. Réplica de las diferentes concentraciones evaluadas de esporas y DMSO.	63
Figura 22. Inhibición del crecimiento micelial; A) DMSO, B) Medio + fitopatógeno, C) AR-8a (1,000 µg/mL)	65
Figura 23. Inhibición del crecimiento micelial del extracto AR-8A. A) <i>Helminthosporium</i> sp., B) <i>Curvularia</i> sp. y C) <i>Corynespora cassiicola</i>	67
Figura 24. Inhibición del crecimiento micelial del extracto AR-3b: A) <i>Helminthosporium</i> sp., B) <i>Curvularia</i> sp. y C) <i>C. cassiicola</i>	68
Figura 25. Estructura química de las enniatinas aisladas del género <i>Fusarium</i>	70
Figura 26. Metabolitos con actividad antifúngica de <i>Fusarium incarnatum</i>	71
Figura 27. Estructura molecular propuesta para la fusarolactona aislada de <i>Fusarium incarnatum</i>	71
Figura 28. Metabolitos con actividad antifúngica reportados de <i>Clonostachys rosea</i>	73
Figura 29. Metabolito con actividad antifúngica de <i>Phialophora</i> sp.	73
Figura 30. Metabolitos fúngicos reportados con actividad insecticida.	80
Figura 31. A) Preparación de discos de pimiento con un sacabocados de 2 cm ² y B) Unidad experimental: caja con el disco en dos mitades sobre el agar y la tapa correspondiente con 10 áfidos.	83
Figura 32. Distribución del tratamiento: a) caja inicial con dos discos de tratamiento (T) y dos de control (C); b) Larvas del sexto estadio y (C) final del ensayo con un par de hojas consumidas en un 75% aproximadamente.	84
Figura 33. Cromatografía de capa delgada de los extractos crudos activos en tres diferentes sistemas de disolventes (a: hexano-acetona 8:2; b: CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 8:2 y c: CH ₂ Cl ₂ : MeOH 8:2). Muestra1: <i>Clonostachys rosea</i> AR-3b; 2: <i>Fusarium incarnatum</i> AR-8b; 3: Extracto metanólico de arroz fermentado AFMeOH, 4: <i>Fusarium incarnatum</i> AR-8a; 5: <i>Gliomastix murorum</i> AR-9a; 6: <i>Verticillium</i> sp. AR-15a y 7: Extracto de acetato de etilo de arroz fermentado AFAcOEt	89
Figura 34. Estructura química de los ácidos grasos mirístico y linoléico y del sitosterol.	91
Figura 35. Metabolitos aislados de <i>Verticillium lecanii</i>	92
Figura 36. Ciclopéptido aislado de <i>Clonostachys rosea</i>	93

Índice de anexos

Anexo 1. Programa en Stargrafic del análisis de varianza de los extractos sobre *Corynespora cassiicola*.....104

Anexo 2. Programa en Stargrafic del análisis de varianza de los extractos sobre *Curvularia* sp.107

Anexo 3. Programa en Stargrafic del análisis de varianza de los extractos sobre *Helminthosporium* sp.....109

Anexo 4. Porcentaje de inhibición del establecimiento contra los áfidos *M. persicae* y *R. padi*.110

Anexo 5. Porcentaje de inhibición del establecimiento contra los áfidos a diferentes concentraciones.112

Anexo 6. Programa en Stargrafic del análisis de varianza de los extractos sobre *Spodoptera littoralis*.....116

RESUMEN

En los últimos años, en el área agrícola se ha ido incrementado los insectos plagas y las enfermedades fúngicas. Una opción para el control de éstos es el uso de productos naturales, como los producidos por los hongos. Estos microorganismos son reconocidos como una fuente de compuestos con alta diversidad química y variada actividad biológica. Con base en lo anterior, en el laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY se realizó un estudio exploratorio del potencial biológico de cepas fúngicas de la región peninsular, obteniéndose resultados prometedores.

Se seleccionaron 16 cepas de hongos, cultivadas en medio de arroz fermentado (AF). Al final del crecimiento, el medio se sometió a extracción con dos disolventes de polaridad ascendente: acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). Los extractos obtenidos se evaluaron contra *Myzus persicae* y *Rophalosiphum padi* en el bioensayo de repelencia y antialimentaria contra el masticador *Spodoptera littoralis*. También se realizó el ensayo antifúngico por dilución en agar contra *Corynespora cassicola*, *Curvularia* sp. y *Helminthosporium* sp. Además, se estableció el bioensayo fungicida por la técnica de microdilución contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

Los resultados generales indicaron que el extracto de *Fusarium incarnatum* fue el más activo contra *C. gloeosporioides*, empleando el ensayo en microdilución. Esto confirma la actividad reportada con la técnica de disco. Los ensayos contra los otros hongos demostraron que los extractos de AcOEt y MeOH de *F. incarnatum* (AR-8a y AR-8b) poseen un amplio espectro de acción al reducir el crecimiento (ICM > 50%) de *Corynespora cassicola*, *Curvularia* sp. y *Helminthosporium* sp. Por otra parte, en los bioensayos insecticidas se observó que el extracto metanólico de *Clonostachys rosea* y el extracto de AcOEt de *Gliomastix murorum* tuvieron la mayor capacidad de inhibir el establecimiento de *M. persicae* (93.3 y 91.7%, respectivamente) así como el de *R. padi* (81.6 y 92.1%, respectivamente). Estos resultados señalan el gran potencial de estas cepas para seguir siendo investigadas y a futuro ser aplicadas en un manejo integrado de plagas.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

Second block of faint, illegible text in the middle of the page.

Third block of faint, illegible text in the lower middle section of the page.

ABSTRACT

In recent years, insect pests and fungal diseases in agriculture areas have been increasing. Several factors have generated this situation, such as indiscriminate applications of synthetic agrochemicals, causing the induction of resistance in pests. Nowadays, one alternative is the use of fungal extracts or its metabolites. Fungi are recognized as an important source of compounds with high chemical and biological diversity. In our laboratories, we carried out an exploratory study on the biological potential of fungal strains isolated from this area, with promising results.

Following the objectives, we selected 16 fungal strains, which were cultured in fermented rice, and extracted with two solvents of increase polarity, ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH). The organic extracts obtained were evaluated on insecticide (*Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi* and *Spodoptera littoralis*) and fungicide (*Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp y *Helminthosporium* sp.,) assays. Furthermore, a microdilution bioassay against *Colletotrichum gloeosporioides* was established.

All results indicated that extracts of *Fusarium incarnatum* are the most active against *C. gloeosporioides*, using the microdilution technique, confirming previous results obtained by using the disk assay. In addition, the tests against the other two fungi demonstrated that both EtOAc and MeOH extracts of *F. incarnatum* (AR-8a and AR-8b) possess a broad spectrum of action to reduce the growth (ICM < 50%) of *Helminthosporium* sp., *Corynespora cassiicola* and *Curvularia* sp. On the other hand, the global analysis of the results in the insecticide bioassay allowed to detect the methanol extract of *Clonostachys rosea* and EtOAc extract of *Gliomastix murorum* with the greatest ability to inhibit the growing of *M. persicae* (93.33 and 91.69%, respectively) and *R. padi* (81.60 and 92.14%, respectively). These results indicate the great potential of these fungal strains, which should be further investigated to use them in the future as part of a broad program to combat pests.

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

The following information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose. The information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose. The information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose.

The following information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose. The information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose. The information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose.

The following information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose. The information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose. The information is being provided to you for your information only. It is not intended to be used for any other purpose.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se ha comprobado que los plaguicidas sintéticos más empleados en la agricultura son los insecticidas seguidos por los fungicidas. Sin embargo, estos productos llevan asociados una serie de problemas, como la alta persistencia en el ambiente, la inducción de resistencia desarrollada tanto por los insectos como por los microorganismos patógenos, la toxicidad para el hombre y la fauna benéfica. Todo esto ha generado desequilibrios ecológicos y una proliferación de las especies que compiten con ella. Con estos antecedentes, actualmente se ha intensificado la búsqueda de compuestos de origen natural que puedan sustituir a los plaguicidas sintéticos convencionales (Vázquez-Luna *et al.*, 2007).

En esta búsqueda, se han estudiado plantas y microorganismos por sus propiedades plaguicidas. En especial, el metabolismo fúngico biosintetiza una gran variedad de sustancias químicas de diversa complejidad y con estructuras muy variadas, dando lugar a una amplia gama de actividades biológicas. Los metabolitos de los microorganismos que forman parte de distintos sistemas ecológicos contribuyen a mantener un nivel bajo en las poblaciones de las distintas especies de competidores. Esto ha sugerido la posibilidad de utilizar sus principios activos como herramienta de control de los fitopatógenos, por ejemplo *Beauveria bassiana* (chapulines, mosquita blanca), *Metarhizium anisopliae* (termitas y cucarachas) y *Paecilomyces fumosoroseus* (mosquita blanca) (Pedras *et al.*, 2002).

En los Laboratorios de la Unidad de Biotecnología (UBT) del Centro de Investigación Científica de Yucatán se han realizado estudios de aislamiento de hongos habitantes de cenotes y hojarasca. Estos han sido sometidos a bioensayos para determinar su actividad antimicrobiana, antioxidante y nematocida (Reyes-Estebanez, 2009; De la Rosa-García, 2007), mostrando resultados prometedores. Hasta antes de la presente contribución, la actividad insecticida de estos aislamientos no había sido evaluada. Lo anterior llevó a plantear como objetivo de este trabajo la selección de 16 hongos a partir del cepario de la UBT (*Acremonium* sp. (XHH4A), *Beltraniella portoricensis* (MRH42), *Cladosporium cladosporioides* (XHH1E), *Corynespora casiiicola* (MRH1), *Clonostachys rosea* (TZH27),

Cylindrium elongatum (MRH45), *Cylindrocarpon congoens* (XHH8A), *Fusarium* sp. (TZH54), *Fusarium incarnatum* (TZH23), *Gliomastix murorum* (MRH36), *Phaeobotrys* sp. (GHH14), *Perelegomyces parviechinulatus* (GHH25), *Phialophora verrucosa* (MRH54), *Verticillium* sp. (TZH28) y *Volutella* sp. (TZH22)) y evaluar sus correspondientes extractos de acetato de etilo y metanol con tres especies de insectos, para enriquecer los estudios de las propiedades plaguicidas de los microorganismos tropicales del estado de Yucatán y con la finalidad de establecer otra posible aplicación de importancia en la agricultura. Adicionalmente, validar la actividad antifúngica observada en los extractos con modelos de bioensayos antifúngicos en microplaca, técnica que emplea una reducida cantidad de extracto a evaluar y determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto en estudio.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Daños causados por plagas

Las enfermedades y las plagas agrícolas representan un problema muy serio para la producción de los cultivos. Las plagas afectan a la planta en forma directa y en muchos casos son responsables de la transmisión de enfermedades que causan pérdidas calculadas del 20-30% en la producción, siendo estos los principales problemas que confrontan los productores, debido a que deterioran la calidad del fruto y afectan el rendimiento de las cosechas (García-Herrera, 2007).




Con la idea de mantener una agricultura libre de plagas se ha llegado al abuso en el uso de los plaguicidas convencionales. En el mundo se estima que cinco millones de toneladas de agroquímicos sintéticos son aplicados anualmente. Sin embargo, a pesar de su alta eficiencia en la mortalidad, estos compuestos carecen de selectividad, por lo que resultan altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas (Carrillo-Rayas, 2009). Además, el uso sin un control adecuado de estos productos ha llevado al incremento de la incidencia de estos problemas. El rubro de mayor consumo en los países en desarrollo es el de los insecticidas, donde representan 50% del consumo total mundial, mientras que en el caso de los fungicidas es de 20% y de 10% en los herbicidas; esto es debido a que las pérdidas en los cultivos son causadas en aproximadamente 14% por los insectos, 11% por los hongos y 10% por malezas (García-Herrera, 2007).

1.1.2 Insectos plaga de importancia agrícola en estudio

Alrededor del mundo se pierden millones de pesos cada año en la agricultura debido a la presencia de insectos dañinos. Aproximadamente 10,000 especies se alimentan de cultivos y de éstas, 700 causan la mayor parte del daño a los cultivos de importancia agrícola a nivel mundial. Esto repercute dramáticamente en muchas naciones, produciendo hambre y la ruina económica a los granjeros. Por otro lado, se sabe que el daño causado por los insectos supera unas diez veces el gasto invertido en la aplicación

de plaguicidas (García, 2007). A nivel mundial, los géneros *Myzus*, *Rhopalosiphum* y *Spodoptera* son considerados entre las plagas que causan las mayores pérdidas de producción (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de insectos plaga seleccionados como modelos a evaluar.

Especie	Taxonomía	Cultivo que atacan	Daños
 <i>Myzus persicae</i> Sulzer	Orden: Hemiptera Suborden: Homoptera Familia: Aphididae	Solanáceas	Chupadores, transmisión de virus
 <i>Rhopalosiphum padi</i> Linnaeus	Orden: Hemiptera Suborden: Homoptera Familia: Aphididae	Gramíneas	Chupadores, transmisión de virus
 <i>Spodoptera littoralis</i> Boisduval	Orden: Lepidoptera Familia: Noctuidae	Cultivos hortícolas, gramíneas	Masticador, ocasionando daños en los brotes

Por esta razón, en el Instituto de Ciencias Agrarias de Madrid, España (CSIC), han estandarizado bioensayos con tres modelos de insectos de alto impacto agronómico. Estos incluyen al masticador *Spodoptera littoralis* y los chupadores *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*.

1.1.2.1 Características del género *Myzus*

Los áfidos constituyen un extenso grupo de insectos; existen aproximadamente 4,700 especies de las cuales 450 son plagas de cultivos. Un total de 227 áfidos transmiten virus, debido a esto son importantes plagas en cultivos agrícolas y hortícolas en todo el mundo. Causan daño a las plantas por la succión de la savia del floema, provocan el amarillamiento, arrosamiento, deformaciones y caída anticipada de las hojas, además de la disminución del crecimiento y el ennegrecimiento de los órganos de las plantas, debido al desarrollo de hongos saprofitos (fumaginas) (Delfino *et al.*, 2007) y por la transmisión de virus (Boom *et al.*, 2000). Hay algunas especies que sólo afectan a un único cultivo (monófagas), y otras que lo hacen a gran número de ellos (polífagas).

1.1.2.1.1 *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae)

Myzus persicae es conocido como el pulgón verde del melocotonero y la papa; es una especie cosmopolita, aunque prefiere los climas templados, apareciendo en América del Norte y Europa. Es un insecto polífago que produce importantes daños directos e indirectos sobre los cultivos: tomate, pepino, papa, tabaco y muchos otros cultivos. *M. persicae* quizás sea el pulgón económicamente más importante, ya que tiene una gama muy amplia de especies hospederas secundarias, incluyendo algunos cultivos de hortalizas.

Además, esta plaga es capaz de transmitir más de 100 tipos de virus, entre los más importantes son el virus Y de la papa (PVY), el virus del mosaico de la alfalfa (AMV), el virus del ápice amarillo del tomate (TYTV), el virus del grabado del tabaco (TEV) y el virus del mosaico del pepino (CMV) (Cuadro 1) (Blackman y Eastop, 2000).

1.1.2.2 Características del género *Rhopalosiphum*

El género *Rhopalosiphum* alcanza su mayor incidencia sobre plantas jóvenes o en estados vegetativos, reportados como plagas de avena, cebada, maíz y otros cultivos. En una primera instancia, las colonias se localizan en el envés de las hojas inferiores, luego ascienden hacia las hojas superiores, tallos, espigas y mazorcas (Ninkovic *et al.*, 2003). Dependiendo del estadio, condiciones del cultivo y de la intensidad del ataque, puede

haber una pérdida en la producción de granos, aunque también es afectada la calidad de los mismos. Las colonias producen abundante mielecilla que favorece el desarrollo de hongos inductivos de fumagina sobre las plantas. Son considerados transmisores de diferentes virus, siendo un importante transmisor del virus causante del enanismo amarillo de la cebada (BYDV) (Peruzzo *et al.*, 2007).

En México se encuentra *Rhopalosiphum maidis*, que causa pérdidas importantes en el cultivo de maíz. Principalmente se ha reportado para el estado de Sinaloa.

1.1.2.2.1 *Rhopalosiphum padi* L.

La especie *Rhopalosiphum padi* se caracteriza por su forma redondeada, color verde oliva con dos manchas rojizas en la base de los cornículos y antenas cortas. Este áfido se establece en las partes bajas de la planta y es el primer pulgón que aparece en el cultivo comúnmente en invierno. En los cereales, es considerada una de las plagas de insectos más graves en todo el mundo y uno de los principales vectores del virus BYDV (virus del enanismo amarillo de la cebada) y del virus MDMV (virus del mosaico y enanismo del maíz) (Jiménez-Martínez *et al.*, 2004) (Cuadro 1).

1.1.2.3 Características del género *Spodoptera*

El género *Spodoptera* se encuentra ubicado dentro del orden Lepidóptera, abarca un total de 20,000 especies y se caracterizan porque sus adultos vuelan de noche y son de colores grisáceos u oscuros. Son plagas muy polífagas, atacan a cualquier tipo de cultivo herbáceo; presentan comportamiento gregario, los estados inmaduros tienen tendencia a vivir en gran número sobre la misma planta. Algunas orugas viven en flores, semillas en desarrollo, tallos o raíces, pero la mayoría de ellas comen hojas y emplean sus fuertes mandíbulas para roerlas hasta la vigorosa vena (Amate *et al.*, 2000).

Hay reportadas en el mundo unas 37 especies, de las cuales para México sólo dos son de importancia económica relevante: *S. exigua* y *S. frugiperda*. Ambas especies ocasionan severos daños y pueden provocar pérdidas que van desde el 20% hasta la pérdida total del cultivo desde las primeras etapas de desarrollo de la planta (Del Rincon *et al.*, 2006).

1.1.2.3.1 *Spodoptera littoralis* Boisduval

Es una plaga polífaga ampliamente distribuida y migratoria, con notables fluctuaciones en sus poblaciones, las larvas se refugian durante el día bajo tierra o restos vegetales. Estas se alimentan de hojas, aunque ataca cualquier parte de la planta y del fruto; la puesta de huevos generalmente la hacen en el envés de la hoja (Hoda *et al.*, 2010).

S. littoralis causa daño a más de 87 especies de importancia económica (Aydin y Gürkan, 2006). Los principales cultivos afectados incluyen: los hortícolas, alfalfa, algodón, chile, maíz, tomate, etc. Cuando son pequeñas se alimentan de la epidermis de las hojas, las adultas se comen toda la hoja, produciendo grandes defoliaciones, pudiendo también roer los tallos, llegando a perforar galerías.

1.1.2.4 Estrategias de control de insectos plaga

Entre los productos agroquímicos más empleados se encuentran los insecticidas, principalmente de los tipos carbamato, organoclorados, organofosforados, piretroides y neonicotinoides (Imidacloprid) (Cuadro 2 y Figura 1); además, se han reportado detergentes, aceites y mezclas de productos (Araya *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso de insecticidas por más de cuatro décadas ha llevado a crear poblaciones insectiles resistentes. Un mecanismo que han desarrollado consiste en una sobreproducción de dos carboxilesterasas estrechamente relacionadas (E4 y FE4) que secuestran o hidrolizan estructuras organofosforadas (Margaritopoulos *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Agroquímicos comerciales usados en el control de insectos.

Tipo	Nombre comercial	Ingrediente activo	Espectro de acción	Modo de acción
Sistémico	Imidacloprid 70 Wp	1-(6-Cloro-3-piridinil)metil-N-nitro-2-imidazolidinimina	Amplio	Actúa interfiriendo con la transmisión de impulsos nerviosos
Contacto	Diazinón Dragon 25 E	O,O-dietil-O-2-isopropil-6-metil pirimidin-4-il fosforotioato	Amplio	Interfiere en la transmisión de impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa
	Teflubenzurón	Benzoilurea		Inhibidores de la síntesis de quitina, tipo O
	Bifentrina	(2-metil-(1,1'-bifenil)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato	Amplio	Moduladores del canal de sodio

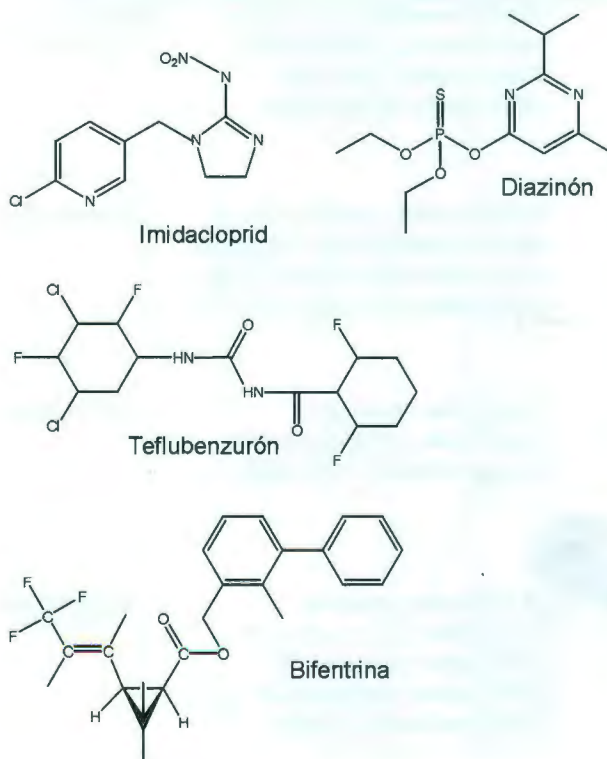
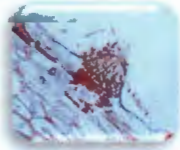





Figura 1. Estructuras de agroquímicos sintéticos utilizados en el control de insectos plagas.

1.1.3 Enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos

Los hongos destacan como una de las causas principales de una gran variedad de enfermedades, como son las manchas foliares, lesiones ulcerosas, royas, mildius, chancros, podredumbre y manchas en la madera, podredumbre de la raíz, marchitamientos, hernias de las raíces, entre otras (Cuadro 3) (Herrera y Ulloa, 1990). Los daños ocasionados varían desde leves hasta la completa destrucción y muerte de los tejidos invadidos; debido a esto, los productores son afectados con pérdidas que van del 30-70% del cultivo (Navarrete, 2010).

Cuadro 3. Características de las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos.

Especie	Sintomas	Cultivo que atacan	Fotos esporas
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz	Puntos necróticos de color café oscuro, rodeados de halo amarillo sobre las nervaduras de las hojas.	Papaya, mango, anonáceas	
<i>Corynespora</i> sp.	Puntos color castaño rojizos; en las hojas forman manchas con centro café (hasta 2 cm), rodeadas de un halo amarillo.	Solanáceas	
<i>Curvularia</i> sp.	Pequeñas manchas necróticas o cloróticas, con una aureola de color claro.	Gramíneas	
<i>Helminthosporium</i> sp.	Al inicio son lesiones pequeñas y romboides; al fusionarse producen la quemadura completa de extensas áreas foliares.	Gramíneas	

1.1.3.1 Características del género *Colletotrichum*

Colletotrichum ocasiona manchas necróticas en fruto, con el centro deprimido y de color más claro, luego aparecen puntuaciones negras constituidas por fructificaciones del

patógeno. Los acérvulos presentan setas y contienen conidios falcados hialinos. Este género, es el causante de un grupo de enfermedades conocidas como antracnosis, las cuales pueden manifestarse tanto en precosecha como en postcosecha, en virtud de la capacidad de infección latente que posee el hongo (Bailey *et al.*, 1992). La antracnosis afecta cereales, leguminosas, pastos y cultivos perennes, incluyendo árboles frutales. Entre los frutales más afectados por la antracnosis, destacan el mango (*Mangifera indica* L.), el aguacate (*Persea americana* Mill.), el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Cav.) y la papaya (*Carica papaya* L.) (Cuadro 3).

1.1.3.1.1 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc

C. gloeosporioides es una especie de amplia distribución en todo el mundo, especialmente en zonas tropicales y subtropicales. Las colonias de *C. gloeosporioides*, presentan coloraciones de blanco grisáceo a gris oscuro, oscureciéndose con la edad; también se han encontrado de color naranja cuando se ha formado el acérvulo maduro. También existen colonias de color rosa y salmón (Andrade *et al.*, 2007). Presentan micelio aéreo liso y fieltro o en manchón asociado con conidióforos. Conidios formados en masas de color salmón, el tamaño varía de 12-17 × 3.5-6.0 µm y de 16-18 µm de largo por 4-6 µm de ancho. Los conidios son hialinos, unicelulares, de formas cilíndricas o elípticas y falcados o lunados. Esclerocios ausentes, pudiendo confundir los ascostromas inmaduros con estas estructuras. Apresorios clavados, ovados algunas veces lobulados de color café de 6-20 × 4-12 µm (Kumar *et al.*, 2001) (Cuadro 3).

1.1.3.2 *Corynespora* sp.

Corynespora es un género cosmopolita, asociado a manchas foliares, color café con un halo clorótico. Usualmente ataca a hojas jóvenes, aunque también el tallo, fruto, peciolo y raíces se ven afectados (Jin-Hyeuk *et al.*, 2001).

1.1.3.2.1 *Corynespora cassiicola*

Presenta conidióforos rectos, tabicados, largos, no ramificados de color castaño oscuro, que se originan de una célula de base hinchada con el ápice de crecimiento algo más claro, con cicatriz conidial marcada. Los conidios son lisos, coloreados de castaño oliváceo y de forma variable al igual que su tamaño, aunque generalmente son muy grandes (8-20 μm \times 130-220 μm); y se originan ya sea solitarios o en cadenas, aproximadamente cilíndricos, rectos o ligeramente curvados, con base hinchada e hilum marcado. Se adelgazan y aclaran hacia el ápice. Poseen numerosos pseudoseptos (6-15) que también pueden ser rectos o ligeramente curvos (Figura 2).



Figura 2. A) Conidio, B) Germinación del conidio y C) Conidióforo. Escala de 50 μm (Kwon et al., 2001).

La especie *C. cassiicola* ha sido detectada en más de 70 especies de plantas, incluyendo a los cultivos de importancia económica tales como algodón, soya (Kithsiri Wijeratne *et al.*, 2010).

1.1.3.3 *Curvularia* sp.

El género *Curvularia* es considerado un patógeno secundario de muchas especies de plantas (Sisterna *et al.*, 1994). La mayoría de las especies de éste se encuentran en regiones tropicales y subtropicales, aunque existen reportes en zonas templadas. Ocasionalmente ocasionan daño en forma de manchas foliares principalmente a gramíneas, pasto y granos de cereales (Schwartz, 2005).

Las colonias son de textura algodonosa, con micelio extensivo, gris oscuro con matices de gris claro; se caracterizan por los conidióforos marrones, simples, con esporas apicales o en nuevos puntos de crecimiento simpodiales; tienen conidios oscuros, células terminales claras, de 3-5 células, más o menos fusiformes, típicamente curvadas, con una de las células centrales más alargada (Figura 3) (Torres *et al.*, 2008) (Cuadro 3).

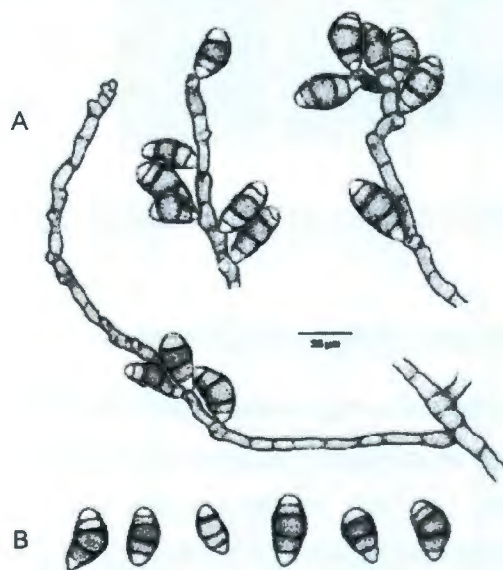


Figura 3. *C. senegalensis*, A) Conidióforos y B) Conidios.

1.1.3.4 *Helminthosporium* sp.

El género *Helminthosporium* se manifiesta por pequeñas manchas en las hojas de color pardo o negruzco, de formas ovaladas, causando decoloración y necrosis en la semilla así como también en la corona y la raíz de la planta. Debido a ello, el porcentaje de germinación es bajo y de poca vigorosidad. Ataca principalmente a gramíneas.

El micelio es de textura aterciopelada, con crecimiento moderado, de color gris claro con matices cafés y blancos; el borde es marcado, delgado, radiado de color crema. Topografía con tres capas circulares irregulares, de tonalidad marrón con varios puntos negros dispersos (Torres *et al.*, 2008). Las hifas septadas, conidióforos simples o

ramificados, erectos o flexibles y cilíndricos; la parte media es café oscuro. Posee células conidiógenas politétricas, integradas, terminales e intercalares. Posee conidios solitarios, simples, usualmente subhialinos (Cuadro 3 y Figura 4) (Alarcon, 1988).

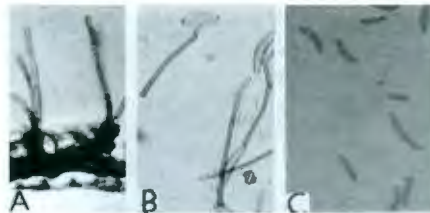


Figura 4. *H. maydis*, A y B) Conidióforos, C) y D) Conidios (A, B yC. = 100×; D = 400×).

1.1.3.5 Estrategias de control para hongos fitopatógenos

Para controlar hongos fitopatógenos lo más utilizado son los productos químicos semi y/o sintéticos. Estos son fungicidas de contacto o sistémicos; los primeros se aplican al follaje sin llegar a penetrar la planta. Los más empleados son el captán, clorotalonil y folpán (Villanueva *et al.*, 2005). Los sistémicos son absorbidos por las plantas a través de la raíz (Cuadro 4 y Figura 5).

Cuadro 4. Fungicidas comerciales empleados en el control de hongos fitopatógenos.

Fungicida	Nombre comercial	Ingrediente activo	Espectro de acción	Modo de acción
Sistémico	Benomil®	Metil-1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol-carbamato	Amplio	Causa una distorsión morfológica de las esporas durante la germinación
Contacto	Daconil®	Tetracloroisofaltonitrilo	Amplio	Inactiva los grupos-SH en aminoácidos, proteínas y enzimas; inhibe la germinación de esporas
	Captán®	N-(triclorometilitio) ciclohex-4-ene-1,2-dicarboximida	Amplio	Inhibe y altera diversos procesos metabólicos de manera simultánea

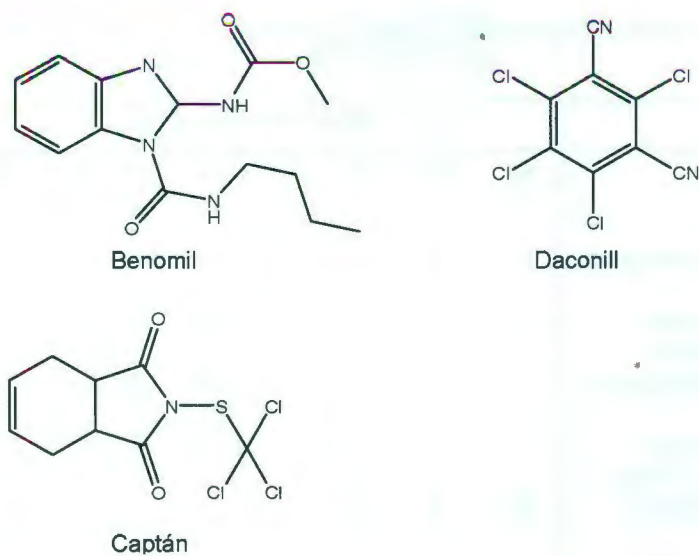


Figura 5. Estructuras de agroquímicos sintéticos utilizados en el control de hongos fitopatógenos.

1.1.4 Aislamientos fúngicos seleccionados

Los hongos microscópicos del cepario de la Unidad de Biotecnología (UBT) han sido evaluados en varios ensayos biológicos. Entre estos se seleccionaron aquellos que previamente habían sido detectados con alguna propiedad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, y/o por antecedentes quimiotaxónomicos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad biológica reportada de hongos selectos (De la Rosa-García, 2007 y Reyes-Estebanez, 2009).

Cepa	Halo de inhibición (mm)								Antioxidante (Rf)
	A.t	C.g	P.a	B.s	S.a	X.c	C.a	E.c	
<i>Acremonim</i> sp. XHH4A						16			0.58, 0.12
<i>Beltraniella portoricensis</i> (F.Stevens) Piroz, MRH42	11	15							
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) G.A. de Vries, XHH1E				9	9	8			
<i>Corynespora cassicola</i> (Berk & M.A. Curt) C.T. Wei, MRH1					12	15			
<i>Clonostachys rosea</i> Schroers, Samuels, Seifert & Gams, TZH27						8			0.14
<i>Cylindrium elongatum</i> Bonord, MRH45	18	15	15						
<i>Cylindrocarpon congoense</i> Mey, XHH8A					8	8			No tiene
<i>Fusarium</i> sp., TZA54		11					11		0.48
<i>Fusarium incarnatum</i> (Desm.) Saccardo, TZH23	18	25		22	26		33	23	0.74
<i>Gliomastix murorum</i> (Corda) S. Hughes, MRH36				8		8	8		
<i>Phaeobotrys</i> sp., GHH14								11	
<i>Perelegamyces parviechinulatus</i> W.B. Kendr. & R.F. Castañeda, GHH25							8		
<i>Phialophora verrucosa</i> Medlar, MRH54				9					
<i>Verticillium</i> sp., TZH28				14	16		19	13	0.69, 0.28
<i>Volutella</i> sp., TZH22				10			9		No tiene

A.t: *Alternaria tagetica*; C.g: *Colletotrichum gloeosporioides*; P.a: *Phytium aphanidermatum*; B.s: *Bacillus subtilis*; S.a: *Staphylococcus aureus*; X.c: *Xanthomonas campestris*; C.a: *Candida albicans*; E.c: *Erwinia carotovora*

1.1.4.1 Descripción del género o especie

1.1.4.1.1 *Acremonium*

Los hongos del género *Acremonium* son cosmopolitas, siendo comúnmente aislados de restos vegetales o del suelo, las colonias crecen moderadamente rápido y presentan textura compacta, aterciopelada, de color blanco o gris pálido con un reverso incoloro; pueden ser planas o plegadas presentando ocasionalmente cierto relieve en el centro. Las hifas son septadas, hialinas, comúnmente muy angostas; las fiálides, que crecen

directamente en el extremo de las hifas, son solitarias, no ramificadas y erectas. Éstas se separan de las hifas por medio de un tabique y se vuelven cónicas hacia el ápice. En dicho ápice se encuentran los conidios, fusiformes, que usualmente aparecen como racimos en esferas unidos a un material gelatinoso. Dichos conidios pueden ser unicelulares o multicelulares, dependiendo de la especie a la que pertenezcan (Figura 6) (Seifert y Gams, 2001).



Figura 6. *A. kiliense*, conidióforos y masa de conidios.

Recientemente de *Acremonium* spp. se han obtenido metabolitos activos con variadas estructuras, incluyendo las halimecinas D y E, oxepinamidas A-C y acremolactona (Abdel-Lateff *et al.*, 2002). Así también, se han reportado para este género metabolitos tipo hidroquinona con importante actividad antioxidante y diterpenos glicosilados tipo virescenósidos, con actividad contra células tumorales (Abdel-Lateff *et al.*, 2002; Afuyatullof *et al.*, 2002; Agatsuma *et al.*, 2002).

1.1.4.1.2 *Cladosporium cladosporioides*

C. cladosporioides forma colonias de color oliváceo, a veces grises o marrones; aterciopeladas, flocosas o pelosas; a veces presenta estromas. Los conidióforos son macronematosos o semimacronematosos simples o poco ramificados, con una coloración marrón o verdosa, y de superficie lisa o ligeramente granulosa. La célula conidiógena es poliblastica, generalmente integrada y simpodial; da lugar a conidios que generalmente quedan en cadenas acrópetas. Los conidios pueden ser de forma variada (elipsoidales, limoniformes, oblongos, esféricos, subesféricos, fusiformes), con una cicatriz en la base; son unicelulares o con 1-3 septos transversales; poseen pared lisa, verrugosa o equinada, hialina a pigmentada, de color oliváceo a marrón oscuro (Bensch *et al.*, 2010).

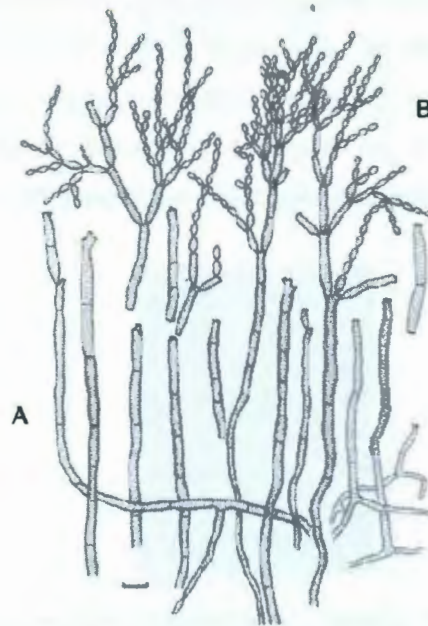


Figura 7. A) Macro y microconidióforos, B) ramoconidio y cadenas de conidios. Escala 10 μm .

Esta especie está ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales, generalmente como saprófitos (raramente como patógenos) en sustratos herbáceos y leñosos, en el suelo, etc. (Mckemy y Margon-Jones, 1991). Varias investigaciones han reportado que *Cladosporium* spp., tienen bioactividad al degradar compuestos policíclicos aromáticos hidrocarbonados y/o actividad antifúngica (Qi *et al.*, 2009).

1.1.4.1.3 *Corynespora cassiicola*

Es una especie saprófita/patógena facultativa, fue descrita en el apartado 1.1.3.2.1

De esta especie se han aislado compuestos, tales como corynesidonas A, B y coryneter, con actividad antioxidante y/o citotóxica (Chomcheon *et al.*, 2009); compuestos tipo éster como altersolanol (Cuadro 6).

1.1.4.1.4 *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*).

La especie *C. rosea* frecuentemente posee conidióforos dimórficos, lo que significa que dos tipos se producen en la misma cepa; algunas veces se forman conjuntos en la misma hifa. Para los dos tipos de conidióforos, los términos “primarios” y “secundarios” son adoptados. Los primarios son de forma verticilada, carecen de ramificaciones o son cortas, con fiálides divergentes en ángulos agudos. Estos están en verticilios de 2-5, solitarios, rectos, disminuyendo ligeramente hacia la punta; cada uno de ellos produce una pequeña gota de conidios hialinos (Schroers *et al.*, 1999; Shroers *et al.*, 2001).

Los conidióforos secundarios se encuentran en forma penicilada y generalmente aparecen a los pocos días de edad, con colonias solitarias o poco agregadas, principalmente con hifas; tabicados, aéreos, bi a cuaterverticílido; a menudo ramificados y con fiálides convergentes (Figura 8). Los conidios están organizados imbricadamente, adheridos a lo largo; las columnas poseen conidios color blanco, blanco amarillento o naranja claro. Con el tiempo, las columnas se colapsan formando una masa mucosa en forma de esfera, encima de varios conidióforos secundarios. Los conidios son hialinos, lisos, ligeramente curvados (de eje heteropolar, bilaterales) y, en general, redondos distalmente. Los conidios de ambos tipos de conidióforos difieren ligeramente, siendo más grandes y menos curvos los primarios.

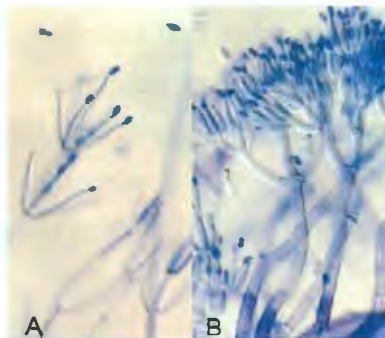


Figura 8. A) Conidióforos de forma verticilada y B) Conidióforos de forma penicilada.

C. rosea es una especie micoparásita, destructiva y necrotrófica de hifas, esporas, esclerocios y otros cuerpos fructíferos de varios hongos. Esta ha sido evaluada y usada como agente de control biológico contra varios ascomicetos, hifomicetos del suelo, y contra *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*, particularmente (Vicini *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2006).

1.1.4.1.5 *Cylindrium* sp.

El género *Cylindrium* se caracteriza por presentar cespítulos tenues, planos, subpulveráceos, hialinos o vivamente coloreados; conidióforos apenas distintos de los conidios, con más frecuencia cortísimos. Con conidios catenulados, alargados, cilíndricos, típicamente con los extremos redondeados, continuos, hialinos o vivamente coloreados.

1.1.4.1.6 *Cylindrocarpon* sp.

El género *Cylindrocarpon* contiene aproximadamente 125 especies descritas que se encuentran comúnmente en el suelo o en plantas muertas; en algunos casos son fitopatógenos de plantas que atacan principalmente las raíces y tallos (Schroers *et al.*, 2008; Brayford, 1993).

Morfológicamente este género se caracteriza por presentar fiálidas largas, con conidios hialinos que se originan en forma basípeta sin llegar a formar cadenas. Los macroconidios pueden ser rectos o ligeramente curvados, cilíndricos a fusoides, con los extremos redondeados y con 1 a 10 septos. Los microconidios pueden ser rectos o ligeramente curvados, con los extremos que se originan en el micelio pero también pueden producirse en los macroconidios. Los microconidios son hialinos a marrones, globosos y pueden estar aislados, en cadenas o agrupados y de forma intercalar o terminal (Figura 9). Asimismo, los aislados presentan una gran variabilidad morfológica; las colonias pueden ser blancas, crema, naranjas, marrones o púrpuras. El micelio puede ser ralo u algodonoso y puede o no formar esporodoquios (Samuels y Brayford, 1990).

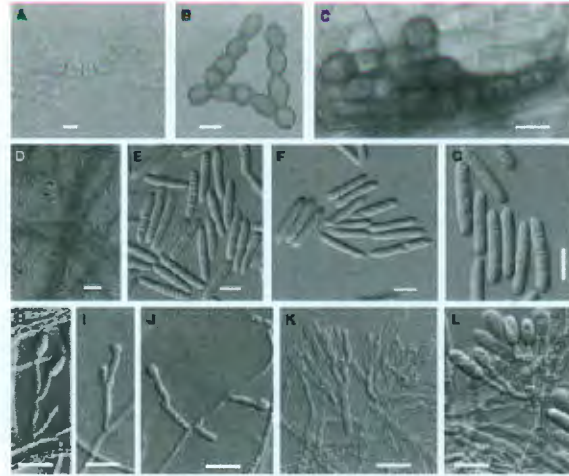


Figura 9. *C. pauciseptatum*. (A–C) Clamidosporas. (D) Micelio aéreo. (E–G) Macroconidio. (H–J) Conidióforo del micelio aéreo formando macroconidios. (K–L) Conidióforos verticilados, esporodocio formando macroconidios.

1.1.4.1.7 *Fusarium* sp.

El género *Fusarium* es cosmopolita, saprófito facultativo que abarca todo tipo de climas, desde zonas desérticas hasta tropicales y árticas; prospera en cualquier tipo de sustrato orgánico y se ha aislado principalmente del suelo (Altamore *et al.*, 2004); se han descrito aproximadamente 70 especies, muchas de ellas como patógenos de plantas (Desjardins *et al.*, 2006).

Las colonias se caracterizan por presentar tonalidades blanquecinas, rosadas, amarillentas y salmón. Producen esporas septadas fusiformes (macroconidios) originadas en fiálides solitarias o en racimos, las cuales surgen de conidióforos que pueden estar agrupados en estructuras denominadas esporodocios o bien en conidióforos solitarios. Muchas de las especies de *Fusarium* tienen conidios más pequeños (microconidios), los cuales se producen a partir de células conidiógenas mono o polifiliales. Otra característica distintiva en el género es la formación de clamidosporas, que pueden ser intercalares o terminales (Figura 10) (Seifert y Gams, 2001).

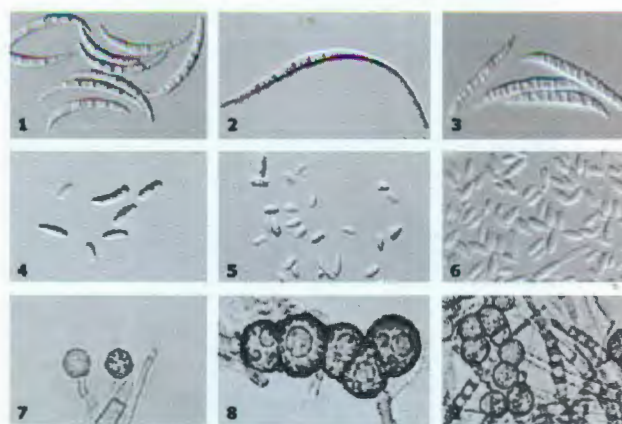


Figura 10. Macroconidios de *F. acuminatum* (1), *F. equiseti* (2) y *F. graminearum* (3). Microconidios de *F. fujikuroi* (4), *F. proliferatum* (5) y *F. verticillioides* (6). Clamidosporas de *F. oxysporum* (7), *F. equiseti* (8) y *F. solani* (9). Adaptado de Nelson *et al.* (1994).

Un gran número de especies de este género ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de producir una enorme cantidad de metabolitos secundarios bioactivos con gran diversidad estructural y variadas propiedades biológicas (Cuadro 6) (Bräse, 2009).

1.1.4.1.7.1 *Fusarium incarnatum*

La especie *F. incarnatum* presenta conidióforos dispersos distribuidos a lo largo del micelio aéreo, ramificados; en la parte apical se originan las células conidiógenas filídicas (células donde se forman los conidios), que son delgadas, cilíndricas, de 19-24 μm en la parte más ancha. Produce dos tipos de conidios, los macroconidios y los microconidios; los primeros son fusiformes, casi rectos, ligeramente encorvados, con los extremos en punta, con 3-5 septos, variables en tamaño, de 17-40 μm de largo, por 2.5-4.5 μm en la parte más ancha. Microconidios abundantes, de piriformes a ovalados, con un septo, de 10-12 μm de largo, por 2.5-3.5 μm en la parte más ancha. Clamidosporas globosas, intercalares, en cadenas o solitarias, entre 5-10 μm de diámetro (Figura 11) (Booth, 1971).



Figura 11. A, B) Conidióporos; C-F) Células cinidógenas poliblasticas; H, I) Macro, micro y blastoconidio y G) Clamidosporas.

1.1.4.1.8 *Perelegamyces parviechinnulatus*

La especie *P. parviechinnulatus* se caracteriza por presentar conidióforos rectos, cilíndricos, lisos, pared delgada, septados, pardo oscuro, ramificados en la parte apical, hasta de $176 \times 4-5 \mu\text{m}$; células conidiógenas poliblasticas, lageniformes, lisas, con denticulos apicales truncados, de $3-6 \times 2-3 \mu\text{m}$; conidios ovoides con la base aplanada, ligeramente equinulados, pardo pálido, $2-4 \times 2-2.5 \mu\text{m}$ (Figura 12) (Heredia *et al.*, 2006)



Figura 12. Conidióforo con cabezuela fértil.

1.1.4.1.9 *Phialophora verrucosa*

Phialophora es un género cosmopolita que se encuentra comúnmente en el suelo y madera en descomposición (Goins *et al.*, 2002).

Las colonias son de crecimiento lento, inicialmente en forma de cúpula, volviéndose más tarde planas, de color oliváceo y negro; las fiálides tienen forma de botella o elíptica. Los conidios elipsoides, de paredes lisas, hialinas, miden 3-5 \times 1.5-3 μm (Figura 13) (Untereiner, 1999).



Figura 13. A) Fiálides y B) Conidios en masa

1.1.4.1.10 *Verticillium* sp.

Verticillium corresponde a un género cosmopolita, incluye varias especies que pueden ser patógenos de artrópodos, plantas y otros hongos. Presenta conidióforos hialinos, simples o ramificados. La ramificación de los conidióforos aparece como un verticilo (estructura con forma de rueda con un eje central). De los conidióforos surgen las fiálides, que en este caso son muy largas y también están dispuestas en forma de verticilo alrededor del mismo. Los conidios son unicelulares, ovalados o piriformes. Pueden ser solitarios o formar racimos en las puntas de los ápices (Figura 14).

De este género se han aislado algunos compuestos con actividad insecticida (Cuadro 6) (Klosterman *et al.*, 2009).

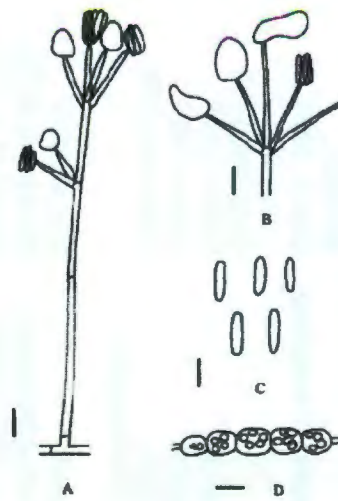


Figura 14. *V. hahajimaense*, A) Conidióforo con fiálides verticiladas, B) Parte apical del conidióforo, C) Conidios y D) Clamidosporas en cadenas. Escala: 10 μm (A, B y D), 5 μm (C).

Cuadro 6. Metabolitos con actividad biológica reportados para los géneros y/o especies fúngicas en estudio.

Especie	Metabolito	Actividad	Modelo	Referencia
<i>C. cladosporioides</i>	Acido sumiki, ácido acetil sumiki	Antibacteriana	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Jadulco <i>et al.</i> , 2001
	Brefeldin A	Antifúngica	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
	Cladospórido A, B	Fitotóxica	Semillas de lechuga	Sakagami <i>et al.</i> , 1995
	Cladosporol	Antifúngica	<i>Phytophthora capsici</i>	Sakagami <i>et al.</i> , 1995
	Cladospórido C			
	Cladospórido D	Antifúngica	<i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Mucor racemosus</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2001
	Ciclodepsipéptido (IB-01212)	Leishmanicida	<i>Leishmania donovani</i> , <i>L. pifanoi</i>	Luque-Ortega <i>et al.</i> , 2010
<i>C. rosea</i>	Gliocladina A, B, C, D y E	Nematicida	<i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Panagrellus redivivus</i>	Li <i>et al.</i> , 2007
	Gliocladina A, B	Antibacteriana	<i>S. aureus</i>	Guo <i>et al.</i> , 2007
	Verticillina A	Nematicida	<i>C. elegans</i> , <i>P. redivivus</i>	Li <i>et al.</i> , 2007
	11-deoxiverticillina A	Nematicida	<i>C. elegans</i> , <i>P. redivivus</i>	Li <i>et al.</i> , 2007
	4-cetoclonostachydiol	Antibacteriana Antifúngica	<i>B. subtilis</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Cladosporium resinae</i>	Lang <i>et al.</i> , 2006
<i>Cylindrocarpon</i>	Ciclosporina A	Nematicida	<i>Meloidogyne incognita</i>	Li <i>et al.</i> , 2007
	Pirrocidinas	Antifúngica	<i>C. albicans</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Nigrosporum oryzae</i> , <i>Stenocarpella maydis</i> y <i>Rhizotocnia zea</i>	Poling <i>et al.</i> , 2008; Bigelis, <i>et al.</i> , 2006
<i>Fusarium</i>	Eniatina A	Nematicida Antifúngica	<i>M. incognita</i> <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> y <i>M. intracellulare</i>	Li <i>et al.</i> , 2007; Jayasinghe <i>et al.</i> , 2006
	Eniatina B	Nematicida	<i>M. incognita</i> , <i>Anguillula aceti</i>	Li <i>et al.</i> , 2007
		Antibacteriana	<i>S. aureus</i> Enterococci resistente	Jiang <i>et al.</i> , 2002
	4,15-Diacetilnivalenol	Nematicida	<i>M. incognita</i>	Li <i>et al.</i> , 2007
	Diacetoxiscirpenol	Nematicida	<i>M. incognita</i>	Li <i>et al.</i> , 2007

Continuación del Cuadro 6.

Especie	Metabolito	Actividad	Modelo	Referencia
<i>F. incarnatum</i>	Deoxipirona, Fusapirona	Antifúngica	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Ascochyta rabiei</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Altamore <i>et al.</i> , 2004; Altamore <i>et al.</i> , 2000
	Eniatina B ₁	Antifúngica	<i>Botrytis cinerea</i>	Pohanka <i>et al.</i> , 2004
	Equisetin Oxysporidinona	Antibacteriana Antifúngica	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Venturia inequalis</i>	Desjardins, 2007 Breinholt, 1997
<i>Phialophora</i>	Gregatin A	Antibacteriana Antifúngica	<i>B. subtilis</i> <i>B. cinerea</i>	Lynn <i>et al.</i> , 1999
<i>Verticillium</i>	Acido dipicolínico	Insecticida	<i>Calliphora erythrocephala</i>	Angawi <i>et al.</i> , 2003
	Acido lowdénico	Antifúngica	<i>A. flavus</i>	Angawi <i>et al.</i> , 2003
	Bassianólida	Antibacteriana	<i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i>	
	Fomalactona	Insecticida	<i>C. erythrocephala</i>	Angawi <i>et al.</i> , 2003
	Peróxido de ergosterol	Nematicida	<i>M. incognita</i>	Khambay <i>et al.</i> , 2000
Vertilecanina A		Antifúngica	<i>Septoria</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.	You <i>et al.</i> , 2009
		Antibacteriana	<i>B. subtilis</i>	Soman <i>et al.</i> , 2001
		Insecticida	<i>Helicoverpa zea</i>	

1.2 OBJETIVOS

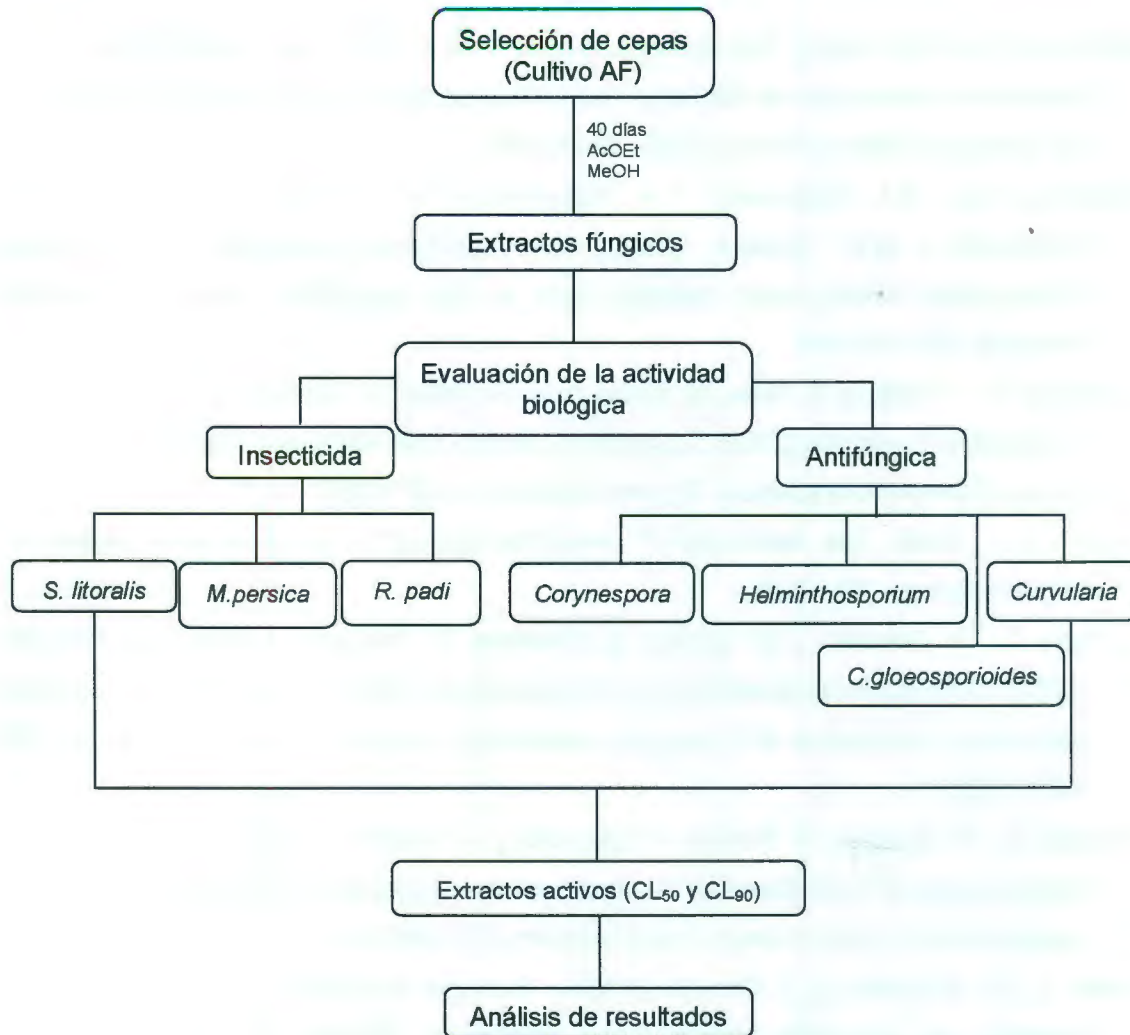
1.2.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de dieciséis hongos anamórficos tropicales en bioensayos de tres especies de insectos plaga y cuatro especies de hongos de importancia agrícola.

1.2.2 Objetivos particulares

1. Evaluar *in vitro* la actividad de los extractos obtenidos de las cepas fúngicas seleccionadas en tres insectos plaga.
2. Monitorear la acción antifúngica en microplaca de los extractos fúngicos seleccionados contra *Colletotrichum gloeosporioides*.
3. Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los extractos fúngicos selectos contra *Corynespora cassicola* (ITC-03), *Curvaluria* sp. (ITC-01) y *Helminthosporium* sp. (ITC-04).

1.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



1.4 REFERENCIAS

- Abdel-Lateff, A., G.M. König, K.M. Fisco, U. Höller, P.G. Jones y A.D. Wright (2002). New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products*, 65, 1605-1611.
- Afiyatullo, S.S., A.I. Kalinovskiy, T.A. Kuznetsova, V.V. Isakov, M.V. Pivkin, P.S. Dmitrenok y G.B. Elyakov (2002). New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. *Journal of Natural Products*, 65, 641-644.
- Agatsuma, T., T. Akama, S. Nara, S. Matsumiya, R. Nakai, H. Ogawa, S. Otaki, S. Ikeda, Y. Saitoh y Y. Kanda (2002). UCS1025A and B, new antitumor antibiotics from the fungus *Acremonium* species. *Organic Letters*, 4, 4387-4390.
- Alarcon, J.L. (1988). The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 37-56.
- Altomare, C., G. Perrone, C.M. Zonno, A. Evidente, R. Pengue, F. Fanti y L. Polonelli (2000). Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. *Journal of Natural Products*, 63, 1131-1135.
- Altomare, C., R. Pengue, M. Favilla, A. Evidente y A. Visconti (2004). Structure-activity relationships of derivatives of fusapyrone, an antifungal metabolite of *Fusarium semitectum*. *Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2997-3001.
- Amate, J., P. Barranco y T. Cabello (2000). Biología en condiciones controladas de especies de noctuidos plagas (Lep.: Noctuidae). *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 26, 191-196.
- Andrade, E.M.; C.H. Uesugi, B. Ueno y M. Ferreira (2007). Caracterização morfo-cultural e molecular de aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 32, 21-31.
- Angawi Rihab, F., C. Swenson Dale, J. B. Gloer y D.T. Wicklow (2003) Lowdenic acid: a new antifungal polyketide-derived metabolite from a new fungicolous *Verticillium* sp. *Journal of Natural Products*, 66, 1259-1262.
- Araya R.L., R.E. Caraz y V.M. Cartín (2005). Diagnóstico del uso de insecticidas utilizados contra *Bemisia tabaci* (Gennadius) en tomate y chile en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 75, 68-76.

- Aydin, H. y M. Oktay Gürkan (2006). The efficacy of spinosad on different strains of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). Turkish Journal of Biology, 30, 5-9.
- Bailey, J.A.; R.J. O'Connell, R.J. Pring y C. Nash (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, A.J.; Jeger, J.M. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Oxford: British Society for Plant Pathology, 88-120.
- Bensch, K., J.Z. Groenewald, J. Dijksterhuis, M. Starink-Willemse, B. Andersen, B.A. Summerell, H-D. Shin, F.M. Dugan, H-J. Schroers, U. Braun y P.W. Crous (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae, Capnodiales*). Studies in Mycology, 67, 1-94. 2010.
- Bigelis, R., H. He, Y. Yang Hui, L-P. Chang y M. Greenstein (2006). Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 815-826.
- Blackman R.L. y V.F. Eastop, 2000. Aphids on the World's Crops: An identification and information guide. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Boom k. S., Y. Choi, I.B. Chung, V.F. Eastop, J.A. Pickett, I.J. Wadhams y C.M. Woodcock (2000). Sex pheromone of the peach aphid, *Tuberocephalus momonis*, and optimal blends for trapping males and females in the field. Journal of Chemical Ecology, 26, 601-609.
- Booth, C. (1971). The fungus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, United Kingdom.
- Bräse, S., A. Encinas, J. Keck y C.F. Nising (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. Chemical Reviews. 109, 3903-3990.
- Breinholt J., S. Ludvigsen, B.R. Rassing y C.N. Rosendahl (1997.) Oxysporidinone: A novel, antifungal *N*-methyl-4-hydroxy-2-pyridone from *Fusarium oxysporum*. Journal of Natural Products, 60, 33-35.
- Carrillo-Rayas, M.T. y A. Blanco-Labra. (2009). Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. Acta Universitaria, 19, 2 40-49.
- Chomcheon, P., S. Wiyakrutta, N. Sriubolmas, N. Ngamrojanavanich, S. Kengtong, C. Mahidol, S.Ruchirawat y P. Kittakoop (2009). Aromatase inhibitory, radical

- scavenging and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassicola* L36. *Phytochemistry*, 70, 407-413
- Delfino, M.A. Monelos, H.L.; Peri, P.L. Buffa, L.M. (2007) Áfidos (Hemiptera, Aphididae) de interés económico en la Provincia de Santa Cruz. *RIA INTA, Argentina*, 36, 147-154.
- De la Rosa-García, S. (2007). Evaluación del potencial microbiano de microorganismos aislados de cenotes de la Península de Yucatán. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 144-147.
- Del Rincon, M.C., J. Mendez y J. Ibarra (2006). Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*, 45, 157-164.
- Desjardins, A.E., R.H. Proctor, G. Bai, S.P. McCormick, G. Shaner, G. Buechley y T.M. Hohn (1996). Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 775-781.
- Desjardins, A.E. (2006). *Fusarium mycotoxins chemistry, Genetics and Biology*. St. Paul, MN: APS Press.
- Desjardins A.E. y R.H. Proctor (2007) Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 47-50.
- García Herrera, A. (2007). Plaguicidas. *Ciencia y Trabajo*, 26, 147-151.
- Goins, T.Q., W.A. Edens y J.M. Henson (2002). Heavily-melanized variants of the sexual *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* are non-pathogenic and indistinguishable from the asexual, *Phialophora* state. *Mycological Research*, 106, 1179-1186.
- Guo H., H. Hu, S. Liu, X. Liu, Y. Zhou y Y. Che (2007). Bioactive *p*-terphenyl derivatives from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Gliocladium* sp. *Journal of Natural Products*, 70, 1519-1521.
- Heredia, G. R. Castañeda Ruíz, C.I. Becerra Hernández y R.M. Arias Mota (2006). Contribución al conocimiento de los hongos anamorfos saprobios del estado de Tabasco. *Revista Mexicana de Micología*, 23, 53-62.

- Herrera, T. y M. Ulloa (1990). El reino de los Hongos. *Micología Básica Aplicada*. Fondo de Cultura Económica. pp. 37-43
- Hoda M.N., E.I. Badawy Mohamed y I.R. Entsar (2010). Toxicity and biochemical study of two insect growth regulators, buprofezin and pyriproxyfen, on cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98, 198-205.
- Hollingsworth, C.S. y C.A. Gatsonis. (1990). Sequential sampling plants for green peach aphid (homoptera: aphididae) on potato. *Journal of Economic Entomology*, 83, 1365-1369.
- Jadulco, R., P. Proksch, V. Wray, Sudarsono, A. Berg y U. Gräfe (2001). New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus *Cladosporium herbarum*. *Journal of Natural Products*, 64, 527- 530.
- Jayasinghe L., H.K. Abbas, M.R. Jacob, H.M. Herath Wimal y N.P. Dhammika Nanayakkara (2006). *N*-Methyl-4-hydroxy-2-pyridinone analogues from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products*, 69, 439-442.
- Jianga, Z., M.O. Barreta, K.G. Boyda, D.R. Adamsb, S.F. Boydb y J.G. Alan Burgessa (2002). JM47, a cyclic tetrapeptide HC-toxin analogue from a marine *Fusarium* species. *Phytochemistry*, 60, 33-38.
- Jiménez-Martínez, E.S., N.A. Bosque Pérez, H. Berger Philip, R.S. Zemetra, D.Hongjian y D. Eigenbrode Sanford (2004). Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (homoptera: aphididae) to barley yellow dwarf virus-infected transgenic and untransformed wheat. *Environmental Entomology*, 33, 1207-1216
- Jin-Hyeuk, K., K. Soo-Woong, K. Jeong-Soo y P. Chang-Seuk (2001). First report of *Corynespora* leaf spot in pepper caused by *Corynespora cassicola* in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 17,180-183.
- Khambay Bhupinder P.S, J.M. Bourne, S. Cameron, R. Kerry Brian y M. Javed Zaki (2000). Communication to the Editor: A nematocidal metabolite from *Verticillium chlamydosporium*. *Pest Management Science*, 56, 1098-1099.
- Klosterman S.J., Z.K. Atallah, G.E. Vallad y K.V. Subbarao (2009). Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 39-62.
- Kithsiri Wijeratne, E.M., B.P. Bashyal, M.K. Gunatilaka, A.E. Arnold y A.A.L. Gunatilaka (2010). Maximizing chemical diversity of fungal metabolites: Biogenetically related

- heptaketides of the endolichenic fungus *Corynespora* sp. *Journal of Natural Products*, 73, 1156–1159.
- Kumar, V.; V.P. Gupta, A.M. Babu, R.K. Mishra, V. Thiagarajan y R.K. Datta (2001). Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. *J. Phytopathology*, 149,629-633.
- Lang G., M. I. Mitova y G. Ellis (2006), Bioactivity profiling using HPLC/microtiter-plate analysis: Application to a New Zealand marine alga-derived fungus, *Gliocladium* sp. *Journal of Natural Products*, 69, 621-624.
- Li, J. J. Yang, X. Huang, K.-Q. Zhang (2006). Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry*, 41, 925–929.
- Li, G., K. Zhang, J. Xu, J. Dong y Y. Liu (2007). Nematicidal substances from fungi. *Recent Patents on Biotechnology*. 1, 1-19.
- Luque-Ortega J.R., L.J. Cruz, F. Albericio y L. Rivas (2010). The antitumoral depsipeptide IB-01212 kills *Leishmania* through an apoptosis-like process involving intracellular targets. *Molecular Pharmaceutics*, 7, 1608-1617.
- Lynn E., H. Gardnerb, D. Weislederb y M. Leibc (1999). Production and toxicity of 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-methyl-4H-1-benzopyran-4-one by *Phialophora gregata*. *Phytochemistry*, 49, 226-239.
- Margaritopoulos, J.T., K. Tsamandani, O.M. Kanavaki, N.I. Katis y J.A. Tsitsipis (2010). Efficacy of pymetrozine against *Myzus persicae* and in reducing potato virus Y transmission on tobacco plants. *Journal of Applied Entomology*, 134, 323-332.
- Mckemy, J.M y G. Morgan-Jones (1991). Studies in the genus *Cladosporium sensu lato*. IV Concerning *Cladosporium oxysporum*, a plurivorous, predominantly saprophytic species in warm climates. *Mycotaxon*, 41, 397-405.
- Navarrete Mapen, R.Z. (2010). Efectividad *in vitro* de extractos acuosos y etanólicos de *Bonellia flammea* contra diez hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura Tropical. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, p. 1-15.
- Nelson, P.E., M.C. Dignani y E.J. Anaissie (1994). Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 479-504.

- Ninkovic, V., E. Ahmed, R. Glinwood y J. Pettersson (2003). Effects of two types of semiochemical on population development of the bird cherry oat aphid *Rhopalosiphum padi* in barley crop. *Agricultural and Forest Entomology*, 5, 27-33.
- Qi, S-H., X. Ying, H-R. Xiong, P-Y. Qian y S. Zhang (2009). Antifouling and antibacterial compounds from a marine fungus *Cladosporium* sp. F1. *World Journal of Microbiology y Biotechnology*, 25, 399-406.
- Pedras, S.M.C., L.I. Zaharia y D.E. Ward (2002). The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59, 579-596.
- Peruzzo, R., J.R. Salvadori, R. Valle da Silva Pereira, É.E. Bertollo y L. Simionatto Tonello (2007). Resposta de cultivares de trigo à infestação do pulgão *Rhopalosiphum padi*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 1681-1685.
- Pohanka A., K. Capieau, A. Broberg, J. Stenlid, E. Stenström y L. Kenne (2004). Enniatins of *Fusarium* sp. strain F31 and their inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination. *Journal of Natural Products*, 67, 851-857.
- Poling Stephen M., D.T. Wicklow, D. Rogers Kristina y J.B. Gloer (2008). *Acremonium zeae*, a protective endophyte of maize, produces dihydroresorcylic acid and 7-hydroxydihydroresorcylic acids. *Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3006-3009.
- Reyes-Estebanez, M.M. J (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México. 171 p.
- Sakagami, Y., A. Sano, O.Hara, T. Mikawa y S. Marumo (1995). Cladosporol, α -1,3-glucan biosynthesis inhibitor, isolated from fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Tetrahedron Letters*, 36, 1469-1472.
- Samuels, G.J. y D. Brayford (1990). Variation in *Nectria radicola* and its anamorph, *Cylindrocarpon destructans*. *Mycological Research*, 94, 433-442.
- Schroers, H-J. (2001). A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology*, 46, 1-214.
- Schroers, H-J., G.J. Samuels, K.A. Seifert y W. Gams (1999). Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C.rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other gliocladium-like fungi. *Mycologia*, 91, 365-385.

- Schroers, H.-J., M. Zerjava, A. Munda, F. Halleen, P.W. Crous (2008). *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycological Research*, 112, 82-92
- Seifert, A.K. y W. Gams (2001). The taxonomy of anamorphic fungi. In: McGlaughlin, D.J., McGlaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Volume Editors). *The Mycota VII: Systemics and Evolution. Part A*. Springer Editorial.
- Sisterna, M.N.; G.A. Lori y J.J. Marassi (1994). Sintomatología y hongos asociados al manchado del grano de arroz en el genotipo Irga 409. *Revista de la Facultad de Agronomía de Argentina*, 70, 13-21.
- Soman, A.G, J.B. Gloer, C.R. Angawi, D.T. Wicklow y D.F. Dowd (2001). Vertilecanin: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, 64, 189-192.
- Torres, C., N.D. Correa y J.E. Díaz (2008). Caracterización de microorganismos fúngicos en semillas de araza (*Eugenia stipitata*). Orinoqui Universidad de los Llanos Colombia, 12, 31-44.
- Untereiner, W.A., y F.A. Naveau (1999). Molecular systematics of the Herpotrichiellaceae with an assessment of the phylogenetic positions of *Exophiala dermatitidis* and *Phialophora americana*. *Mycologia*, 91, 67-83.
- Vázquez-Luna, A., L. Pérez-Flores y R. Díaz-Sobac (2007). Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 306-313.
- Vicini, G., T. Romano Martinelli, R.C. Raimundo Cognialli, R.O. de Faria, E.R. Carbonero, G. Lanzi Sasaki, D.A. Mitchell (2009). Exopolysaccharide from surface-liquid culture of *Clonostachys rosea* originates from autolysis of the biomass. *Archives of Microbiology*, 191, 369–378.
- Villanueva, C. E., M. A. Sánchez Briceño, J. C. Alejo, E. Ruíz Sánchez y J. M. Tún Suárez (2005). Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizon foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) Kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 49-56.
- Wang F.W., R.H. Jiao, A.B. Cheng, S.H. Tan y Y.C. Song (2007). Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 79–83.

- You, F., T. Han, J-Z. Wu, B-K Huang y L. Qin (2009). Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 162-165.
- Zhang H., H., N. Tabata , H. Miura , M. Namikoshi , Y. Yamaguchi , R. Masuma y S. Omura (2001). Cladospolide D, a new 12-membered macrolide antibiotic produced by *Cladosporium* sp. FT-0012. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 54, 635-641.

CAPÍTULO II

CONSERVACIÓN, CULTIVO DE CEPAS FÚNGICAS Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ORGANICOS

2.1 INTRODUCCIÓN

Las colecciones de cultivos microbianos adquieren cada vez mayor importancia como mecanismos o vías para la conservación *ex situ* de la biodiversidad. Estas representan un importante elemento estratégico y económico para el desarrollo de las investigaciones científicas, con particularidad en las ramas biotecnológicas y biomédicas (Pinzon *et al.*, 2009).

La conservación adecuada de los cultivos de hongos *ex situ* debe regirse por ciertas normas o principios básicos: a) todos los cultivos deben conservarse *vivos*; b) deben mantenerse en estado de pureza; c) cada cepa debe mantenerse fiel a su tipo; d) cada cepa debe conservarse al menos en dos métodos (uno de ellos debe ser la liofilización) (Nakasone *et al.*, 2004).

La gran diversidad genética en el reino de los hongos ha motivado una justificada preocupación por su conservación. Desde hace varios años se considera que el número de microorganismos formalmente nombrados y aceptados es de unas 150,000 especies (cifra bastante conservadora según algunos investigadores). Entre éstas, los hongos comprenden alrededor de la mitad. Estas cifras crecen constantemente: unas 1,700 especies de hongos se describen anualmente. Otros autores estiman que existen cerca de 1,500,000 especies de hongos, de las cuales sólo se ha descrito 5% y se encuentra depositado en colecciones sólo 0.8% del total estimado (Hawksworth, 2001).

En el Centro Mundial de Datos de Microorganismos (WDCM, por sus siglas en inglés) existe información de más de un millón de cepas de microorganismos conservados en 471 colecciones distribuidas, de manera muy desigual, en los cinco continentes; de este total, 44% son hongos, lo que permite inferir acerca de la importancia de este grupo dentro del mundo microbiano (Smith, 2003).

Los hongos pueden cultivarse en superficies sobre medios agarizados, proceso que se denomina fermentación en sustrato sólido (FSS). Alternativamente, se los puede cultivar en medios líquidos (cultivos sumergidos), donde el micelio se encuentra completamente disperso en el medio acuoso. La FSS es el cultivo que probablemente mejor refleja las condiciones ambientales que estos hongos encuentran en el suelo. Esta técnica se puede realizar empleando sustratos naturales con alta capacidad de absorber agua, como granos (arroz, cebada), residuos agroindustriales (salvado) o bien utilizando un soporte poroso inerte impregnado con medio nutritivo (Aguilar *et al.*, 2008).

La fermentación en sustrato sólido (FSS) se ha usado exitosamente para la producción de enzimas y metabolitos secundarios (antibióticos, alcaloides, micotoxinas u hormonas de crecimiento) (Hölker *et al.*, 2004). Estos productos están asociados con la fase estacionaria de crecimiento microbiano y son producidos a escala industrial para su uso en agricultura y en el tratamiento de enfermedades. Muchos de esos metabolitos secundarios son producidos aún en fermentaciones líquidas sumergidas (FLS). Aunque a través de su producción, este método ha demostrado ser menos efectivo que la FSS, ya que a gran escala se incrementan los costos y la demanda energética. La FSS ha mostrado que produce un producto más estable, requiere menor energía, en fermentadores más pequeños que facilitan el proceso de separación de los productos (Robinson *et al.*, 2001).

En FSS, la producción de los metabolitos está relacionada con la reducción de agua y nutrientes, con frecuencia dependen de la asociación del micelio y del sustrato sólido o de un soporte. En general, los hongos necesitan de un sustrato sólido del cual anclarse para tener un crecimiento óptimo y una buena productividad (Singh *et al.*, 2010; Hölker *et al.*, 2004).

Entre los métodos de extracción con disolvente más utilizados esta la maceración. Este método es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretenden separar. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima

empleada, así como del líquido de extracción. Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura: caliente y frío. La maceración en frío consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de disolvente para cubrir totalmente el material a extraer. Esto se lleva a cabo por un lapso de tiempo largo, dependiendo de la materia prima que se vaya a macerar. Las ventajas de la maceración en frío consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del disolvente), prácticamente en su totalidad sin alterarla por efectos de temperatura. Por otra parte, en la maceración en caliente, el tiempo de maceración varía mucho, ya que es menor el tiempo que se requiere debido a que el calor acelera la extracción. La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente la esencia del producto, ya que regularmente destruye algunas propiedades, es decir puede haber compuestos termolábiles.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Medios de cultivo

Para el crecimiento y mantenimiento de las cepas fúngicas utilizadas en este estudio, se emplearon como medios de cultivos sustratos sólidos, tanto sintéticos como naturales. A continuación se enumeran los medios de cultivos empleados, así como el proceso de su elaboración.

a) Agar papa-dextrosa (PDA)

El medio comercial PDA (39 g, DIBICO^{MR}) se disolvió en un litro de agua destilada y se mantuvo en ebullición durante un minuto.

b) Agar extracto de malta (MEA)

A una mezcla de extracto de malta (20 g, Bioxon^{MR}) y agar-agar (20 g, DIBICO^{MR}) se agregó un litro de agua destilada y se calentó a ebullición durante un minuto.

c) Agar de soya y tripticaseína (TSA)

El medio de cultivo deshidratado (30 g, DIBICO^{MR}) se disolvió en un litro de agua destilada y se mantuvo a ebullición durante un minuto.

d) Agar- maíz (MAM)

Los granos de maíz (200 g, La Huerta) en un litro de agua destilada se calentaron a ebullición durante un minuto, pasado este tiempo se filtró y al filtrado se le agregó agar-agar (15 g, DIBICO^{MR}). La mezcla se aforó a un litro con agua destilada y se calentó a ebullición durante un minuto.

Todos los medios preparados se llevaron a esterilizar a la autoclave a una temperatura de 121 °C, 15 lb in⁻¹ de presión por 15 minutos. Antes de que se enfríe se vacía en cajas Petri y ya solidificados se dejan a prueba de esterilidad por 24 horas.

2.2.2 Reactivación y conservación de cepas

Las cepas fúngicas se reactivaron en medio PDA (Cuadro 7) y posteriormente se conservaron por cuatuplicado en tres diferentes métodos de conservación. El primer método consiste en transferir un trozo de agar con el hongo a tubos Falcon (50 mL) con medio PDA inclinado, los cuales se incubaron a 25 °C hasta cubrir la superficie del agar, posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 4 °C. Un segundo método de conservación consistió en depositar de tres a cuatro trozos de agar con crecimiento fúngico en crioviales con 2 mL de agua destilada estéril, los cuales se conservaron a temperatura ambiente en oscuridad. En un segundo vial se depositaron de tres a cuatro trocitos de agar con crecimiento fúngico conteniendo agua-glicerol al 25%, el cual se conservó en ultracongelación a -80 °C (Smith & Onions, 1994).

Cuadro 7. Estado de las cepas en estudio.

Nombre de la cepa	Clave	Origen
<i>Acremonium</i> sp.	XHH4A	Hojarasca sumergida
<i>Beltraniella portoricensis</i>	MRH42	Hojarasca
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	XHH1E	Hojarasca sumergida
<i>Clonostachys rosea</i>	TZH27	Hojarasca sumergida
<i>Corynespora cassiicola</i>	MRH1	Hojarasca
<i>Cylindrium elongatum</i>	MRH45	Hojarasca
<i>Cylindrocarpon congoense</i>	XHH8A	Hojarasca sumergida
<i>Fusarium</i> sp.	TZA54	Agua
<i>Fusarium incarnatum</i>	TZH23	Hojarasca sumergida
<i>Gliomastix murorum</i>	MRH36	Hojarasca
<i>Perelegomyces parviechinulatus</i>	GHH25	Hojarasca
<i>Phaeobotrys</i> sp.	GHH14	Hojarasca
<i>Phialophora verrucosa</i>	MRH54	Hojarasca
<i>Sibirina</i> sp.	MRH52	Tronco
<i>Verticillium</i> sp.	TZH28	Hojarasca sumergida
<i>Volutella</i> sp.	TZH22	Hojarasca sumergida

2.2.3 Microcultivos

Se utilizaron cajas de Petri de vidrio y en su interior se colocaron tubos acodados de vidrio y sobre estos un portaobjetos; posteriormente, se colocaron dos cuadros de medio agar-maíz (5 × 10 × 10 mm), los cuales se inocularon en los costados con las cepas, sobre cada segmento de agar-maíz se colocó un cubreobjetos, luego se adicionó agua destilada estéril para evitar la deshidratación del medio durante el período de incubación; el cultivo se mantuvo a 25 °C. Cada tercer día se retiró el cubreobjetos y la producción de esporas se observó al microscopio (Barnett y Hunter, 1972; Carmichel *et al.*, 1980)

2.2.4 Cultivo de las cepas fúngicas en medio sólido (AF)

2.2.4.1 Suspensión de esporas y/o micelio

Las cepas fúngicas se cultivaron en cajas de Petri (100 × 60 mm) con PDA, durante 15-20 días a 25 ± 2 °C, bajo condiciones de fotoperíodo (16/8 h, luz/oscuridad). Cuando la superficie de la caja se cubrió totalmente se adicionaron 5 mL de una disolución de cloruro de sodio al 0.85%-Tween 20 al 0.05% (SST) y con un portaobjetos estéril se

desprendieron las esporas cuidadosamente para obtener la suspensión correspondiente (Gómez-López *et al.*, 2005; Höller *et al.*, 2000).

2.2.4.2 Cultivo en arroz fermentado

Para el cultivo masivo de los hongos se utilizó arroz fermentado (AF) como sustrato. La fermentación se realizó en frascos de vidrio de 225 mL, en los cuales se depositaron 20 g de arroz y 30 mL de agua destilada. Los frascos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante una noche para la fermentación del arroz. Posteriormente, se esterilizó en posición inclinada a 121 °C, 15 lb in⁻¹ de presión por 30 minutos. Después de 24 h, cada frasco se inoculó con 2 ml de la suspensión de esporas y/o micelio y se dejaron en incubación durante 40 días a 25 °C, con fotoperíodo (12/12 h, luz/oscuridad) (Soman *et al.*, 2001). Al final de este tiempo, el cultivo se congeló y se liofilizó.

2.2.5 Preparación de los extractos orgánicos

2.2.5.1 Obtención de los extractos de acetato de etilo

El material fúngico liofilizado se trituró y se maceró con acetato de etilo a temperatura ambiente por 24 horas, proceso que se repitió dos veces y la tercera extracción con el disolvente a aproximadamente 50 °C, por media hora. El disolvente se eliminó a presión reducida, en un evaporador rotatorio equipado con baño María a 40 °C hasta obtener los extractos crudos de acetato de etilo (ECA), los cuales se transfirieron a viales previamente pesados, se secaron a temperatura ambiente y se mantuvieron 4 °C en la oscuridad.

2.2.5.2 Obtención de extractos metanólicos

El material fúngico residual se maceró con metanol a temperatura ambiente, el proceso sólo se repitió una vez. El disolvente se eliminó a presión reducida, en un evaporador rotatorio equipado con baño María a 40 °C hasta obtener el extracto crudo metanólico (ECM). Estos se transfirieron a viales previamente pesados, se secaron a temperatura ambiente y se mantuvieron 4 °C en la oscuridad.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del cepario de la Unidad de Biotecnología del CICY se seleccionaron 16 cepas, las cuales se reactivaron exitosamente y se monitoreó su identidad y pureza para ser conservadas viables y estables.

El monitoreo de la pureza de las cepas se realizó mediante el medio agar-soya-tripticaseína (TSA), el cual se empleó para verificar la presencia o ausencia de bacterias (Figura 15). También se observó el crecimiento en tres diferentes medios para conocer el comportamiento, documentando la esporulación en los mismo (Cuadro 8).



Figura 15. Crecimiento fúngico en TSA, libres de bacterias (A, B) y con bacteria (C).

De esta forma, se observaron que 15 cepas estaban libres de contaminación bacteriana, reconfirmando su pureza, y únicamente *Corynespora cassiicola* (MRH1) presentó bacterias (Figuras 15). Para purificar esta última, se procedió a aislarla de las zonas en las que no hubiera presencia bacteriana y resembrar nuevamente en TSA y posteriormente en PDA (Figura 16).

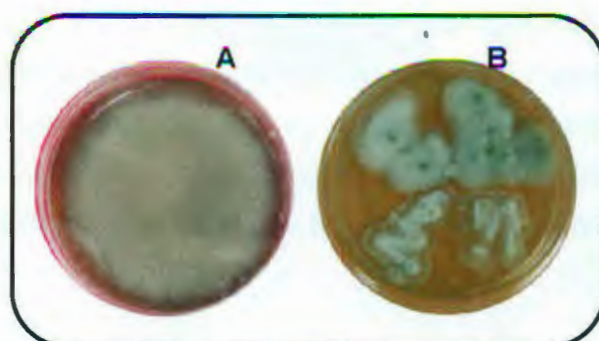


Figura 16. Crecimiento fúngico en PDA (A) y en TSA (B).

Cuadro 8. Tiempo de crecimiento de las cepas seleccionadas en diferentes medios de cultivo.

Nombre de la Cepa	Medio (Días de crecimiento)			Esporas (medio)
	MAM	MEA	PDA	
<i>Acremonium</i> sp. XHH4A	26	26	30	
<i>Beltraniella portoricensis</i> MRH42	13	13	13	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> XHH1E	20	20	20	MAM
<i>Clonostachys rosea</i> TZH27	16	17	18	MAM
<i>Corynespora cassicola</i> MRH1	21	21	23	
<i>Cylindrium elongatum</i> MRH45	18	20	20	MAM
<i>Cylindrocarpon congoense</i> XHH8A	19	23	26	
<i>Fusarium</i> sp. TZA54	25	26	25	MAM
<i>Fusarium incarnatum</i> TZH23	8	17	18	MAM
<i>Gliomastix murorum</i> MRH36	16	18	20	MAM
<i>Perelegomyces parviechinulatus</i> GHH25	23	24	27	
<i>Phaeobotrys</i> sp. GHH14	24	24	25	
<i>Phialophora verrucosa</i> MRH54	20	20	23	
<i>Sibirina</i> sp. MRH52	24	24	27	MAM
<i>Verticillium</i> sp. TZH28	16	16	20	MAM
<i>Volutella</i> sp. TZH22	27	27	30	

MAM: Agar maíz; MEA: Agar extracto de malta y PDA: Agar papa dextrosa.

En los medios de cultivo MAM y MEA se observó un crecimiento más rápido de los hongos, aunque el micelio es más abundante en PDA. En este último medio la mayoría de

las cepas (70%) crecieron entre 18 y 30 días, con excepción de *B. portoricensis* (13 días). Por otra parte, *F. incarnatum* cubrió en tan sólo ocho días la superficie del medio MAM. De acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo, y los señalados por otros investigadores, se podría afirmar que las variaciones observadas en el comportamiento de los hongos son debidas a diferencias en la composición nutrimental de los medios de cultivo *ex situ* (Figura 17).

No se observaron grandes diferencias en el crecimiento con los otros medios y en ellos predominaba el crecimiento micelial en la mayoría de los casos (*Beltraniella portoricensis* MRH42, *Cylindrium elongatum* MRH45 y *Phaeobotrys* sp. GHH14) (Figura 19).

Por otro lado también se monitoreó en qué medio había producción de esporas, debido a que el agar-maíz se considera que tiene bajo valor nutritivo, es un buen medio para inducir la esporulación de muchos hongos y por ende que produzca poco micelio; estos datos se ven reflejados con los obtenidos (Cuadro 8).

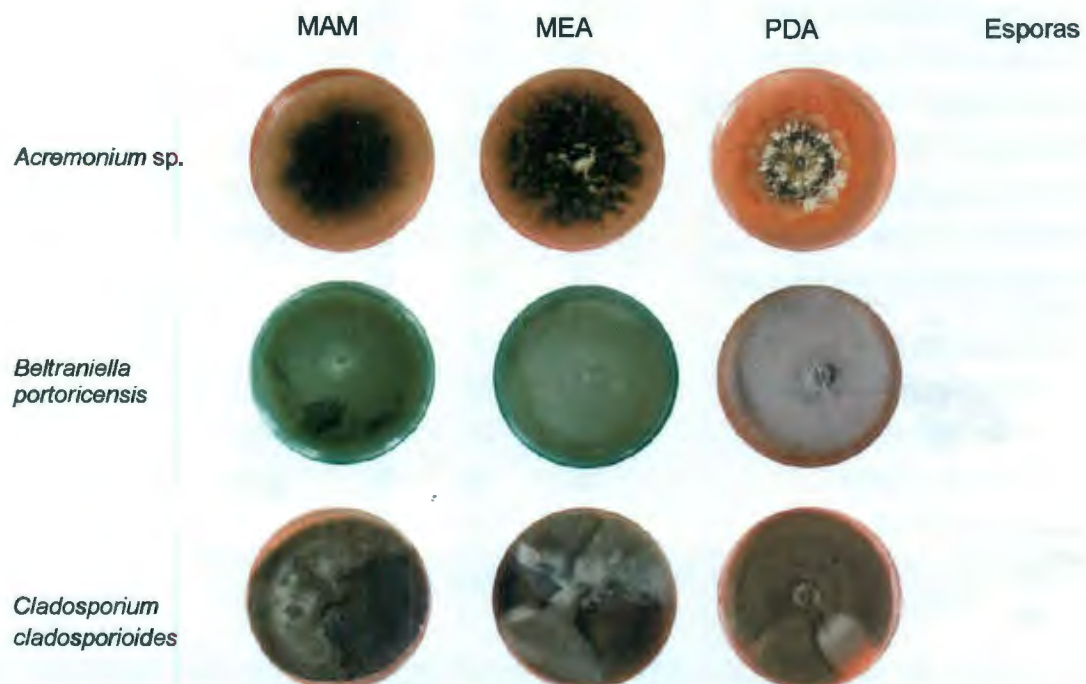





















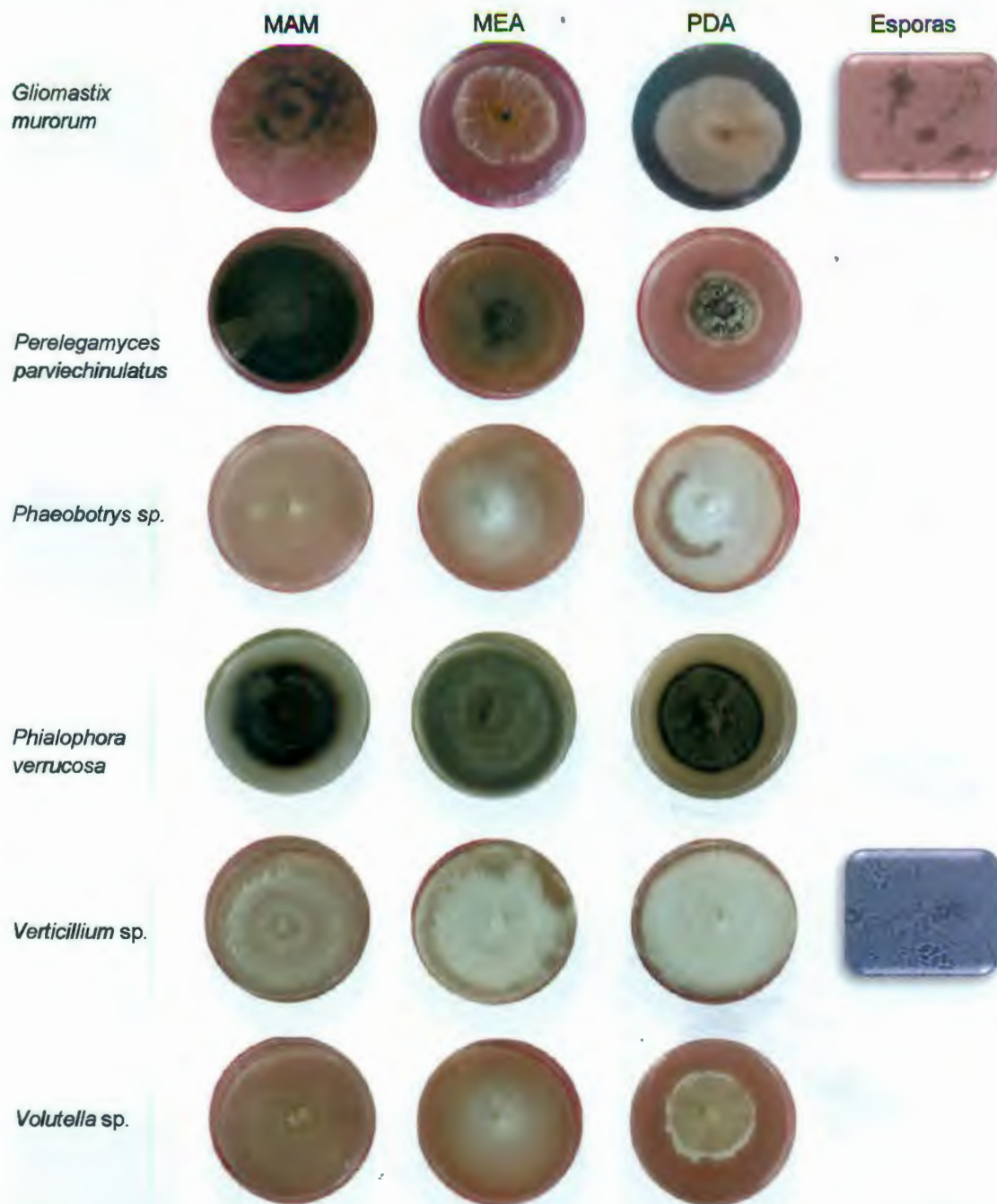


Figura 17. Crecimiento fúngico en los diferentes medios de cultivo; MAM: Agar maíz; MEA: Agar extracto de malta y PDA: Agar papa dextrosa.

	MAM	MEA	PDA	Esporas
<i>Clonostachys rosea</i>				
<i>Corynespora cassicola</i>				
<i>Cylindrium elongatum</i>				
<i>Cylindrocarpon congoense</i>				
<i>Fusarium sp.</i>				
<i>Fusarium incarnatum</i>				

Continuación de la Figura 17.



Continuación de la Figura 17.

Verificada la pureza de cada cepa, se procedió a cultivar todas en arroz fermentado (AF) y después de 40 días se obtuvieron sus correspondientes extractos ECA (16) y ECM (16). Los mayores rendimientos de ECA ($\geq 1\%$) se detectaron en los aislamientos correspondientes a *B. portoricensis* (1.2%), *C. rosea* (1.3%), *C. cassiicola* (1.7%), *Fusarium* sp. TZA54 (1.5%) y *F. incarnatum* (1.9%) (Cuadro 2.4). Las cepas con los menores rendimientos correspondieron a *Phaeobotrys* sp. (0.035%), *Sibirina* sp. (0.247) y *Volutella* sp. (0.026%). Para el caso de los extractos metanólicos, los mayores rendimientos se detectaron en los cultivos de *B. portoricensis* (1%), *C. rosea* (1%), *Perelegamyces parviechinulatus* (1.5%) y *Verticillium* sp. (1.3%) y la cepa con un menor rendimiento correspondió a *Sibirina* sp. (0.12%) (Cuadro 9).

En general, el rendimiento del extracto con AcOEt fue mayor que con metanol, lo que sugiere que los hongos están produciendo metabolitos de baja a mediana polaridad. La posibilidad de que las cepas no hayan consumido en su totalidad el sustrato y se estuvieran extrayendo los componentes del arroz se descarta, debido a que el blanco realmente no produce más que 0.2% de material con metanol y del 0.072% con acetato de etilo. Esto indicó que los productos extraídos correspondieron en su mayoría al micelio y/o a los metabolitos que estos excretan.

Los ECA correspondientes a *Volutella* sp. (0.026%) y *Phaeobotrys* sp. (0.035%), así como el ECM de *Sibirina* sp. (0.12%), presentaron rendimientos bajos, que sugirieron el casi nulo crecimiento de estas cepas en el AF, por lo cual se descartó continuar con su estudio.

El análisis global de los datos de crecimiento permite sugerir qué cepas producen metabolitos polares, debido a que, al comparar ambas extracciones de cada cepa, en algunos casos hay mejores rendimientos en la extracción con metanol que con AcOEt. En otros casos, como *Beltraniella portoricensis* (MRH42) y *Cladosporium cladosporioides* (XHH1E), no hay mucha diferencia entre los rendimientos de las extracciones.

De acuerdo a lo reportado por Chi (2008), también se obtiene mejores rendimientos al extraer con AcOEt las cepas *Fusarium* sp. TZA54 y *Fusarium incarnatum* TZH23 (5.30 y 1.02 g de extracto/100 g de AF, respectivamente), mientras que se obtienen más

rendimientos altos con metanol en la cepa *Verticillium* sp. TZH28 (2.13 g de extracto/100 g de AF).

Cuadro 9. Rendimiento de los extractos fúngicos en AcOEt (ECA) y metanol (ECM) de las cepas cultivadas en arroz fermentado (AF) por 40 días (% mg extracto/g AF).

Cepas	Clave del extracto	% mg EC/1 g de AF	
		AcOEt	MeOH
		a	b
<i>Acremonium</i> sp. XHH4A	AR-10	0.50	0.62
<i>Beltraniella portoricensis</i> MRH42	AR-1	1.2	1.04
<i>Cladosporium cladosporioides</i> XHH1E	AR-2	0.86	0.84
<i>Clonostachys rosea</i> TZH27	AR-3	1.31	1.00
<i>Corynespora casiicola</i> MRH1	AR-4	1.8	0.41
<i>Cylindrium elongatum</i> MRH45	AR-5	0.97	0.63
<i>Cylindrocarpon congoense</i> XHH8A	AR-6	0.96	0.35
<i>Fusarium</i> sp. TZA54	AR-7	1.56	0.71
<i>Fusarium incarnatum</i> TZH23	AR-8	1.91	0.66
<i>Gliomastix murorum</i> MRH36	AR-9	0.73	0.62
<i>Perelegamyces parviechinulatus</i> GHH25	AR-11	0.51	1.58
<i>Phaeobotrys</i> sp. GHH14	AR-12	0.03	0.35
<i>Phialophora verrucosa</i> MRH54	AR-13	0.91	0.35
<i>Sibirina</i> sp. MRH52	AR-14	0.24	0.12
<i>Verticillium</i> sp. TZH28	AR-15	0.72	1.30
<i>Volutella</i> sp. TZH22	AR-16	0.026	0.35
Arroz fermentado	AF	0.072	0.207

EC: Extracto crudo, AF: Arroz fermentado.

En algunos de los extractos presumiblemente se encuentran metabolitos con algún potencial debido a los reportes que se tienen de la actividad biológica, ya que estos resultan en mezclas complejas de cientos de compuestos. La producción de compuestos con algún potencial puede desarrollarse bajo condiciones limitantes de nutrientes, lo que induce al microorganismo a entrar a un periodo de crecimiento lento con alteraciones morfológicas y cambios en el metabolismo, debido a la variación de nutrientes y las condiciones de incubación (Casa-López *et al.*, 2004; Adri y Demian, 2003).

Por otro lado, estudios recientes señalan que en la fermentación en sustrato sólido se obtienen mayores rendimientos en la obtención de metabolitos con alguna actividad biológica. En el caso particular de *Clonostachys rosea* se han evaluado varios sustratos sólidos para comparar el rendimiento de éstos y los costos de producción (Pandey *et al.*, 2001). En general, el arroz fermentado fue el de mejor rendimiento, aunado al bajo costo que éste tiene, que es de aproximadamente 613 dólares/Ha-1 en comparación con el empleado de un medio líquido que es de 1,078 dólares/Ha-1. Además, a menudo el rendimiento depende de la asociación del micelio con un sustrato sólido como un ancla para su óptimo crecimiento y productividad (Krauss *et al.*, 2002).

2.4 CONCLUSIONES

En el medio PDA el 70% de las cepas crecieron entre 18 y 30 días, mientras que en los medios de cultivo MAM y MEA se observó un crecimiento más rápido, aunque en el medio MAM el 50% de las cepas produjo esporas.

De las 16 cepas fúngicas cultivadas en arroz fermentado, se obtuvieron 16 extractos de AcOEt y 16 extractos de MeOH.

2.5 REFERENCIAS

- Adrio, J.L y A.L. Demian (2003). Fungal biotechnology. *Internacional Microbiology*, 6, 191-199.
- Aguilar, C.N., G. Gutiérrez-Sánchez, L.A. Prado-Barragán, R. Rodríguez-Herrera, J.L. Martínez-Hernandez y J.C. Contreras-Esquivel. (2008). Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4, 354-366.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgees Publishing Company, Minneapolis, Minnesota. 241pp.
- Carmichael, J.W, W.B. Kendrick, L. Connors y L. Singler (1980). *Genera of Hyphomycetes*. University of Alberta Press, Canada. 386 pp.
- Casas-López, J.L., J.A. Sánchez-Perez, F.G. Fernández-Sevila, E. Molina Grima y Y. Chisti (2004). Fermentation, optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 119-1126.
- Gómez-López, A., A. Aberkane, E. Petrikkou, E. Mellado, J.L. Rodríguez Tudela y M. Cuenca Estrella (2005). Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 4, 1251-1255.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105, 1422-32.
- Hölker U., M. Höfer y J. Lenz (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 175-186.
- Höller, U., A.D. Wright, G.F. Mattheé, G.M. König, S. Draeger, H-J. Aust y B. Schulz (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, 104, 1354-1365.
- Krauss, U., A. Martínez, E. Hidalgo, M. Hoopen y C. Arroyo (2002). Two-step liquid/solid state scaled-up production of *Clonostachys rosea*. *Mycological Research*, 106, 1449-1454.

- Nakasone, K.K.S., W. Peterson y S-C. Jong (2004). Preservation and distribution of fungal cultures, In: *Biodiversity of Fungal Inventory and Monitoring Methods*, Mueller, G.M., G.F. Bills, M.S. Foster (eds). Elsevier Academic Press, China. pp. 37-47.
- Pandey, A., G. Szakacs, C.R. Soccol, J.A. Rodriguez-Leon y V.T. Soccol (2001). Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*, 77, 203–214.
- Pinzón Gutiérrez, Y.A., S.L. Bustamante y G. Buitrago (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 8-18.
- Robinson T., D. Singh y P. Nigam (2001) Solid-state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 284-289.
- Singh, M.P., M.M. Leighton, L.R. Barbieri, D.M. Roll, S.E. Urbance, L. Hoshan y L.A. McDonald (2010). Fermentative production of self-toxic fungal secondary metabolites. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 335-340.
- Smith D. (2003) Culture collections over the world. *International Microbiology*; 6, 95-100.
- Smith, D. y A.H.S. Onions (1994). The preservation and maintenance of living fungi. International Mycological Institute. CAB International, second edition. United Kingdom. 122 pp.
- Soman, A.G, J.B. Gloer, C.R. Angawi, D.T. Wicklow y D.F. Dowd (2001). Vertilecanin: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, 64, 189-192.

CAPITULO III

EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA

3.1 INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios, también conocidos como productos naturales (PN), generalmente son estructuras de bajo peso molecular (3,000 uma). A su vez, las estimaciones indican que existen alrededor de 100,000 productos naturales conocidos producidos por microorganismos. Entre éstos, se calculan que 12,000 son antibióticos conocidos, el 55% son producidos por bacterias filamentosas del género *Streptomyces*, 11% de otras bacterias filamentosas y 22% por hongos filamentosos (Demain y Sánchez, 2009).

Entre los fungicidas de origen microbiano que son actualmente comercializados se encuentran los derivados de la estrobilurina A, producida por la especie *Strobilurus tenacellus* (Knight *et al.*, 1997). Debido a su volatilidad e inestabilidad a la luz, se sintetizaron diversos derivados, siendo los más conocidos comercialmente la azoxistrobina y el metilo de kresoxim (Figura 18). La primera posee actividad contra una gran variedad de fitopatógenos y la segunda contra mohos polvorientos (Dayan *et al.*, 2009).

Una gran cantidad y variedad de metabolitos fúngicos con propiedades fungicidas *in vitro* ha sido aislada, como la ciclosporina A producida por la cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum*. Este compuesto demostró una buena actividad contra el fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodríguez *et al.*, 2006). Otro ejemplo es el cladospórido D (Figura 18) que inhibe a *Pyricularia oryzae* y *Mucor racemosus* (Zhang *et al.*, 2001). Sin embargo, relativamente se conoce muy poco del metabolismo fúngico ante la amplia diversidad que existe de los hongos saprófitos, estimados en poco más de un millón y medio (Lodge, 2001).

Por otra parte, la búsqueda de alternativas para el control de los fitopatógenos es muy importante y debe ser continua, debido a que los fungicidas naturales también pueden inducir resistencia. La alternancia y variación de agroquímicos naturales, así como el

control dentro de un manejo integrado de plagas, son de las mejores estrategias conocidas para la agricultura y el ambiente.

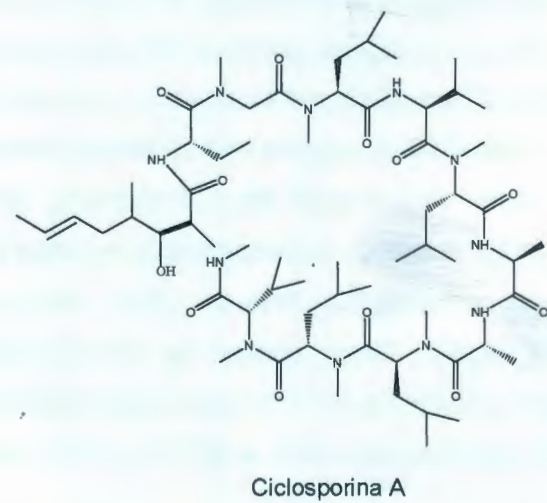
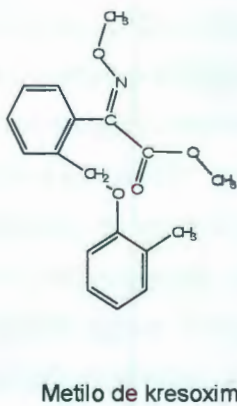
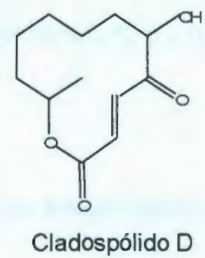
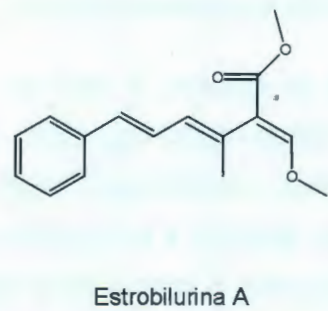
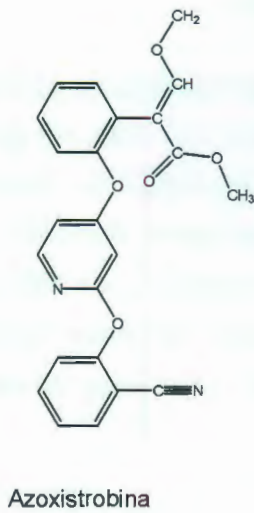


Figura 18. Metabolitos fúngicos reportados con actividad antifúngica.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Estandarización del bioensayo en microdilución con *Colletotrichum gloeosporioides*

3.2.1.1 Inducción de la esporulación de *C. gloeosporioides*

Para la obtención de esporas, la cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* se inoculó en cajas Petri conteniendo medio agar-maíz. Después de siete o diez días, las esporas se obtuvieron empleando una disolución salina de 0.85% de NaCl-0.05% de Tween 20 p/v (15 mL), la cual se adicionó a la superficie del cultivo del patógeno. Posteriormente, se removieron las esporas y el micelio de la caja y ambos se filtraron con una doble capa de tela de gasa. Las esporas del filtrado resultante se contabilizaron con ayuda de la cámara de Neubauer (10 μ L) y la suspensión de esporas se ajustó a una concentración de 1×10^5 .

3.2.1.2 Bioensayo antifúngico en microdilución contra *C. gloeosporioides*

Los extractos fúngicos se disolvieron en DMSO (dimetil sulfóxido). Al primer pozo de cada columna de una microplaca estéril de 96 pozos se le adicionaron 190 μ L de medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) y 10 μ L del extracto fúngico a evaluar (40 μ g/ μ L). Posteriormente, 100 μ L de esta mezcla homogénea se transfirieron al siguiente pozo y así sucesivamente hasta el pozo No. 3. Finalmente, se adicionaron 100 μ L de la suspensión de esporas del hongo *C. gloeosporioides* en cada pozo para obtener un volumen de 200 μ L, con una concentración final de 1,000, 500 y 250 μ g/mL del extracto y 2.5, 1.25 y 0.62% del DMSO. Como control de crecimiento se utilizó el medio RPMI-1640, el fitopatógeno y DMSO al 2.5%; y como control de inhibición del crecimiento DMSO al 40%. Finalmente, se incubó por 96 h, a 26 °C y a 16/8 h luz/oscuridad.

La lectura se realizó de manera visual mediante la escala numérica establecida por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Primero, se verificó que el crecimiento micelial hubiera sido exitoso en los controles de medio RPMI-1640 con

el fitopatógeno (control negativo). Además, se verificó que en el control positivo DMSO al 40% no hubiera crecimiento (0) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Escala numérica para la lectura de la inhibición del crecimiento en el bioensayo en microdilución en microplaca (NCCLS, 2002).

Parámetro de lectura	Clase
Ninguna reducción del crecimiento, 100%	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 o tan sólo el 25% del crecimiento del control negativo	1
Completamente claro, sin ningún crecimiento comparado con el control negativo	0

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) se determinó mediante la fórmula de Abbott, con los valores obtenidos según la escala establecida por el NCCLS (Cuadro 10). Fórmula de Abbott:

$$\% \text{ ICM} = \frac{\text{Control negativo} - \text{crecimiento de la muestra}}{\text{Control negativo}} \times 100$$

3.2.2 Bioensayo de dilución en agar contra *Corynespora cassicola* (ITC-03), *Curvularia* sp (ITC-01) y *Helminthosporium* sp. (ITC-04)

El extracto de acetato de etilo se disolvió en DMSO (40 µg/µL) y se adicionó al medio de cultivo estéril enfriado aproximadamente a 50 °C, con agitación constante para tener una mezcla homogénea de extracto crudo/DMSO/medio a una concentración de 1 mg/mL. Un volumen aproximado de 10 mL se yació a las cajas Petri (60 × 15 mm) y se dejaron en observación por 48 h para comprobar su esterilidad; transcurrido este tiempo, las cajas se inocularon con un disco invertido de agar (0.6 cm de diámetro) conteniendo el fitopatógeno. Posteriormente, se mantuvieron en incubación a 25 °C ± 2 en oscuridad, hasta que el control negativo (fitopatógeno en DMSO/medio) cubrió toda la superficie de la caja Petri. Como control positivo se utilizó Mirage 45 CE (procloraz) a una

concentración de 200 µg/mL; se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. El diámetro del crecimiento micelial se midió diariamente en direcciones perpendiculares (Wenquiang *et al.*, 2006).

3.2.3.1 Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

Para determinar el porcentaje de inhibición micelial a cada muestra se sustrajo los 0.6 cm de diámetro del disco de inoculación inicial al diámetro total del crecimiento micelial y se aplicó la fórmula de Abbott.

Control negativo: crecimiento micelial total del patógeno en medio V8/DMSO (0.5%) menos diámetro del disco inicial (0.6 cm).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Establecimiento del bioensayo en microdilución para *C. gloeosporioides*

En el establecimiento del bioensayo en microdilución para *C. gloeosporioides* se siguió la técnica reportada por la NCCLS, M38-P, utilizando como control de inhibición de DMSO altas concentraciones (40%). Primero se determinó la cantidad de esporas de *C. gloeosporioides* para observar el efecto fungicida, evaluando la carga de esporas a cuatro diferentes concentraciones (1×10^5 , 1×10^6 , 5×10^5 y 5×10^6 de esporas/mL) (Figura 19). Los resultados mostraron que la germinación y el crecimiento micelial se inhibieron a todas las concentraciones de esporas evaluadas. Por otra parte, también se detectó que a las 96 h de incubación las hifas iniciaban su crecimiento, por lo que se estableció como parámetro del tiempo óptimo de inhibición de la germinación (Figura 20).

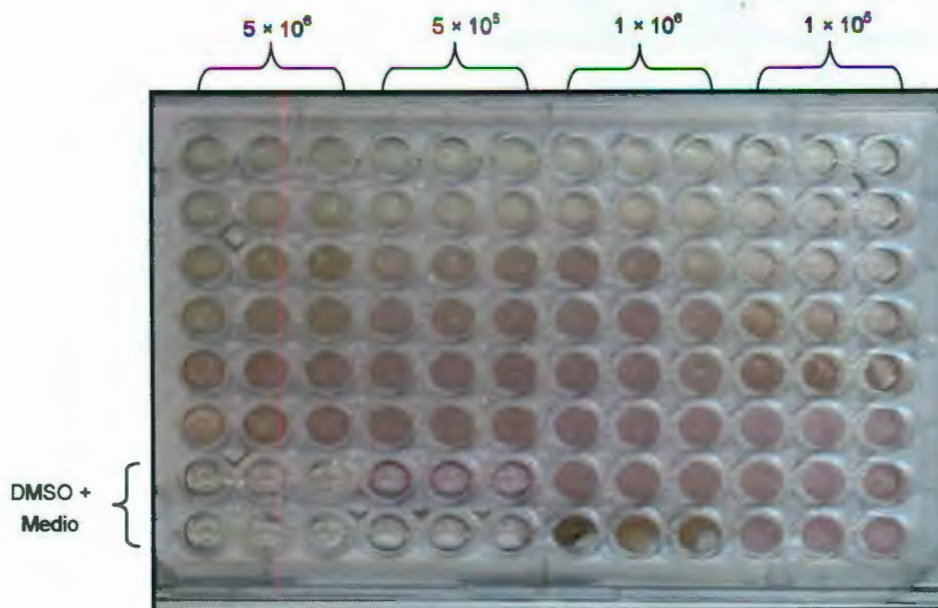


Figura 19. Bioensayo en microplaca para determinar la concentración del inóculo a emplear.

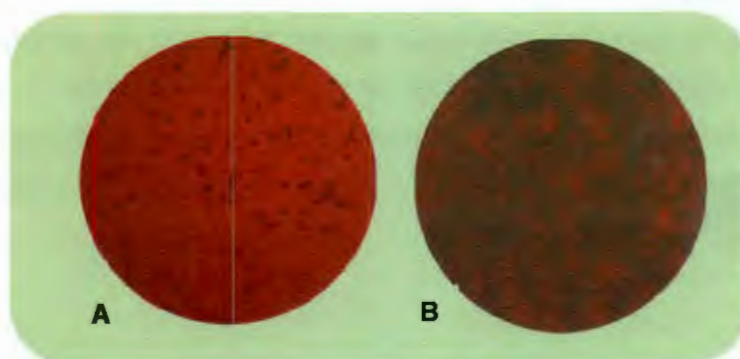


Figura 20. Observación el microscopio de A: Esporas; B: Hifas.

Para corroborar que el DMSO al 40% está actuando como fungicida, se llevó a cabo una réplica de la microplaca en cajas de Petri (Figura 21), en la cual se observó que el

fitopatógeno no creció en el medio con las condiciones óptimas de incubación que este necesitaba, en cambio para los del control negativo sí se observó crecimiento. Con esto se determinó la acción fungicida del DMSO al 40%, el cual se utilizó como control positivo de actividad inhibitoria, con 1×10^5 esporas/mL, en un tiempo de 96 h, a 26 °C y a 16/8 horas luz/oscuridad.

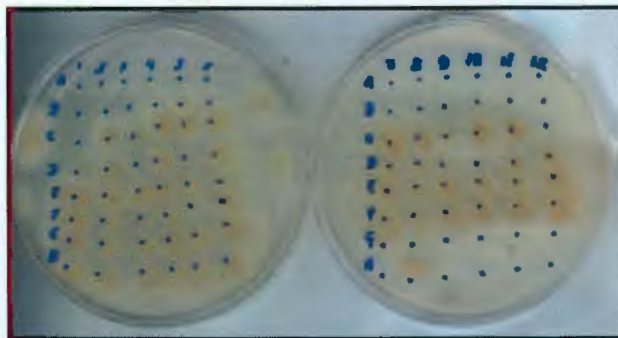


Figura 21. Réplica de las diferentes concentraciones evaluadas de esporas y DMSO.

3.3.2 Evaluación de extractos contra *Colletotrichum gloeosporioides* (CICY 02) por la técnica de microdilución

La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de acetato de etilo, con excepción del correspondiente al de *Sibirina* sp., se realizó contra *C. gloeosporioides* (CICY 02) mediante el ensayo de microdilución para confirmar los datos que se obtuvieron en estudios previos empleando el método de disco, con la misma cepa (Cuadro 11).

Cuadro 11. Comparación de los resultados de la evaluación antifúngica de los extractos seleccionados por los métodos de microdilución y de disco.

Cepa	<i>C. gloeosporioides</i>		
	Extracto	500 µg/ Disco	Microdilución 1,000 µg/mL
<i>Acremonium</i> sp. XHH4A	AR-10a	NA	NA
<i>Beltraniella portoricensis</i> MRH42	AR-1a	15	25
<i>Cladosporium cladosporioides</i> XHH1E	AR-2a	NA	NA
<i>Clonostachys rosea</i> TZH27	AR-3a	NA	NA
<i>Corynespora cassicola</i> MRH1	AR-4a	NA	NA
<i>Cylindrium elongatum</i> MRH45	AR-5a	15	25
<i>Cylindrocarpon congoense</i> XHH8A	AR-6a	NA	NA
<i>Fusarium</i> sp. TZA54	AR-7a	11	25
<i>Fusarium incarnatum</i> TZH23	AR-8a	25	50
<i>Glomastix murorum</i> MRH36	AR-9a	NA	25
<i>Phaeobotrys</i> sp. GHH14	AR-11a	NA	NA
<i>Perelegomyces parviechinulatus</i> GHH25	AR-12a	NA	25
<i>Phialophora verrucosa</i> MRH54	AR-13a	NA	NA
<i>Verticillium</i> sp. TZH28	AR-14a	NA	NA
<i>Volutella</i> sp. TZH22	AR-15a	NA	NA
Arroz fermentado	AF-AcOEt	NA	NA
Positivo (DMSO)	-	-	100

NA: No activo

Los resultados mostraron que entre los quince extractos evaluados, únicamente el de *F. incarnatum* (AR-8a) presentó la capacidad de inhibir a *C. gloeosporioides* (Figura 22), a una concentración de 1,000 y 500 µg/mL con un porcentaje de ICM del 50% y 37.5%. Estos resultados permitieron corroborar los datos obtenidos en el bioensayo de disco, para el cual se reportó un halo de inhibición del crecimiento de 25 mm a una concentración de 500 µg/por disco. Por otro lado, *Beltraniella portoricensis* (MRH42), *Cylindrium elongatum* (MRH45) y *Fusarium* sp. (TZA54) exhibieron actividad significativa (25% a 1,000 µg/mL) contra este fitopatógeno al igual que en los reportes anteriores (De la Rosa García, 2007; Reyes Estebanez, 2009). La gran ventaja del método de microdilución es la cantidad de extracto requerido para la evaluación, el número de

muestras a evaluar con sus diluciones, y por lo tanto del tiempo total del bioensayo con resultados confiables y reproducibles.

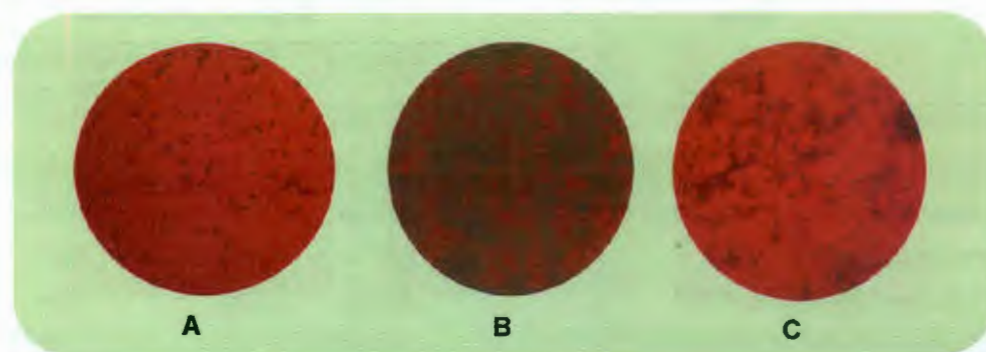


Figura 22. Inhibición del crecimiento micelial; A) DMSO, B) Medio + fitopatógeno, C) AR-8a (1,000 µg/mL)

3.3.3 Evaluación de los extractos contra *Corynespora cassiicola* (ITC-03), *Curvularia* sp. (ITC-01) y *Helminthosporium* sp. (ITC-04) en dilución en agar

Para complementar la información del espectro de acción antifúngica de los extractos obtenidos de los hongos seleccionados, éstos se evaluaron contra *Corynespora cassiicola* (ITC-03), *Curvularia* sp. (ITC-01) y *Helminthosporium* sp. (ITC-04).

Los resultados indicaron que de los 28 extractos (14 de AcOEt y 14 de MeOH), los correspondientes a *C. rosea* (AR-3b), *Fusarium* sp. (AR-7b), *F. incarnatum* (AR-8a y AR-8b) y *P. verrucosa* (AR-13b) mostraron propiedades inhibitorias contra al menos uno de los fitopatógenos evaluados (Cuadro 12).

La comparación múltiple de medias Fisher LSD del porcentaje de ICM de *Helminthosporium* sp. (ITC-04), separó al extracto de *F. incarnatum* (AR-8a) por presentar el mayor porcentaje de inhibición con 75% (Figura 23), seguido del extracto metanólico del mismo hongo (AR-8b) con 66%, *C. rosea* (AR-3b) con 65% y *P. verrucosa* (AR-13b) con 62%. El resto de los extractos ocasionaron porcentajes menores al 50% de inhibición del crecimiento micelial, como es el caso del extracto de AcOEt de *G. murorum* (AR-9a) con 42.05%.

Cuadro 12. Resultados de la evaluación antifúngica de los extractos fúngicos por el método de difusión en agar contra tres cepas fitopatógenas a 1,000 µg/mL.

CEPA	CLAVE DEL EXTRACTO	% ICM		
		<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>C. cassiicola</i>	<i>Curvularia</i> sp.
<i>Acremonium</i> sp. XHH4A	AR-10a	4.6klm	3.4jkl	2.7jk
	AR-10b	15.5hi	2.3l	NE
<i>Beltraniella portoricensis</i> MRH42	AR-1a	2.7lmn	2.3l	2.3jk
	AR-1b	0.00n	0.00m	0.00k
<i>Cladosporium cladosporioides</i> XHH1E	AR-2a	5.7kl	2.7kl	2.3jk
	AR-2b	0.0n	0.0m	8.3h
<i>Clonostachys rosea</i> TZH27	AR-3a	5.3klm	4.1jk	2.2jk
	AR-3b	65.5cd	69.3d	81.8c
<i>Corynespora cassiicola</i> MRH1	AR-4a	2.6lmn	2.3l	4.17jk
	AR-4b	12.5ij	0.0m	NE
<i>Cylindrium elongatum</i> MRH45	AR-5a	6.4k	2.3l	2.3jk
	AR-5b	0.0n	0.0m	0.0k
<i>Cylindrocarpon congoense</i> XHH8A	AR-6a	4.9klm	8.3i	2.6jk
	AR-6b	0.0n	0.0m	7.6hi
<i>Fusarium</i> sp. TZA54	AR-7a	34.5f	32.2f	23.1f
	AR-7b	10.2j	23.1g	48.1e
<i>Fusarium incarnatum</i> TZH23	AR-8a	75.4b	75.4c	51.5d
	AR-8b	66c	78.8b	87.9b
<i>Gliomastix murorum</i> MRH36	AR-9a	42.0e	43.9e	2.6jk
	AR-9b	0.0n	0.0m	13.2g
<i>Perelegamyces parviechinulatus</i> GHH25	AR-11a	26.9g	32.9f	4.1j
	AR-11b	0.0n	0.0m	4.9ij
<i>Phaeobotrys</i> sp. GHH14	AR-12a	NE	NE	NE
	AR-12b	18.2h	0.0m	NE
<i>Phialophora verrucosa</i> MRH54	AR-13a	2.3mn	3.79jkl	3.8j
	AR-13b	62.5d	42.4e	NE
<i>Sibirina</i> sp. MRH52	AR-14a	2.65lmn	4.92	4.17j
	AR-14b	NE	NE	NE
<i>Verticillium</i> sp. TZH28	AR-15a	14.8i	15.1h	11.7g
	AR-15b	NE	NE	NE
<i>Volutella</i> sp. TZH22	AR-16a	NE	NE	NE
	AR-16b	0.0n	0.0m	0.0k
Mirage		100a	100a	100a

NE: No evaluado; ICM: Inhibición del crecimiento micelial, Letras: diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Fisher LSD ($P \leq 0.05$).

En cuanto a la comparación múltiple de medias Fisher LSD, en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *C. cassiicola* (ITC-03), permitió separar nuevamente al extracto metanólico de *F. incarnatum* (AR-8b), por presentar el mayor porcentaje de inhibición con un 78.8%, al extracto de acetato de etilo del mismo hongo (AR-8a) con un 75.4% (Figura 23) y al extracto metanólico de *C. rosea* (AR-3b) con un 69.3% (Figura 24); mientras que el extracto de AcOEt de *G. murorum* (AR-9a) y el extracto de MeOH de *P. verrucosa* (AR-13b) exhibieron una actividad significativa con 43.94 y 42.42%, respectivamente.

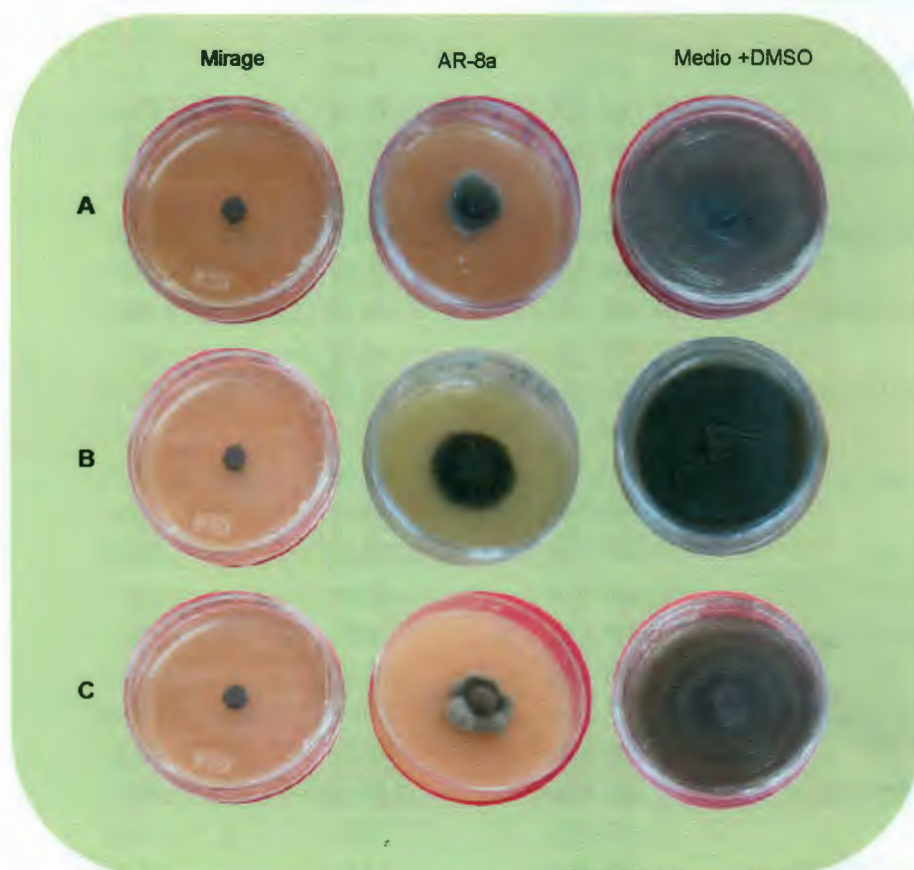


Figura 23. Inhibición del crecimiento micelial del extracto AR-8A. A) *Helminthosporium* sp., B) *Curvularia* sp. y C) *Corynespora cassiicola*.

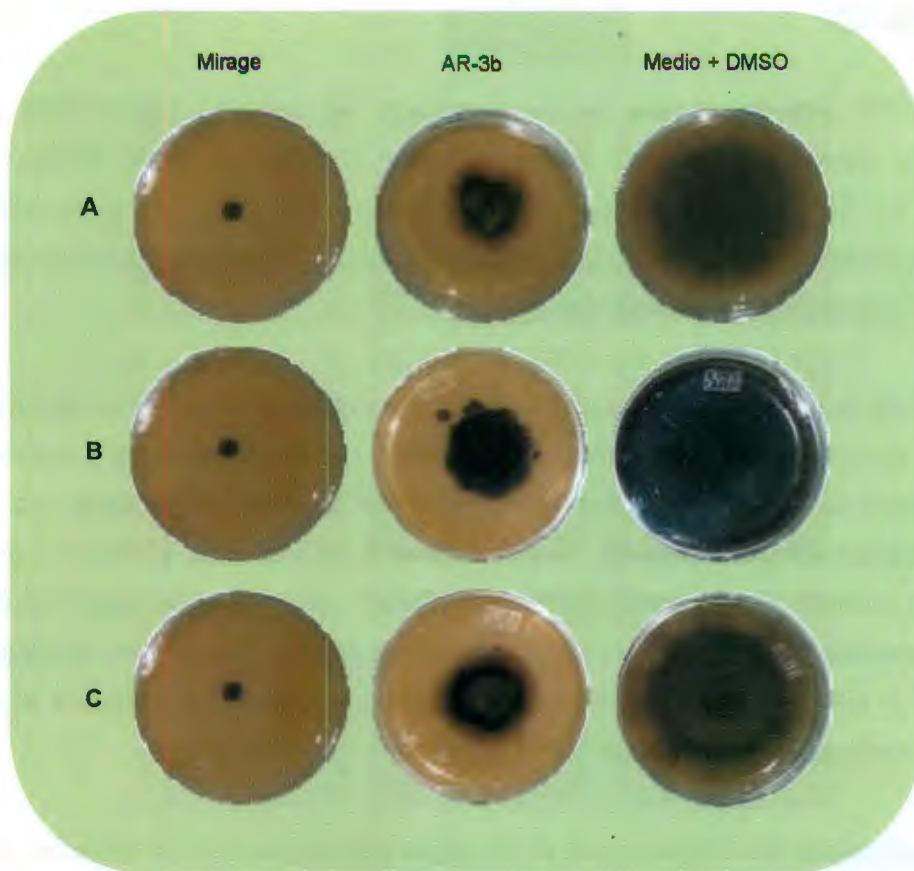


Figura 24. Inhibición del crecimiento micelial del extracto AR-3b: A) *Helminthosporium* sp., B) *Curvularia* sp. y C) *C. cassicola*.

Al comparar las medias de la inhibición del crecimiento del micelio en *Curvularia* sp. (ITC-01), se observó que el extracto de *F. incarnatum* (AR-8b) fue el más activo, con un porcentaje de inhibición de 87.9%, seguido de *C. rosea* (AR-3b) con 81.8% y por último el extracto de acetato de etilo de *F. incarnatum* (AR-8a) que ocasionó 51.5% de inhibición; mientras que el extracto de MeOH de *Fusarium* sp. (AR-7b) mostró una ligera actividad con 48.11%.

3.4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para la concentración de esporas concuerdan con los previamente reportados para *C. gloeosporioides* (Wedge y Smith, 2006), quienes emplearon 1×10^6 esporas/mL y tiempos de incubación de siete días y las lecturas las realizaron por absorbancia a 620 nm. En este caso, la cepa que emplearon fue aislada de cultivos de fresa del sur de Mississippi, USA.

En la literatura se reportan varias metodologías para evaluar el potencial antifúngico de un compuesto natural, dentro de las más usadas están la difusión en disco y la dilución en agar (Scorzoni *et al.*, 2007). Estas técnicas tienen algunas desventajas, ya que no permiten evaluar simultáneamente un gran número de extractos y utilizan cantidades mayores de muestra. Por el contrario, la microdilución ofrece un gran potencial debido a que se necesitan cantidades muy bajas de la muestra y se pueden analizar varias muestras y a diferentes concentraciones a la vez, optimizando el tiempo y el material empleado (Hadacek y Greger, 2000).

El análisis global de las evaluaciones antifúngicas realizadas permitió detectar a los dos extractos de *F. incarnatum* (TZH-23) y al metanólico de *C. rosea* (TZH-27) con actividad antifúngica de amplio espectro ($\leq 50\%$).

El extracto metanólico (AR-8b) de *F. incarnatum* exhibió la más alta actividad contra *Curvularia* sp. (87.88%), seguido de *C. cassiicola* (78.79%); mientras que el extracto de acetato de etilo (AR-8a) de *F. incarnatum* produce una inhibición de 75.4% en el crecimiento micelial de *Helminthosporium* sp. y de *C. cassiicola*. Por otro lado, el extracto metanólico de *C. rosea* (AR-3b) mostró una promisorio capacidad de inhibir el crecimiento de los tres fitopatógenos ($\leq 65\%$), presentando la mayor efectividad contra *Curvularia* sp. (81.82%).

La actividad detectada para la cepa *F. incarnatum* TZH23, aunado a lo previamente reportado contra *A. tagetica*, *C. albicans*, *C. gloeosporioides*, *B. subtilis* y *E. carotovora* indican el gran potencial antimicrobiano de *F. incarnatum* en el control de fitopatógenos de importancia agrícola.

El género *Fusarium* es muy diverso y altamente prolífico, del cual se ha reportado una gran cantidad de metabolitos. Entre éstos, las enniatinas B, B₁, B₂, B₄, J₁ y K₁ (Figura 25) y las naftoquinonas tienen una amplia actividad biológica antimicrobiana, insecticida e inhiben la acil-coenzima A (aciltransferasa), y tienen propiedades ionofóricas. La enniatina B₁ presentó un MIC de 75 µg/mL e inhibe la germinación de las esporas de *B. cinerea* a una concentración de 25 µg/mL (Pohanka *et al.*, 2004).

	R ₁	R ₂	R ₃
Enniatina B	Me	i-Pr	i-Pr
Enniatina B ₁	Me	i-Pr	s-Bu
Enniatina B ₂	H	i-Pr	i-Pr
Enniatina B ₄	Me	i-Pr	i-Bu
Enniatina J ₁	Me	i-Pr	Me
Enniatina K ₁	Me	i-Pr	Et

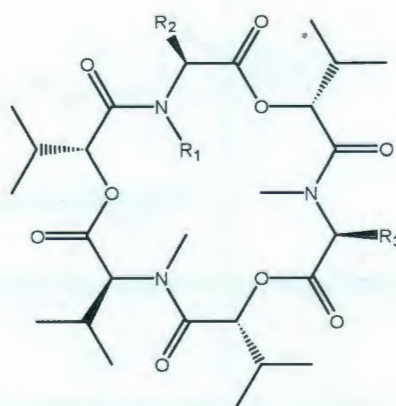


Figura 25. Estructura química de las enniatinas aisladas del género *Fusarium*.

Entre los compuestos previamente reportados de *F. incarnatum* con actividad antifúngica están la fusapirona y desoxifusapirona (Figura 26), los cuales se evaluaron contra los hongos *Alternaria alternata*, *Ascochyta rabiei*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Geotrichum candidum*, *Phoma tracheiphila*, *Penicillium verrucosum* y *P. brevicompactum* (Altamore *et al.*, 2004), a una concentración de 15 µg/por disco. Entre éstos, la fusapirona es la que posee la mayor actividad contra hongos, pero es inactiva frente a las levaduras *Pichia guilliermondii* y *Rhodotorula glutinis* (Altamore *et al.*, 2000).

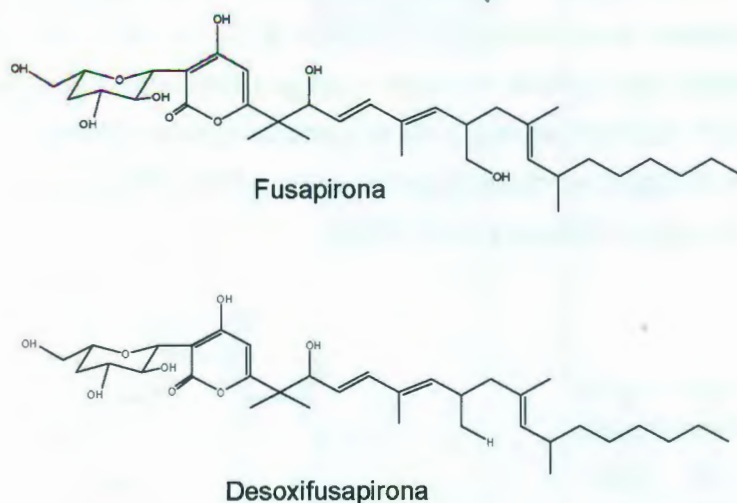


Figura 26. Metabolitos con actividad antifúngica de *Fusarium incarnatum*.

A partir de cultivos en arroz fermentado de *F. incarnatum* TZH23 se obtuvo el metabolito fusarolactona, el cual aún no ha sido evaluado (Figura 27) (De la Fuente Ortigón, 2008).

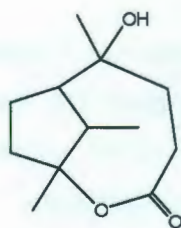


Figura 27. Estructura molecular propuesta para la fusarolactona aislada de *Fusarium incarnatum*.

El género *Clonostachys* tiene una amplia actividad antagonista tanto contra hongos patógenos que dañan a las plantas de interés agronómico como *Alternaria radicina*, *A. dauci* (Jensen *et al.*, 2004), *Didymella rabiei*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. y *Rhizoctonia solani* (Dugan *et al.*, 2005). En reportes previos, se menciona que extractos obtenidos de un caldo de filtrado de *Clonostachys* sp. (n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol), el extracto hexánico y butanólico presentaron actividad frente a *R. solani*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* (Su Jang *et al.*, 2001).

Los compuestos que se han aislado del género y/o especie son gliotoxina y glioviridina (Figura 28), con una actividad antifúngica contra *R. solani* y *Phytium* sp. Gliotoxina presenta un amplio espectro de acción contra *R. bataticola*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotium rolfsi* (Singh et al., 2005). Viridina (Figura 28) es un metabolito con actividad antifúngica contra *Botrytis allii*, *Colletotrichum lini* y *Fusarium caeruleum* (con una MIC de 0.003 a 0.006 µg/mL) aislado de *Clonostachys* sp. (Reino et al., 2008).

A partir del hongo *C. rosea* se aisló el compuesto 4-ceto-clonostachidiol, un antifúngico frente a *Trichophyton mentagrophytes* y *Cladosporium resinae* a una concentración de 40 µg por disco (Lang et al., 2006); también las gliocadinas A y B se han reportado con actividad antibacteriana contra *S. aureus* (Guo et al., 2007).

Otro extracto que presentó una ICM interesante corresponde al extracto metanólico de *P. verrucosa* contra *Helminthosporium* sp. (65.9%) y del 42.4% contra *C. cassicola*. Esta especie es evaluada por primera vez en la búsqueda de metabolitos antifúngicos.

El género *Phialophora* ha sido muy poco estudiado en cuanto a sus propiedades biológicas y químicas. Entre los metabolitos reportados de este género se incluyen a gregatin A aislado de *Phialophora* sp. (Figura 29), con actividad fungicida contra *B. cinerea* (85%) y *B. subtilis* (Lynn, 1999).

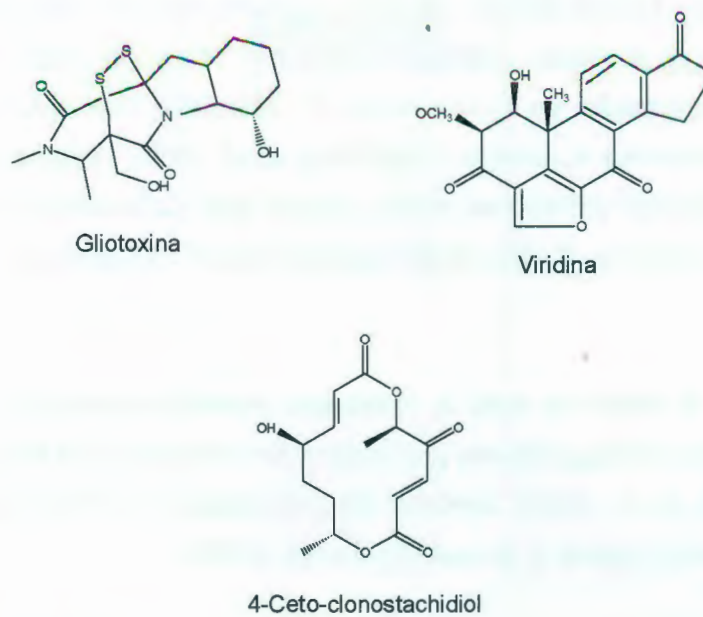


Figura 28. Metabolitos con actividad antifúngica reportados de *Clonostachys rosea*.

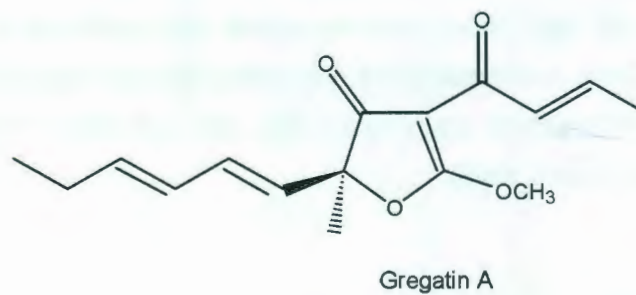


Figura 29. Metabolito con actividad antifúngica de *Phialophora* sp.

3.5 CONCLUSIONES

A nivel *in vitro*, los resultados del bioensayo antifúngico en disco se correlacionaron con el de microdilución frente a *C. gloeosporioides*.

Los dos extractos (AR-8a y AR-8b) de *Fusarium incarnatum* demostraron un amplio espectro con capacidad antifúngica a 1,000 µg/mL contra *C. gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola* (ITC-03), *Curvularia* sp. (ITC-01) y *Helminthosporium* sp. (ITC-04), siendo un candidato potencial para continuar su estudio y para ser aplicado en campo.

El extracto metanólico de *Clonostachys rosea* exhibió capacidad antifúngica significativa contra las tres cepas evaluadas.

3.6 REFERENCIAS

- Altomare, C., G. Perrone, C.M. Zonno, A. Evidente, R. Pengue, F. Fanti y L. Polonelli (2000). Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. *Journal of Natural Products*, 63, 1131-1135.
- Altomare, C., R. Pengue, M. Favilla, A. Evidente y A. Visconti (2004). Structure-activity relationships of derivatives of fusapyrone, an antifungal metabolite of *Fusarium semitectum*. *Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2997-3001.
- Dayan, F.E., C.L. Cantrell y S.O. Duke (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 17, 4022-4034.
- De la Rosa García, S. (2007). Evaluación del potencial microbiano de microorganismos aislados de cenotes de la Península de Yucatán. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, pp. 144-147.
- De la Fuente Ortegon, J.A. (2008). Metabolitos antifúngicos producidos por hongos microscópicos de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, p. 66-68.
- Demain, A.L. y S. Sánchez (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62, 5-16.
- Dugan, F.M., S.L. Lupien, M. Hernandez-Bello, T.L. Peever y W. Chen (2005). Fungi resident in chickpea debris and their suppression of growth and reproduction of *Didymella rabiei* under laboratory conditions. *Journal of Phytopathology*, 153, 431-439.
- Guo, H., H. Hu, S. Liu, X. Liu, Y. Zhou y Y. Che (2007). Bioactive *p*-terphenyl derivatives from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Gliocladium* sp. *Journal of Natural Products*, 70, 1519-1521.
- Jensen, B., I.M.B. Knudsen, M. Madsen y D.F. Jensen (2004). Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology*, 94, 551-560.
- Hadacek, F. y H. Greger (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11, 137-147

- Knight, S.C., V.M. Anthony, A.M. Brady, A.J. Greenland, S.P. Heaney, D.C. Murray, K.A. Powell, M.A. Schulz, C.A. Spinks, P.A. Worthington y D. Youle (1997). Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 349-72.
- Lang, G., M.I. Mitova y G. Ellis (2006). Bioactivity profiling using HPLC/microtiter-plate analysis: application to a New Zealand marine alga-derived fungus, *Gliocladium* sp. *Journal of Natural Products*, 69, 621-624.
- Lodge, D.J. (2001). Estimación mundial y regional de hongos, En: Enfoques Contemporáneos para el Estudio de la Biodiversidad. H.M. Hernández, A.N. García Aldrete, F. Alvarez y M. Ulloa. Instituto de Biología, UNAM. México, pp. 291-301.
- Lynn, E., H. Gardnerb, D. Weisleder y M. Leibc (1999). Production and toxicity of 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-methyl-4H-1-benzopyran-4-one by *Phialophora gregata*. *Phytochemistry*, 49, 226-239.
- 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, Wayne, PA.
- Pohanka, A., K. Capieau, A. Broberg, J. Stenlid, E. Stenström y L. Kenne (2004). Enniatins of *Fusarium* sp. strain F31 and their inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination. *Journal of Natural Products*, 67, 851-857.
- Reino, J.L., R.F. Guerrero, R. Hernández-Galán y G.I. Collado (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7, 89-123.
- Reyes-Estebanez, M.M.J. (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México.
- Rodríguez, M.A., G. Cabrera y A. Godeas (2006). Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 575-586.
- Scorzoni, L., T. Benaducci, A.M.F. Almeida, D.H.S. Silva, V.S. Bolzani y M.J. Gianinni (2007). The use of standard methodology for determination of antifungal activity of

natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. Brazilian Journal of Microbiology, 38, 391-397.

Su Jang, K., H. Mo Kim y B. Koo Chung (2001). Purification and antifungal activities of an antibiotic produced by *Gliocladium virens* G1 against plant pathogens. The Plant Pathology Journal, 17, 52-56

Wenqiang, G., L. Shufen, Y. Ruixiang y H. Yanfeng (2006). Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. Natural Product Research, 20, 992-998.

Wedge, D.E. y B.J. Smith (2006). Discovery and evaluation of natural product-based fungicides por disease control of small fruit. In Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases in Natural Product Based Fungicides. Inderjit and K.G. Mukerji (Eds). Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, Springer. 1-14 p.

Zhang, H., H. Tomoda, N. Tabata, H. Miura, M. Namikoshi, Y. Yamaguchi, R. Masuma y S. Omura (2001). Cladospolide D, a new 12-membered macrolide antibiotic produced by *Cladosporium* sp. FT-0012. The Journal of Antibiotics (Tokyo), 54, 635-641.

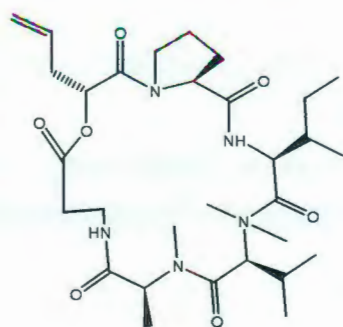
CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN INSECTICIDA

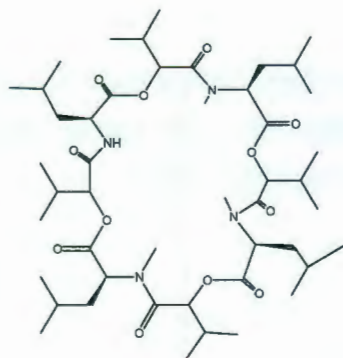
4.1 INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios de origen fúngico constituyen una fuente importante de moléculas con actividad biológica, tanto para humanos como para la agricultura. En esta última área hay relativamente menos investigación dirigida a desarrollar alternativas naturales para el control de plagas, en especial para contrarrestar a los insectos (Assaf *et al.*, 2005; Propagdee *et al.*, 2008).

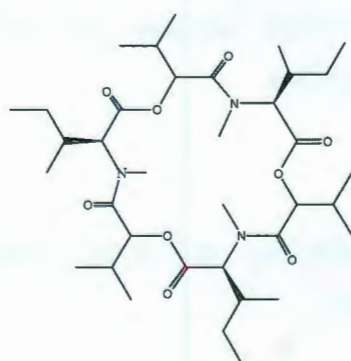
Uno de los primeros estudios encaminados a la detección de metabolitos con actividad insecticida se realizó con cepas de *Metarhizium anisopliae*, conduciendo a la obtención de dos depsipéptidos cíclicos que se denominaron destruxinas A y B (Vey *et al.*, 2001) (Figura 30). En la actualidad, se conocen 35 destruxinas con actividad insecticida variables (Pedras *et al.*, 2002). Otros compuestos han sido reportados de diversos hongos, como la bassianólida, la beauvericina y las beauverólidas de *Beauveria bassiana* (Gupta *et al.*, 1995); las enniatinas de *Fusarium avenaceum* (Hermann *et al.*, 1996); las efraeptinas de *Tolypocladium niveum* (Gupta *et al.*, 1991); y de *Eupenicillium shearii* se aisló la shearamida A (Belofsky *et al.*, 1998) y B, ambas activas frente a *Helicoverpa zea* y *Spodoptera frugiperda*, respectivamente (Figura 30) (Belofsky *et al.*, 1995). El ácido dipicolínico (Figura 30) aislado de *Paecilomyces fumosoroseus* el cual se reportó con actividad contra ninfas de *Bemisia tabaci* y *B. argentifolii*, (Assaf *et al.*, 2005). Otro extracto interesante correspondió al producido por el hongo *Cantharellus cibarius*, el cual demostró resultados similares al plaguicida α -cipermetrina utilizado contra moscas y cucarachas (Cieniecka-Rosłonkiewicz *et al.*, 2007); el sesquiterpenoide llamado penifulvin A, aislado del hongo *Penicillium griseofulvum*, exhibió propiedad antialimentaria contra *S. frugiperda* (Gaich y Mulzer, 2009).



Destruxina

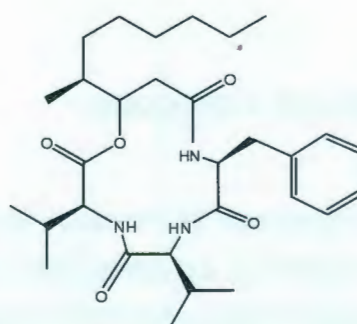


Bassianólida

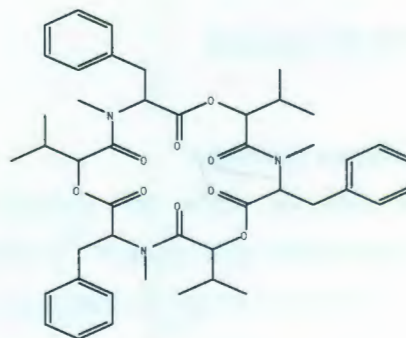


Enniatína

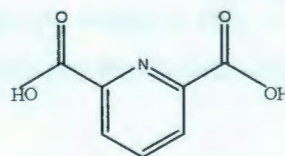
Shearamida A



Beauverólida



Beauvericina



Acido dipicolínico

Figura 30. Metabolitos fúngicos reportados con actividad insecticida.

4.2 OBJETIVOS

- Evaluar los extractos fúngicos selectos en el ensayo antialimentario contra *Spodoptera littoralis*.
- Determinar el efecto *in vitro* de los extractos fúngicos seleccionados sobre la inhibición del establecimiento de los áfidos *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las poblaciones de insectos y las plantas de chile (*Capsicum annum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.), se mantuvieron en cámaras climatizadas a una temperatura de 22 ± 1 °C, humedad relativa: 60-70% y fotoperiodo de 16:8 h (luz/oscuridad).

4.3.1 Cría de insectos

4.3.1.1 *Myzus persicae*

Las semillas de chile se pusieron a germinar y cuando las plántulas tenían aproximadamente seis hojas se inocularon con adultos de *M. persicae*. Las condiciones de cultivo son las mismas utilizadas para el cultivo de insectos.

4.3.1.2. *Rhopalosiphum padi*

Las plántulas de una semana de cebada son infestadas con adultos de *R. padi* y se incubaron con las condiciones previamente mencionadas.

4.3.1.3 Insecto masticador

La cría y mantenimiento de *S. littoralis* se llevó a cabo en recipientes de plástico de diferentes tamaños, según el estadio larval, tamaño y número. Las larvas se mantuvieron en una dieta artificial general para noctúidos (Poitut y Bues, 1970) (Cuadro 13) y los adultos con una disolución azucarada (agua de miel).

Cuadro 13. Composición de la dieta artificial para *S. littoralis*.

Ingredientes	Cantidad (g/L)
Agar	2.5
Ac. benzoico	1.25
Sémola de maíz	140
Germen de trigo	35
Levadura de cerveza	37.5
Ac. ascórbico	5
Nipagin	1
Sales minerales	1.55
Vitaminas	12

4.3.2 Bioensayo de establecimiento de *Myzus persicae* y *Rophalosiphum padi*

Las hojas de chile se cortaron en discos de 2 cm² que se dividieron en dos mitades, las cuales se depositaron separadas sobre agar (insectagar) contenido en cajas transparentes de acrílico (3 × 3 × 1.5 cm) para el ensayo (Figura 31). Las muestras se prepararon a una concentración de 10 mg/mL. Una de las mitades del disco foliar se impregnó con 10 µL de la muestra (100 µg/cm²) y la otra mitad con el disolvente (10 µL) utilizado en la muestra. Posteriormente, 10 áfidos se depositaron en cada una de las cajas réplica y se llevaron a incubar por 24 horas en forma invertida, a 22 ± 1 °C y con un fotoperiodo de luz/oscuridad 16:8, en condiciones de humedad. Un total de 22 repeticiones se emplearon en cada tratamiento (González-Coloma, 2000).

Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del establecimiento (IE) (Kubo, 1991). El porcentaje de IE se calculó para cada extracto mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IE} = \left[1 - \frac{\% \text{ de establecimiento en el tratamiento}}{\% \text{ de establecimiento en el control}} \times 100 \right]$$



Figura 31. A) Preparación de discos de pimienta con un sacabocados de 2 cm² y B) Unidad experimental: caja con el disco en dos mitades sobre el agar y la tapa correspondiente con 10 áfidos.

Para el caso de *R. padi* se emplearon hojas de cebada de 2 cm de longitud y se depositaron sobre agar (dos por caja), siguiendo el procedimiento descrito para *M. persicae*. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del establecimiento (IE) (González-Coloma, 2007).

4.3.3 Bioensayo antialimentario contra *Spodoptera littoralis*

Las placas de agar (10 cm de diámetro) se perforaron con un sacabocados de 1 cm², en posiciones opuestas; en cada pozo se introdujeron discos de hojas de pimienta de la misma dimensión. Las muestras se disolvieron con acetona y/o metanol a una concentración inicial de 10 µg/µL (10 mg/mL). Dos de los discos foliares (dispuestos en posiciones opuestas) se impregnaron con un volumen de 10 µL de la muestra (100 µg/disco) y el otro par con el disolvente (10 µL/disco) utilizado para inocular las muestras. Posteriormente, dos larvas del sexto estadio de *S. littoralis* se introdujeron por placa (Figura 32). En este ensayo se emplearon cinco repeticiones por tratamiento (González-Coloma, 2000).

El ensayo concluyó una vez que las larvas consumieron el 75% de los discos control o de los dos correspondientes a la muestra en estudio.

Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de la alimentación (IA) siguiendo la fórmula de Abbott:

$$\% IA = \left[1 - \frac{\text{Área del tratamiento consumido}}{\text{Área del tratamiento control}} \times 100 \right]$$

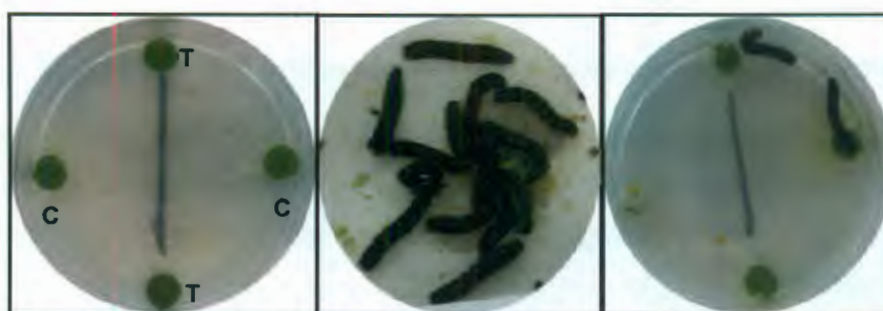


Figura 32. Distribución del tratamiento: a) caja inicial con dos discos de tratamiento (T) y dos de control (C); b) Larvas del sexto estadio y (C) final del ensayo con un par de hojas consumidas en un 75% aproximadamente.

4.3.4 Cromatografía de capa delgada (CCD)

Para el análisis en cromatografía de capa delgada (CCD) se utilizaron cromatofolios (E. M. Merck DC Alufolin) con soporte de aluminio impregnados con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.20 mm de espesor. Estos se corrieron en tres diferentes mezclas de disolventes a) hexano-acetona (8:2), b) CH₂Cl₂-AcOEt (8:2), c) CH₂Cl₂-MeOH (9:1) (Figura 33). Todas las placas se observaron bajo luz UV de onda corta (254 nm) y larga (365 nm). Para visualizar de forma permanente los cromatogramas, las placas se sumergieron en ácido fosfomolibdico al 5%. Posteriormente se secaron con una pistola de aire caliente durante uno o dos minutos, hasta observar la aparición de las manchas correspondientes a los metabolitos.

4.4 RESULTADOS

Los resultados de la evaluación de los 30 extractos de origen fúngico seleccionados (16 metanólicos y 14 de acetato de etilo) se evaluaron en tres modelos insecticidas, específicamente contra el insecto masticador *S. littoralis* y los succionadores *M. persicae* y *R. padi* (Cuadro 14).

4.4.1 Bioensayo de inhibición de establecimiento contra *Myzus persicae*

Entre los 30 extractos evaluados, el 63% de ellos mostró la capacidad de inhibir el establecimiento de *M. persicae* ($IE \geq 70\%$). Dentro de estos parámetros, todas las cepas, con excepción de *Cylindrium elongatum*, demostraron efectividad en al menos uno de sus extractos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Evaluación de los extractos fúngicos frente a *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi* a concentraciones de 100 µg/disco.*

CEPA FUNGICA	CLAVE DEL EXTRACTO	% IE		
		% IA	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>
<i>Acremonium</i> sp. XHH4A	AR-10a	4.4fg	67.5fghij	75.3bcd
	AR-10b	43.4abcde	85.2abcde	76.0bc
<i>Beltraniella portoricensis</i> MRH42	AR-1a	56,9ab	90.6abc	68.7bcde
	AR-1b	17.2defg	74.5efgh	77.7bcd
<i>Cladosporium cladosporioides</i> XHH1E	AR-2a	20.2defg	45.1l	67.5bcdef
	AR-2b	47,3abcd	77.4bcdefgh	73.5bcd
<i>Clonostachys rosea</i> TZH27	AR-3a	5.8fg	78.2bcdefgh	51.4efghi
	AR-3b	47.5abcd	93.3a	81.6ab
<i>Corynespora casiicola</i> MRH1	AR-4a	28.4bcdefg	63.7ghij	50.4fghi
	AR-4b	33.8abcdef	90.8abcd	72.0bcd
<i>Cylindrium elongatum</i> MRH45	AR-5a	43,8abcde	64.9hij	44.5ij
	AR-5b	12.3efg	58.1ijkl	62.6cdefgh
<i>Cylindrocarpon congoense</i> XHH8A	AR-6a	41.9abcde	56.2jkl	66.3cdefg
	AR-6b	53.2abc	76.5defgh	75.9bcd
<i>Fusarium</i> sp. TZA54	AR-7a	13.1efg	55.3jkl	61.6cdefghi
	AR-7b	16.1defg	73.4efghi	63.2defgh
<i>Fusarium incarnatum</i> TZH23	AR-8a	12.5efg	75.9defgh	63.5cdefgh
	AR-8b	27.6bcdefg	75.9efgh	72.3bcd
<i>Gliomastix murorum</i> MRH36	AR-9a	20.6defg	91.7ab	92.1a
	AR-9b	23.4bcdefg	66.9fghij	76.9abcd
<i>Perelegomyces parviechinulatus</i> GHH25	AR-11a	18.1defg	82.3abcdef	72.5bcd
	AR-11b	13.9efg	65.2ghij	77.7abcd
<i>Phaeobotrys</i> sp. GHH14	AR-12a	NE	NE	NE
	AR-12b	0g	78.9defg	28.5jk
<i>Phialophora verrucosa</i> MRH54	AR-13a	21.0cdefg	49.0kl	48.3hi
	AR-13b	7.6fg	88.9abcde	48.7hi
<i>Sibirina</i> sp. MRH52	AR-14a	19.2defg	64.7hijk	64.0cdefgh
	AR-14b	0g	86.9abcde	72.5bcd
<i>Verticillium</i> sp. TZH28	AR-15a	25.3bcdefg	93.7a	71.9bcd
	AR-15b	61.3a	74.9efgh	47.7hi
<i>Volutella</i> sp. TZH22	AR-16a	NE	NE	NE
	AR-16b	19.2defg	74.4efgh	42.3ghi
Arroz fermentado	AF-AcOEt	27.1bcdefg	43l	48.4hi
	AF-MeOH	13.8efg	46.5l	18.5k

NE: No evaluado; IA: Inhibición de la alimentación; IE: Inhibición del establecimiento, Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Fisher LSD (P ≤ 0.05).

La comparación múltiple de medias manifestó diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.05$), separando al extracto de AcOEt de *Verticillium* sp. (AR-15a) y el extracto metanólico de *C. rosea* (AR-3b) con 93.7 y 93.3%, respectivamente contra *M.persicae*; así como los extractos de AcOEt de *B. portoricensis* (AR-1a) y *Gliomastix murorum* (AR-9A) con 90.6 y 91.7%, respectivamente; finalmente, el extracto metanólico de *C. cassicola* (AR-4b) con 90.8% se consideró como el de mayor efecto en la inhibición del establecimiento de *M. persicae*, siendo diferente a los testigos correspondientes (AF-AcOEt y AF-MeOH).

Los extractos que presentaron una IE $\geq 90\%$ contra *M. persicae* se evaluaron a tres diferentes concentraciones (10, 2 y 0.4 mg/mL) para calcular su CL_{50} y CL_{90} mediante el análisis Probit. Los resultados permitieron detectar al extracto metanólico de *C. rosea* como el mejor, por presentar las concentraciones letales más bajas a una CL_{50} de 0.8 y CL_{90} de 8.5 mg/mL, para impedir el establecimiento de *M. persicae* (Cuadro 15).

Cuadro 15. Determinación de la CL_{50} y CL_{90} de los extractos más activos contra *M.persicae*.

Cepa fúngica	Extracto	CL_{50} (mg/mL)*	CL_{90} (mg/mL)*	X^2
<i>Beltraniella portoricensis</i> MRH42	AR-1a	3.4 (3.9, 2.8)	21.1 (28.2, 16.9)	30.6
<i>Clonostachys rosea</i> TZH27	AR-3b	0.8 (1.0, .66)	8.5 (10.8, 6.7)	3.9
<i>Gliomastix murorum</i> (MRH36)	AR-9a	1.5 (1.8, 1.3)	11.7 (14.6, 9.3)	6.7
<i>Verticillium</i> sp. TZH28	AR-15a	0.8 (1.1, .6)	12.6 (21.9, 8.4)	22.4

*Intervalo de confianza 95%

4.4.2 Bioensayo de inhibición de establecimiento contra *Rophalosiphum padi*

Los resultados de la evaluación con *R. padi* permitieron detectar al 46% de los extractos con un IE $\geq 70\%$. Bajo este criterio, se detectaron 11 cepas con actividad en alguno de sus dos extractos, correspondiendo a las cepas de *B. portoricensis* (AR-1a), *C. cladosporioides* (AR-2b), *C. rosea* (AR-3b), *C. cassicola* (AR-4b), *C. congoense* (AR-6b), *F. incarnatum* (AR-8b), *G. murorum* (AR-9a y AR-9b), *Acremonium* sp. (AR-10b), *P. parviechinulatus* (AR-11a y AR-11b), *Sibirina* sp. (AR-14b) y *Verticillium* sp. (AR-15a) (Cuadro 14).

La comparación múltiple de Fisher LSD ($P \leq 0.05$) de medias reveló diferencia estadística significativa entre los tratamientos, separando al extracto de AcOEt de *G. murorum* (AR-9a) con un porcentaje de inhibición del 92.14% y al extracto metanólico de *Clonostachys rosea* (AR-3b), con un porcentaje de IE del 81.6%, siendo los de mayor efecto en cuanto a la IE de *R. padi*.

Para determinar la efectividad de los extractos más activos contra *R. padi*, se calculó la CL_{50} y CL_{90} de los extractos que presentaron una IE $\geq 80\%$, mediante el análisis Probit. Los resultados permitieron detectar al extracto de *G. murorum* (AR-9a) como el de mayor efectividad al requerir las concentraciones más bajas de extracto para inhibir el asentamiento de *R. padi* con una CL_{50} de 1.9 y CL_{90} 19.5 mg/mL (Cuadro 16).

Cuadro 16. CL_{50} y CL_{90} de los extractos contra *R. padi*.

Cepa fúngica	Extracto	CL_{50} (mg/mL)*	CL_{90} (mg/mL)*	X^2
<i>Acremonium</i> sp. XHH4A	AR-10b	2.2 (2.9, 1.6)	27.8 (41.8, 18.4)	1.0
<i>Clonostachys rosea</i> TZh27	AR-3b	3.8 (4.8-2.5)	25 (39.3-19.1)	6.6
<i>Fusarium incarnatum</i> THZ23	AR-8b	4.2 (5.0, 3.4)	48.7 (85.4, 33.3)	16.3
<i>Gliomastix murorum</i> MRH36	AR-9a	1.9 (2.3, 1.6)	19.5 (26.1, 15.3)	40.9

*Intervalo de confianza 95%

4.4.3 Bioensayo antialimentario contra *Spodoptera littoralis*

Los resultados del escrutinio de los 30 extractos fúngicos contra *S. littoralis* mostraron la carencia de efecto antialimentario (AI < 70%) contra esta plaga. Los que exhibieron capacidad antialimentaria modesta correspondieron a las cepas de *Verticillium* sp. (AR-15b), *B. portoricensis* (AR-1a) y *C. congoense* (AR-6b) con valores de 61.34%, 56.95% y 53.21% de IA, respectivamente, sin diferencia significativa entre los tratamientos.

4.4.4 Cromatografía de capa delgada de los extractos más activos

El análisis del perfil cromatográfico por CCD se realizó con los extractos crudos de las cepas *C. rosea* (AR-3b), *F. incarnatum* (AR-8a y AR-8b), *G. murorum* (AR-9a), *Verticillium* sp. (AR-15a) y los respectivos blancos (AFAcOEt y AFMeOH). Los resultados mostraron que en el sistema de disolventes de menor polaridad (sistema a) el extracto de AcOEt de

F. incarnatum presentó cinco componentes con $R_f = 0.25, 0.38, 0.43, 0.50$ y 0.95 , en el de mediana polaridad (b), tres componentes a $R_f = 0.29, 0.61$ y 0.72 ; en el de alta polaridad (c), tres componentes a $R_f = 0.44, 0.72$ y 0.83 diferentes a los observados para los blancos. Por el contrario, el de MeOH presentó en general menos componentes, tres en el sistemas de menos polaridad (a) con $R_f = 0.30, 0.50, 0.88$, en el de mediana polaridad (b), cuatros componentes con $R_f = 0.04, 0.11, 0.17$ y 0.71 ; sólo un en el sistema de alta polaridad (c) con $R_f = 0.82$.

La CCD de *G. murorum* permitió detectar cinco compuestos en el sistema a ($R_f = 0.10, 0.25, 0.30, 0.40, 0.73$), cuatro en b ($0.16, 0.18, 0.38, 0.71$) y cuatro en el sistema c ($0.10, 0.48, 0.71, 0.82$). En las placas del extracto metanólico de *C. rosea* se observa que tiene pocos componentes, de los cuales los de $R_f = 0.38, 0.53, 0.93$ y 0.74 son diferentes al blanco. Finalmente, en el extracto de AcOEt de *Verticillium* sp. únicamente se observaron dos compuestos en el sistema b ($R_f = 0.36, 0.71$) y dos en el de alta polaridad ($R_f = 0.66$ y 0.82), en todos los casos diferentes de los detectados en los blancos (Cuadro 17).

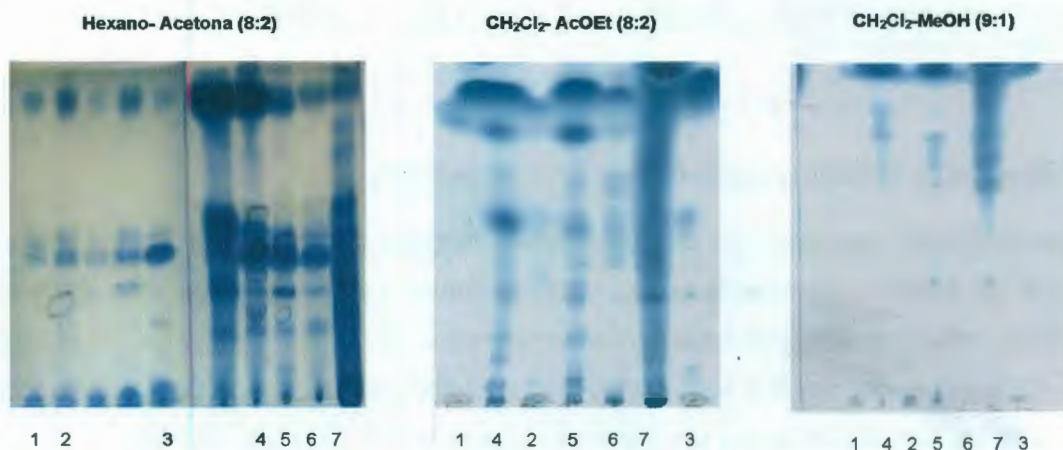


Figura 33. Cromatografía de capa delgada de los extractos crudos activos en tres diferentes sistemas de disolventes [a: hexano-acetona (8:2); b: CH_2Cl_2 -AcOEt (8:2); y CH_2Cl_2 -MeOH (9:1)]. Muestra 1: *Clonostachys rosea* AR-3b; 2: *Fusarium incarnatum* AR-8b; 3: Extracto metanólico de arroz fermentado AFMeOH, 4: *Fusarium incarnatum* AR-8a; 5: *Gliomastix murorum* AR-9a; 6: *Verticillium* sp. AR-15a y 7: Extracto de acetato de etilo de arroz fermentado AFACoEt.

Cuadro 27. Rf de los extractos más activos contra hongos fitopatógenos y/o insectos.

Extracto	Hexano-acetona (8:2)	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt (8:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)
AR-3b	0.38, 0.43, 0.48, 0.53, 0.93	0.74	0.82
AR-8a	0.20, 0.25, 0.33, 0.38, 0.43, 0.50, 0.55, 0.70, 0.85, 0.95, 0.98	0.04, 0.12, 0.18, 0.29, 0.48, 0.61, 0.72	0.16, 0.31, 0.42, 0.44, 0.56, 0.61, 0.67, 0.72, 0.83
AR-8b	0.30, 0.43, 0.50, 0.88	0.04, 0.11, 0.17, 0.31, 0.49, 0.71	0.82
AR-9a	0.10, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40, 0.48, 0.73, 0.85, 0.98	0.07, 0.09, 0.12, 0.16, 0.18, 0.28, 0.38, 0.46, 0.71	0.09, 0.10, 0.30, 0.48, 0.54, 0.59, 0.66, 0.71, 0.82
AR-15a	0.20, 0.30, 0.43, 0.48, 0.85	0.07, 0.36, 0.44, 0.71, 0.82	0.66, 0.82
AFAcOEt	0.20, 0.35, 0.48, 0.55, 0.70, 0.80, 0.85, 0.98	0.06, 0.12, 0.28, 0.33, 0.46, 0.56, 0.78	0.07, 0.17, 0.30, 0.42, 0.54, 0.60, 0.68, 0.80
AFMeOH	0.13, 0.23, 0.43, 0.48, 0.85	0.67, 0.13, 0.29, 0.49, 0.82	0.83

En verde: componentes del blanco correspondiente; en naranja: compuestos en los extremos, requieren aumentar o bajar polaridad y en rojo: componentes que coinciden en extractos de AcOEt y MeOH de la misma especie.

4.5 DISCUSIÓN

El análisis global de los resultados en los ensayos insecticidas permitió detectar al 94% de los extractos metanólicos y al 44% de los de AcOEt como activos (IE ≥ 70%) frente al menos uno de los insectos succionadores *M. persicae* y/o *R. padi*. Los extractos metanólicos de *C. rosea* y AcOEt de *G. murorum* exhibieron la actividad más alta contra las dos especies de áfidos, con valores de IE de 93.3 y 91.7%, respectivamente, para *M. persicae*, y 81.6 y 92.1%, respectivamente para *R. padi*.

Para cada especie de áfido se seleccionaron las cepas con mayor actividad, IE ≥ 90% para *M. persicae* e IE ≥ 75% para *R. padi* y se determinó su concentración letal media (CL₅₀). Lo anterior fue debido a que los blancos correspondientes a cada extracto mostraron cierta actividad (IE ≥ 18-48%), que pueden estar enriqueciendo el efecto de los principios activos fúngicos (Figura 34). Se ha reportado que estos principios activos al ser consumidos por los insectos pueden ocasionarles daño, ya que ellos requieren principalmente de colesterol, el cual no son capaces de producir en su metabolismo (Douglas, 1988; Greenway *et al.*, 1978).

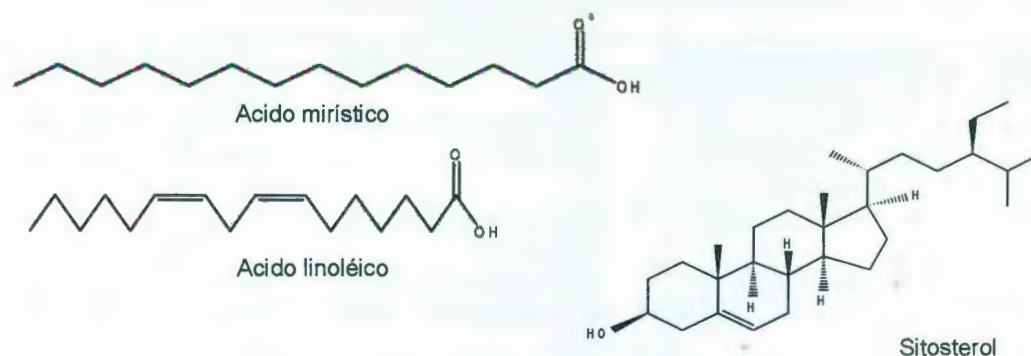


Figura 34. Estructura química de los ácidos grasos mirístico y linoléico y del sitosterol.

Otros extractos cuyos efectos en el IE pueden considerarse significativos ($IE \geq 80\%$) contra *M. persicae*, correspondieron a los metanólicos de las cepas de *Acremonium* sp. (85%), *C. cassicola* (90.8%), *P. verrucosa* (88.9%), *Sibirina* sp. (86.9%) y *Verticillium* sp. (93.7%); y los de AcOEt de los hongos *B. portoricensis* (90.6%) y *P. parviechinulatus* (82.3%). Con respecto a *R. padi*, el blanco de metanol mostró un IE de 18%, por lo cual, sólo se consideraron activos aquellos extractos fúngicos metanólicos con $IE \geq 70\%$. Estos pertenecieron a ocho cepas: *Acremonium* sp. (76.0%), *B. portoricensis* (77.7%), *C. cassicola* (72.0%), *C. congoense* (75.9%), *F. incarnatum* (72.3%), *G. murorum* (76.9%), *P. parviechinulatus* (77.7%) y *Sibirina* sp. (72.5%).

El efecto de los diferentes extractos se atribuyó a los metabolitos que el disolvente extrae. En el caso de la extracción con metanol, se obtienen los componentes de mayor polaridad como saponinas, carbohidratos, entre otras, mientras que el AcOEt tiene la capacidad de extraer una amplia variedad de metabolitos de baja a mediana polaridad.

Esto se pudo detectar por medio del análisis por CCD realizado a los cinco extractos más activos, el cual permitió observar la presencia de compuestos que corresponden a productos del metabolismo fúngico, diferentes a los detectados en el blanco. De forma interesante, se observa que los extractos de *F. incarnatum* presentaron diferentes componentes en la mezcla, coincidiendo únicamente en un compuesto en cada uno de los tres sistemas de disolventes usados para correr la placa. En esta ocasión es la primera

vez que se evalúa el extracto metanólico de *F. incarnatum* (AR-8b), el cual también presenta una buena actividad en los diferentes bioensayos y compuestos de diferente R_f en los sistemas de baja y mediana polaridad. En la de alta polaridad no se alcanzan a detectar compuestos (Figura 33 y Cuadro 17).

Por otro lado, aunque hay componentes muy similares entre los extractos, estos requieren fraccionamientos preliminares o desengrasarlos, para posteriormente seguir evaluando en otros sistemas de elusión y/o métodos de análisis como CG-EM y CLAR, entre otros.

El ácido dipicolínico es el principal producto metabólico de *V. lecanii* y bassianólida tiene propiedades insecticidas frente a *Calliphora erythrocephala* (Figura 30). Además, a partir de este mismo hongo se han aislado otros compuestos como vertilecanina A, que exhibe actividad insecticida frente a *H. zea* (Soman *et al.*, 2001) y fomalactona que tiene actividad contra el nemátodo *Meloidogyne incognita* (Figura 35) (Khambay *et al.*, 2000).

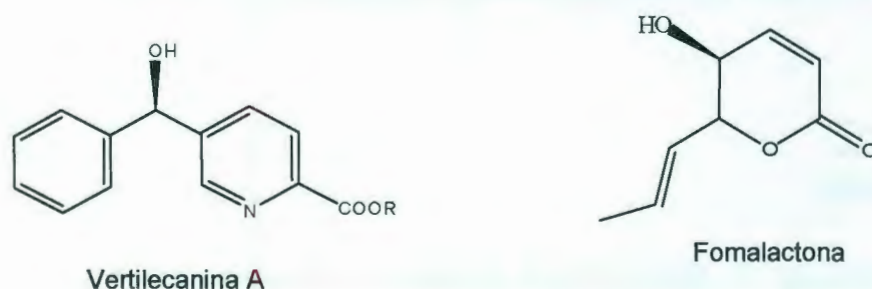


Figura 35. Metabolitos aislados de *Verticillium lecanii*.

Dentro del género *Fusarium* se han aislado diversas naftoquinonas con actividad insecticida, así como el ciclopéptido beauvericina y las enniatinas (Figura 30) (Medentsev *et al.*, 2005). En el caso de *C. rosea* también se reportó la vertilecanina A, que tiene actividad insecticida contra *H. zea*; recientemente otro compuesto aislado es el ciclopéptido nombrado IB-01212 con actividad leishmanicida, el cual no ha sido evaluado en ningún modelo insecticida (Figura 36).

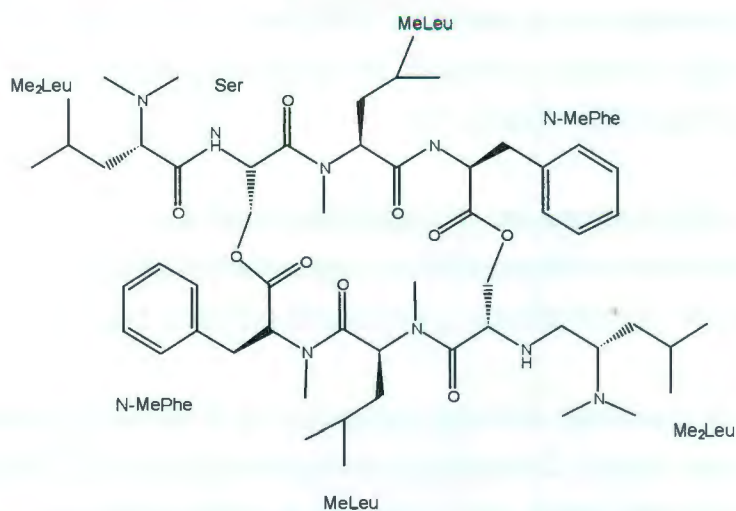


Figura 36. Ciclopeptido aislado de *Clonostachys rosea*.

En la literatura se encuentran pocos reportes sobre las propiedades insecticidas de las diferentes especies o géneros fúngicos estudiados en la presente contribución.

4.6 CONCLUSIONES

El extracto metanólico de *C. rosea* (AR-3b) muestra promisorio actividad contra *M. persicae*, ya que se requieren concentraciones bajas ($CL_{50} = 0.8$ y $CL_{90} = 8.5$ mg/mL) para inhibir su establecimiento.

El extracto de AcOEt de *G. murorum* (AR-9a) tiene mayor efecto sobre las dos especies de áfidos, el cual requiere concentraciones bajas para inhibir a *R. padi* ($CL_{50} = 1.9$ y $CL_{90} = 19.5$ mg/mL) y también a *M. persicae* ($CL_{50} = 1.5$ y $CL_{90} = 11.7$ mg/mL).

Los extractos de *C. rosea* (AR-3b) y *G. murorum* (AR-9a) representan una alternativa altamente promisorio para controlar a *M. persicae* y *R. padi* en un manejo integrado de plagas.

4.7 REFERENCIAS

- Asaff, A., C. Cerda-García-Rojas y M. de la Torre (2005). Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68, 542-547.
- Belofsky, G.N., J.B. Gloer, D.T. Wicklow y P.F. Dowd (1998). Shearamide A: a new cyclic peptide from the ascostromata of *Eupenicillium shearii*. *Tetrahedron Letters*, 39, 5497-5500.
- Belofsky, G.N., J.B. Gloer, D.T. Wicklow y P.F. Dowd (1995). Antiinsectan alkaloids, shearinines A-C and a new paxilline derivative from the ascostromata of *Eupenicillium shearii*. *Tetrahedron Letters*, 51, 3959-3968.
- Cieniecka-Rostónkiewicz, A., A. Sasa, E. Przybysza, B. Morytza, A. Sygudab y J. Pernak (2007). Ionic liquids for the production of insecticidal and microbicidal extracts of the fungus *Cantharellus cibarius*. *Chemistry and Biodiversity*, 4, 218-224.
- Douglas, A.E. (1988). On the source of sterols in the green peach aphid, *Myzus persicae*, reared on holidic diets. *Journal of Insect Physiology*, 34, 403-408.
- Gaich T. y Mulzer J. (2009). Total synthesis of (-)-penifulvin A, an insecticide with a dioxafenestrane skeleton. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 452-453.
- González-Coloma A., C. Gutiérrez, J.M. del Corral, M. Gordaliza, M. L. de la Puente y A. San Feliciano (2000). Structure and species-dependent insecticidal effects of neoclerodane diterpenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3677-3681.
- Greenway, A.R., Griffith, D.C. y Lloyd, S. (1978). Response of *Myzus persicae* to components of aphid extracts and to carboxylic acids. *Entomology Experimental Applied*, 24, 369-374.
- Gupta, S., S.B Krasnoff, D.W. Roberts, J.A.A. Renwick, L.S. Brinen y J. Clardy (1991). Structures of the efrapeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolypocladium niveum*. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 707-709.
- Gupta, S., C. Montllor y Y.S. Hwang (1995). Isolation of novel beauvericin analogs from the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Natural Products*, 58, 733-738.

- Herrmann, M., R. Zocher y A. Haese (1996). Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 393-398.
- Khambay Bhupinder P.S, J.M. Bourne, S. Cameron, R. Kerry Brian y M. Javed Zaki (2000). Communication to the Editor: A nematicidal metabolite from *Verticillium chlamydosporium*. *Pest Management Science*, 56, 1098-1099.
- Kubo I. (1991). Screening Techniques for Plant-Insect Interactions. En: *Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity* (K. Hostettman, ed.) Academic Press, New York, vol. 6. Pp. 179-193.
- Medentsev, A.G., A. Arinbasarova y V.K. Akimenko (2005). Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 573-577.
- Pedras, S.M.C., L.I. Zaharia y D.E. Ward (2002). The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59, 579-596.
- Prapagdee, B., C. Kuekulvong y S. Mongkolsuk (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4, 330-337.
- Poitut, S. y R. Bues (1970). Elevage de plusieurs espèces de lepidoptères Noctuidae sur milieu artificiel simplifié. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, 2, 79-91.
- Soman, A.G, J.B. Gloer, C.R. Angawi, D.T. Wicklow y D.F. Dowd (2001). Vertilecanin: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, 64, 189-192.
- Vey, A., R. Hoagland y T.M Butt (2001). Toxic Metabolites of Fungal Biocontrol Agents. En: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 311-345.

1. El presente capítulo trata de los procedimientos administrativos que se aplican en el caso de la denuncia de un delito. En primer lugar, se describe el proceso de denuncia y el papel que desempeña el fiscal en este proceso. A continuación, se detallan los deberes de los organismos de investigación y de los servicios de asistencia jurídica gratuita. Por último, se aborda el procedimiento de investigación y el papel del juez de instrucción en este proceso.

2. El artículo 172 del Código de Procedimiento Penal establece que la denuncia de un delito puede ser realizada por el titular de la acción penal, por el Ministerio Fiscal o por el juez de instrucción. La denuncia debe ser presentada ante el órgano competente para su conocimiento y, en su caso, para su tramitación.

3. El artículo 173 del Código de Procedimiento Penal establece que el Ministerio Fiscal tiene el deber de promover la acción penal de oficio cuando se trate de delitos de lesa humanidad, de terrorismo o de otros delitos que afectan a intereses de trascendencia social o que perjudican gravemente a la moral pública.

4. El artículo 174 del Código de Procedimiento Penal establece que los organismos de investigación tienen el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de instrucción toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

5. El artículo 175 del Código de Procedimiento Penal establece que el juez de instrucción tiene el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de primera instancia toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

6. El artículo 176 del Código de Procedimiento Penal establece que el juez de primera instancia tiene el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de apelación toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

7. El artículo 177 del Código de Procedimiento Penal establece que el juez de apelación tiene el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de casación toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

8. El artículo 178 del Código de Procedimiento Penal establece que el juez de casación tiene el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de última instancia toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

9. El artículo 179 del Código de Procedimiento Penal establece que el juez de última instancia tiene el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de primera instancia toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

10. El artículo 180 del Código de Procedimiento Penal establece que el juez de primera instancia tiene el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de apelación toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

11. El artículo 181 del Código de Procedimiento Penal establece que el juez de apelación tiene el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de casación toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

12. El artículo 182 del Código de Procedimiento Penal establece que el juez de casación tiene el deber de investigar los delitos denunciados y de proporcionar al juez de última instancia toda la información necesaria para la tramitación del procedimiento.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

La zona centro-sureste de México (Veracruz, Tabasco y la península de Yucatán) corresponde a la zona tropical del país, catalogada de alta biodiversidad y con muchos lugares aún no explorados. Por consiguiente, las investigaciones en cuanto a las propiedades biológicas y químicas de las especies conocidas de esta región son escasas. Por otra parte, se ha reconocido lo altamente prolíferas que son las especies microbianas como los hongos microscópicos, en cuanto a cantidad y a diversidad metabólica (Gloer, 2007). Por lo mencionado anteriormente, el presente trabajo tuvo como objetivo complementar el conocimiento de las propiedades biológicas de hongos saprófitos de la región tropical de México, específicamente dirigido hacia su potencial insecticida, así como complementar datos de la actividad fungicida.

Para llevar a cabo este trabajo, primero se procedió a la selección y reactivación de 16 hongos pertenecientes al cepario de la Unidad de Biotecnología del CICY. Esta fase se consideró esencial para monitorear la pureza, la viabilidad y conocer el comportamiento de crecimiento de las cepas, con la finalidad de documentar la formación de esporas. De esta forma, los resultados confirmaron la reactivación exitosa del 100% de las cepas seleccionadas, de las cuales se conocen 11 cepas hasta nivel especie (*B. portoricensis*, *C. cladosporioides*, *C. rosea*, *C. casiicola*, *C. elongatum*, *C. congoense*, *F. incarnatum*, *G. murorum*, *P. parviechinulatus* y *P. verrucosa*) y cinco a nivel género (*Acremonium* sp., *Fusarium* sp., *Phaeobotrys* sp., *Sibirina* sp., *Verticillium* sp. y *Volutella* sp.). Entre éstas, *Acremonium* sp., *C. rosea*, *C. congoense* y *Verticillium* sp. pertenecen a la familia Moniliaceae y el resto a diferentes familias como Dematiaceae y Tuberculariaceae (Herrera y Ulloa, 1999).

Durante el cultivo de las cepas se observó que 87.5% de ellas crecieron uniformemente y de forma abundante en el medio de arroz fermentado. Al final del crecimiento se realizó la extracción del cultivo sólido (micelio-arroz) con dos disolventes de polaridad ascendente (AcOEt y MeOH), de forma sistemática. Sin embargo, los extractos de AcOEt de *Phaeobotrys* sp. y *Volutella* sp. se descartaron debido a su bajo rendimiento para los bioensayos insecticidas. Para el bioensayo antifúngico en difusión en agar, el extracto

metanólico de *Sibirina* sp. fue insuficiente, por lo que no se evaluó. Por otra lado, se evaluaron menos extractos fúngicos en microdilución contra *C. gloeosporioides*. Finalmente, se obtuvieron 14 extractos de polaridad baja-media y 16 de alta polaridad.

En la parte de evaluación de la efectividad biológica, el trabajo aporta el establecimiento de un bioensayo antifúngico en microdilución contra el hongo *C. gloeosporioides*. Además, se confirmó la actividad fungicida que anteriormente habían presentado los extractos de *B. portoricensis* (MRH42), *C. elongatum* (MRH45), *Fusarium* sp. (TZA54), *F. incarnatum* (TZH23) en el bioensayo de disco contra este mismo fitopatógeno. Esta técnica de bioensayo antifúngico permitirá realizar las evaluaciones con un número elevado de muestras, ya que requiere cantidades mínimas de ellas, por lo que el monitoreo de alternativas naturales para el control del agente causal de la antracnosis en papaya y en otros cultivos de importancia económica del país será más fácil y rápido. Estas evaluaciones deben ser repetidas para validar la información.

Para complementar la información del espectro de acción antifúngica de los extractos obtenidos, éstos se evaluaron contra otros fitopatógenos aislados del campo, a partir de lesiones en cultivos de la región. En general, los resultados mostraron un espectro amplio de acción para los dos extractos de *F. incarnatum* (AR-8a y AR-8b), siendo capaces de inhibir el crecimiento de tres fitopatógenos pertenecientes a diferentes géneros (*Corynespora*, *Curvularia* y *Helminthosporium*), a una concentración de 1,000 µg/mL.

Con respecto a la evaluación insecticida, 94% de las cepas fúngicas demostraron la capacidad de inhibir el establecimiento de los áfidos *M. persicae* y/o *R. padi*, con un IE \geq 80%. Entre los más activos se detectaron al extracto metanólico de *C. rosea* frente a *M. persicae* (IE \geq 90%) y al de AcOEt de *G. murorum* contra ambos áfidos (IE > 90%). La evaluación a diferentes concentraciones (10, 5, 2 y 0.4 mg/mL) llevó a obtener la CL₅₀ y CL₉₀ de las dos cepas activas. En total se requirió 0.8 y 8.5 mg/mL del extracto metanólico de *C. rosea*, así como 1.5 y 11.7 mg/mL del extracto de AcOEt de *G. murorum* para inhibir el 50% y 90% del asentamiento de *M. persicae*, respectivamente. Contra *R. padi* se necesitaron concentraciones de 1.9 y 19.5 mg/mL (CL₅₀ y CL₉₀, respectivamente) del extracto de AcOEt de *G. murorum*. Por lo tanto, el extracto más recomendable para controlar a *M. persicae* sería el metanólico de *C. rosea* y para *R. padi*, el de AcOEt de *G.*

murorum con las concentraciones más bajas para obtener una buena inhibición del establecimiento de los áfidos.

El género *Fusarium* es reconocido como un saprófito facultativo; algunas de sus especies son reportadas como patógenas y muchas otras como grandes productoras de metabolitos secundarios bioactivos, con gran diversidad estructural. Los más conocidos son los tricocenos, derivados de la familia de los terpenos, la azanaftoquinona, benzopirona, ciclodepsipéptidos, depsipéptidos, fumonisina, pirona y la quinazolina, entre otros (Bräse *et al.*, 2009). En la Unidad de Biotecnología del CICY se han estudiado extractos de AcOEt de varias especies de *Fusarium*, incluyendo a *F. incarnatum* TZH23, aislado de hojarasca sumergida en un cenote y reportado con actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora* y *Staphylococcus aureus*; antifúngica contra *Alternaria tagetica*, *C. gloeosporioides*, *Phytium aphanidermatum* y la levadura *Candida albicans* (De la Rosa García, 2007); finalmente, también exhibió actividad contra *Leishmania mexicana* (IC₁₀₀ a 100 µg/mL) (Chi-Aguilar, 2008).

Por otra parte, el extracto metanólico de *C. rosea* TZH27 (AR-3b) se considera promisorio también para el control de los hongos fitopatógenos *C. cassiicola* ITC-03 y *Helminthosporium* sp. ITC-04 y el insecto *M. persicae*. Previamente, se han reportado sus propiedades nematocidas contra *M. incognita* con una CL₅₀ de 0.35 mg/mL y CL₉₅ de 25.08 mg/mL (Herrera, 2007). También se ha reportado su actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* y *Cladosporium resinae* (Lang *et al.*, 2006). Específicamente, la aplicación del micelio/esporas de *C. rosea* ha sido patentada para el control biológico de *B. cinerea* (Li *et al.*, 2006).

En relación a *G. murorum*, *Verticillium* sp. y las otras cepas fúngicas que mostraron actividad contra áfidos, la información recuperada sobre estudios de actividad biológica y de sus metabolitos secundarios es escasa. En cuanto a *G. murorum*, se encuentran reportes de la actividad antifúngica de los aceites esenciales del micelio contra la germinación de las esporas de *Magnaporthe oryzae* a una concentración de 0.84 mg/mL (Zhao *et al.*, 2009). También se han descrito sus propiedades antioxidantes y antibacterianas contra *B. subtilis*, *X. campestris* y *C. albicans* (Reyes Estebanez *et al.*,

2008; Reyes Estebanez, 2009). Entre los reportes del género *Verticillium* sp. se encuentra la actividad insecticida de los compuestos bassinólido, ácido dipicolínico y vertilecanina A (Figuras 30 y 35) contra *Helicoverpa zea* y *Calliphora erythrocephala* (Angawi *et al.*, 2003; Soman *et al.*, 2001); finalmente, también se ha reportado la actividad antibacteriana y antifúngica del ácido lowdénico frente a *Aspergillus flavus*, *S. aureus* y *B. subtilis* (Angawi *et al.*, 2003).

La búsqueda exhaustiva en bases de datos de patentes y de artículos de investigación se realizó sin encontrar reportes previos de la actividad antifúngica de la especie *F. incarnatum* contra *C. cassiicola*, *Curvularia* sp. y *Helminthosporium* sp., y la actividad insecticida contra *M. persicae* y *R. padi* de los extractos de *F. incarnatum*, *C. rosea* y *G. murorum*. Lo anterior permite concluir que este estudio complementa el conocimiento de las propiedades biológicas que se tienen de los extractos de *F. incarnatum* (AR-8a y AR-8b), *C. rosea* (AR-3b) y *G. murorum* (AR-9a).

Aun cuando existen reportes de la actividad antifúngica de *F. incarnatum* y *C. rosea*, se sabe que los hongos producen diversos metabolitos dependiendo de diversos factores bióticos y abióticos (Strohl, 2000). En los cultivos *ex situ* este metabolismo puede variar en gran medida con el origen de la cepa, el sustrato empleado, la temperatura y el ciclo de luz/oscuridad. Un ejemplo es el de *Emericella varicolor*, del cual se ha reportado una variedad de metabolitos secundarios con dependencia de su origen y manejo (Gamboa Angulo y De la Rosa García, 2008).

Debido a lo antes mencionado se considera importante continuar las investigaciones con las cepas de *F. incarnatum*, *C. rosea* y *G. murorum* para obtener los principios responsables de su actividad biológica, determinar la inocuidad de las mismas hacia los insectos benéficos, los mamíferos y el medio ambiente y, posteriormente, optimizar la producción de los extractos/principios activos a través de diferentes estrategias, tales como cambiar y/o modificar los medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Muy importante también será continuar las evaluaciones a nivel vivero y campo para determinar la efectividad de los mismos en estas condiciones.

Con las aportaciones del presente estudio se enriquece el conocimiento de las propiedades biológicas de la microbiota de las regiones tropicales del sureste de México, en particular, en la búsqueda de nuevos agentes insecticidas y fungicidas naturales, los cuales complementan las propiedades previamente reportadas. Estas son evidencias del potencial de aplicación de los metabolitos microbianos como productos biotecnológicos ecoamigables en el control de enfermedades y plagas en agricultura.

5.1 REFERENCIA

- Angawi-Rihab, F., C. Swenson Dale, B.J Gloer y T. Wicklow Donald (2003) Lowdenic acid: a new antifungal polyketide-derived metabolite from a new fungicolous *Verticillium* sp. *Journal of Natural Products*, 66, 1259-1262.
- Bräse, S., A. Encinas, J. Keck y C.F. Nising (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*, 109, 3903-3990.
- De la Rosa-García, S. (2007). Evaluación del potencial microbiano de microorganismos aislados de cenotes de la Península de Yucatán. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, 144-147 p.
- De la Fuente, J.A. (2007). Metabolitos antifúngicos producidos por hongos microscópicos de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, 66-68 p.
- Chi-Aguilar, W.R. (2008). Obtención de extractos fúngicos con propiedades antimicobacterianas y antiprotozoarias. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Bioquímico. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México. 25-30 p.
- Gamboa, M. M y S. De la Rosa-García (2008). Potencial Biológico y Creatividad Química de Hongos Microscópicos del Trópico Americano, En: Tópicos Selectos Sobre Diversidad, Ecología y Uso de los Hongos Microscópicos en Iberoamérica. Gabriela Heredia Abarca (ed). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) e Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver. México, pp. 251-272.
- Gloer, J.B. (2007). Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. En: *The Mycota IV*, 2nd Edition. C.P. Kubicek and I.S. Druzhinina (Eds.). Springer-Verlag, New York, pp. 257-283
- Herrera-Parra, E.A. (2007). Actividad nematostática de extractos fúngicos y vegetales contra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White.) Chitwood. Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura Tropical. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, 30 p.
- Lang, G., M.I. Mitova y G. Ellis (2006). Bioactivity profiling using HPLC/microtiter-plate analysis: application to a New Zealand marine alga-derived fungus, *Gliocladium* sp. *Journal of Natural Products*, 69, 621-624.

- Li, J., J. Yang, X. Huang, K.-Q. Zhang (2006). Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry*, 41, 925–929.
- Reyes-Estebanez, M.M.J. (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México. 171 p.
- Reyes-Estebanez, M.M.J., G. Heredia Abarca y M.M. Gamboa Angulo (2008). Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología*, 28, 49-56.
- Soman, A.G, J.B. Gloer, C.R. Angawi, D.T. Wicklow y D.F. Dowd (2001). Vertilecanin: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, 64, 189-192.
- Strohl, W.R. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, 5, 39-41.
- Zhao, J., T. Shan, Y. Huang, X. Liu, X. Gao, M. Wang, W. Jiang y L. Zhou (2009). Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the volatile oils from *Gliomastix murorum* and *Pichia guilliermondii*, two endophytic fungi in *Paris polyphylla var. yunnanensis*. *Natural Product Communications*, 4, 1491-1496.

ANEXOS

Anexo 1. Programa en Stargrafic del análisis de varianza de los extractos sobre *Corynespora cassicola*.

AR-10a	1	3.4
AR-10a	2	2.3
AR-10a	3	4.5
AR-10b	1	2.3
AR-10b	2	2.3
AR-10b	3	2.3
AR-1a	1	2.3
AR-1a	2	2.3
AR-1a	3	2.3
AR-1b	1	0.0
AR-1b	2	0.0
AR-1b	3	0.0
AR-2a	1	3.4
AR-2a	2	2.3
AR-2a	3	2.3
AR-2b	1	0.0
AR-2b	2	0.0
AR-2b	3	0.0
AR-3a	1	5.7
AR-3a	2	3.4
AR-3a	3	3.4
AR-3b	1	72.7
AR-3b	2	67.0
AR-3b	3	68.2
AR-4a	1	2.3
AR-4a	2	2.3
AR-4a	3	2.3
AR-4b	1	0.0
AR-4b	2	0.0
AR-4b	3	0.0
AR-5a	1	2.3
AR-5a	2	2.3
AR-5a	3	2.3
AR-5b	1	0.0
AR-5b	2	0.0

Continuación Anexo 1.

AR-5b	3	0.0
AR-6a	1	6.8
AR-6a	2	8.0
AR-6a	3	10.2
AR-6b	1	0.0
AR-6b	2	0.0
AR-6b	3	0.0
AR-7a	1	33.0
AR-7a	2	30.7
AR-7a	3	33.0
AR-7b	1	22.7
AR-7b	2	21.6
AR-7b	3	25.0
AR-8a	1	76.1
AR-8a	2	73.9
AR-8a	3	76.1
AR-8b	1	79.5
AR-8b	2	78.4
AR-8b	3	78.4
AR-9a	1	45.5
AR-9a	2	44.3
AR-9a	3	42.0
AR-9b	1	0.0
AR-9b	2	0.0
AR-9b	3	0.0
AR-11a	1	34.1
AR-11a	2	31.8
AR-11a	3	33.0
AR-11b	1	0.0
AR-11b	2	0.0
AR-11b	3	0.0
AR-12b	1	0.0
AR-12b	2	0.0
AR-12b	3	0.0
AR-13a	1	2.3
AR-13a	2	3.4
AR-13a	3	5.7
AR-13b	1	43.2
AR-13b	2	42.0
AR-13b	3	42.0

Continuación Anexo 1.

AR-14a	1	4.5
AR-14a	2	4.5
AR-14a	3	5.7
AR-15a	1	14.8
AR-15a	2	15.9
AR-15a	3	14.8
AR-16b	1	0.0
AR-16b	2	0.0
AR-16b	3	0.0
Mirage	1	100.0
Mirage	2	100.0
Mirage	3	100.0

Anexo 2. Programa en Stargrafic del análisis de varianza de los extractos sobre *Curvularia* sp.

AR-10a	1	2.3
AR-10a	2	3.4
AR-10a	3	2.3
AR-1a	1	2.3
AR-1a	2	2.3
AR-1a	3	2.3
AR-1b	1	0.0
AR-1b	2	0.0
AR-1b	3	0.0
AR-2a	1	2.3
AR-2a	2	2.3
AR-2a	3	2.3
AR-2b	1	10.2
AR-2b	2	9.1
AR-2b	3	5.7
AR-3a	1	2.3
AR-3a	2	2.3
AR-3a	3	2.3
AR-3b	1	81.8
AR-3b	2	81.8
AR-3b	3	81.8
AR-4a	1	4.5
AR-4a	2	3.4
AR-4a	3	4.5
AR-5a	1	2.3
AR-5a	2	2.3
AR-5a	3	2.3
AR-5b	1	0.0
AR-5b	2	0.0
AR-5b	3	0.0
AR-6a	1	2.3
AR-6a	2	3.4
AR-6a	3	2.3
AR-6b	1	8.0
AR-6b	2	8.0
AR-6b	3	6.8
AR-7a	1	23.9
AR-7a	2	22.7

Continuación Anexo 2

AR-7a	3	22.7
AR-7b	1	48.9
AR-7b	2	47.7
AR-7b	3	47.7
AR-8a	1	52.3
AR-8a	2	50.0
AR-8a	3	52.3
AR-8b	1	88.6
AR-8b	2	88.6
AR-8b	3	86.4
AR-9a	1	2.3
AR-9a	2	3.4
AR-9a	3	2.3
AR-9b	1	8.0
AR-9b	2	9.1
AR-9b	3	22.7
AR-11a	1	4.5
AR-11a	2	3.4
AR-11a	3	4.5
AR-11b	1	5.7
AR-11b	2	5.7
AR-11b	3	3.4
AR-13a	1	2.3
AR-13a	2	3.4
AR-13a	3	5.7
AR-14a	1	4.5
AR-14a	2	3.4
AR-14a	3	4.5
AR-15a	1	11.4
AR-15a	2	11.4
AR-15a	3	12.5
AR-16b	1	0.0
AR-16b	2	0.0
AR-16b	3	0.0
Marige	1	100.0
Mirage	2	100.0
Mirage	3	100.0

Anexo 3. Programa en Stargrafic del análisis de variança de los extractos sobre *Helminthosporium* sp.

AR-10a	1	3.4
AR-10a	2	4.5
AR-10a	3	5.7
AR-10b	1	18.2
AR-10b	2	13.6
AR-10b	3	14.8
AR-1a	1	2.3
AR-1a	2	3.4
AR-1a	3	2.3
AR-1b	1	0.0
AR-1b	2	0.0
AR-1b	3	0.0
AR-2a	1	6.8
AR-2a	2	5.7
AR-2a	3	4.5
AR-2b	1	0.0
AR-2b	2	0.0
AR-2b	3	0.0
AR-3a	1	5.7
AR-3a	2	4.5
AR-3a	3	5.7
AR-3b	1	71.6
AR-3b	2	55.7
AR-3b	3	69.3
AR-4a	1	2.3
AR-4a	2	3.4
AR-4a	3	2.3
AR-4b	1	11.4
AR-4b	2	11.4
AR-4b	3	14.8
AR-5a	1	6.8
AR-5a	2	6.8
AR-5a	3	5.7
AR-5b	1	0.0
AR-5b	2	0.0
AR-5b	3	0.0
AR-6a	1	4.5

Continuación del Anexo 3.

AR-6a	2	4.5
AR-6a	3	5.7
AR-6b	1	0.0
AR-6b	2	0.0
AR-6b	3	0.0
AR-7a	1	33.0
AR-7a	2	35.2
AR-7a	3	35.2
AR-7b	1	11.4
AR-7b	2	11.4
AR-7b	3	8.0
AR-8a	1	73.9
AR-8a	2	77.3
AR-8a	3	75.0
AR-8b	1	67.0
AR-8b	2	65.9
AR-8b	3	64.8
AR-9a	1	43.2
AR-9a	2	42.0
AR-9a	3	40.9
AR-9b	1	0.0
AR-9b	2	0.0
AR-9b	3	0.0
AR-11a	1	25.0
AR-11a	2	27.3
AR-11a	3	28.4
AR-11b	1	0.0
AR-11b	2	0.0
AR-11b	3	0.0
AR-12b	1	16.0
AR-12b	2	16.0
AR-12b	3	22.7
AR-13a	1	2.3
AR-13a	2	2.3
AR-13a	3	2.3
AR-13b	1	63.6
AR-13b	2	62.5
AR-13b	3	61.4
AR-14a	1	3.4
AR-14a	2	2.3

Continuación del Anexo 3.

AR-14a	3	2.3
AR-15a	1	13.6
AR-15a	2	15.9
AR-15a	3	14.8
AR-16b	1	0.0
AR-16b	2	0.0
AR-16b	3	0.0
Mirage	1	100.0
Mirage	2	100.0
Mirage	3	100.0

Anexo 4. Porcentaje de inhibición del establecimiento contra los áfidos *M. persicae* y *R. padi*.

Cepa fungica	Clave extracto	<i>Myzus persicae</i> 100 µg/por disco			<i>Rophalosiphum padi</i> 100 µg/ml por disco		
		%C	%T	%IE	%C	%T	%IE
<i>Acremonium</i> sp. XHH4A	AR-10a	78.8 ± 3.9	21.2 ± 3.9	67.5 ± 7.4	82.5 ± 3.1	17.5 ± 3.1	75.3 ± 5.0
	AR-10b	89.5 ± 2.7	10.8 ± 2.7	85.2 ± 3.9	83.0 ± 2.9	17.0 ± 2.9	76.02 ± 4.6
<i>Beltraniella portoricensis</i> MRH42	AR-1a	92.5 ± 1.5	7.5 ± 1.5	90.6 ± 2	78.8 ± 4.2	21.2 ± 4.2	68.7 ± 7.0
	AR-1b	83.3 ± 3.7	16.74 ± 3.7	74.5 ± 6.5	81.9 ± 2.5	18.1 ± 2.5	75.7 ± 3.9
<i>Cladosporium cladosporioides</i> XHH1E	AR-2a	64.9 ± 4.0	35.1 ± 4.03	45.1 ± 7.0	77.5 ± 2.7	22.5 ± 2.7	67.5 ± 5.3
	AR-2b	83.9 ± 3.0	16.2 ± 3.0	77.4 ± 4.9	81.6 ± 3.3	18.4 ± 3.3	73.5 ± 5.2
<i>Clonostachys rosea</i> TZH27	AR-3a	83.5 ± 2.5	16.5 ± 2.5	78.2 ± 3.7	69.4 ± 3.4	30.6 ± 3.4	51.4 ± 6.9
	AR-3b	94.4 ± 1.2	5.7 ± 1.2	93.3 ± 1.4	86.6 ± 2.0	13.4 ± 2.0	81.5 ± 3.3
<i>Corynespora cassicola</i> MRH1	AR-4a	76.5 ± 2.8	23.5 ± 2.8	65.7 ± 5.3	68.8 ± 3.1	31.3 ± 3.1	50.4 ± 6.7
	AR-4b	92.2 ± 1.7	7.8 ± 1.7	90.84 ± 2.0	79.6 ± 2.5	20.5 ± 2.5	72.0 ± 3.9
<i>Cylindrium elongatum</i> MRH45	AR-5a	76.7 ± 4.5	23.3 ± 4.5	65.0 ± 7.7	66.1 ± 4.0	33.9 ± 4.1	44.5 ± 7.7
	AR-5b	73.2 ± 3.1	26.8 ± 3.1	58.1 ± 6.6	75.8 ± 3.5	24.2 ± 3.5	62.6 ± 6.1
<i>Cylindrocarpon congoense</i> XHH8A	AR-6a	74.1 ± 4.2	25.9 ± 4.2	56.2 ± 8.3	76.6 ± 2.7	23.4 ± 2.7	66.3 ± 4.9
	AR-6b	84.6 ± 2.5	15.4 ± 2.5	77.5 ± 4.2	83.1 ± 4.0	16.9 ± 4.0	76.0 ± 6.3
<i>Fusarium</i> sp. TZA54	AR-7a	71.3 ± 2.9	28.7 ± 2.9	55.3 ± 6.0	75.1 ± 3.7	24.90 ± 3.7	61.6 ± 7.2
	AR-7b	80.3 ± 2.3	19.7 ± 2.3	73.4 ± 3.9	77.0 ± 2.7	23.0 ± 2.7	63.2 ± 4.9

Continuación del Anexo 4.

Cepa fungica	Clave extracto	<i>Myzus persicae</i> 100 µg/por disco			<i>Rophalosiphum padi</i> 100 µg/ml por disco		
		%C	%T	%IE	%C	%T	%IE
<i>Fusarium incarnatum</i> TZH23	AR-8a	82.6 ± 2.8	17.4 ± 2.8	75.9 ± 4.8	76.6 ± 4.1	23.4 ± 4.2	63.5 ± 7.6
	AR8b	83.7 ± 2.6	16.3 ± 2.6	75.9 ± 4.5	81.5 ± 2.5	18.5 ± 2.5	72.3 ± 4.2
<i>Gliomastix murorum</i> MRH36	AR-9a	93.66 ± 1.68	6.34 ± 1.68	91.7 ± 2.6	93.5 ± 1.3	6.5 ± 1.3	92.1 ± 1.7
	AR-9b	76.8 ± 2.7	23.2 ± 2.7	66.9 ± 4.5	84.5 ± 4.0	15.5 ± 4.0	74.4 ± 6.6
<i>Perelegomyces parviechinulatus</i> GHH25	AR-11a	87.3 ± 3.0	12.7 ± 3.0	82.3 ± 4.9	81.3 ± 3.4	18.7 ± 3.4	72.5 ± 5.8
	AR-11b	77.4 ± 3.4	22.6 ± 3.4	65.2 ± 6.8	86.1 ± 5.2	13.9 ± 5.2	77.7 ± 8.8
<i>Phaeobotrys</i> sp. GHH14	AR-12a	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	AR-12b	84.7 ± 2.4	15.4 ± 2.4	78.9 ± 3.6	54.9 ± 4.1	45.1 ± 4.1	28.5 ± 6.6
<i>Phialophora verrucosa</i> MRH54	AR-13a	66.8 ± 4.7	33.2 ± 4.7	49.1 ± 7.6	67.4 ± 3.4	32.6 ± 3.4	48.3 ± 6.9
	AR-13b	90.7 ± 1.8	9.3 ± 1.8	88.9 ± 2.3	68.0 ± 4.3	32.0 ± 4.3	48.7 ± 7.8
<i>Sibirina</i> sp. MRH52	AR-14a	77.3 ± 4.9	22.7 ± 4.9	64.7 ± 8.6	71.6 ± 5.8	21.1 ± 2.4	64.1 ± 6.7
	AR-14b	90.1 ± 2.7	10.0 ± 2.7	87.5 ± 3.9	82.4 ± 4.5	17.6 ± 4.5	72.5 ± 8.1
<i>Verticillium</i> sp. TZH28	AR-15a	95.0 ± 1.1	5.0 ± 1.1	93.7 ± 1.3	81.0 ± 3.8	19.0 ± 3.8	71.9 ± 6.8
<i>Volutella</i> sp. TZH22	AR-15b	83.9 ± 4.6	16.1 ± 4.6	75.0 ± 8.0	66.4 ± 5.6	33.6 ± 5.6	47.7 ± 9.0
	AR-16a	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	AR-16b	83.6 ± 3.9	16.4 ± 3.9	74.4 ± 7.6	68.5 ± 4.4	31.5 ± 4.4	49.3 ± 7.8
Arroz fermentado (AF)	AF-AcOEt	63.6 ± 5.14	36.4 ± 5.1	43.0 ± 8.2	68.8 ± 3.2	31.2 ± 3.2	48.4 ± 7.3
	AF-MeOH	64.8 ± 3.6	35.2 ± 3.6	46.5 ± 5.8	54.7 ± 1.9	45.3 ± 1.9	18.5 ± 4.7

Anexo 5. Porcentaje de inhibición del establecimiento contra los áfidos a diferentes concentraciones.

Clave cepa	Clave extracto	Concentración	<i>Myzus persicae</i>			<i>Rophalosiphum padi</i>		
			%C	%T	%IE	%C	%T	%IE
<i>Acremonium</i> sp.	AR-10b	20 mg/ml				90.87 ± 2.03	9.1 ± 2.0	88.8 ± 2.7
		10 mg/ml				82.8 ± 2.9	17.20 ± 2.92	75.7 ± 4.6
		5 mg/ml				78.3 ± 3.4	21.7 ± 3.4	67.4 ± 6.1
<i>Beltraniella portoricensis</i> MRH41	AR-1a	20 mg/ml	88.2 ± 1.2	11.8 ± 1.2	85.6 ± 2.5			
		10 mg/ml	92.5 ± 1.5	7.5 ± 1.5	90.6 ± 2.0			
		5 mg/ml	67.6 ± 3.2	32.4 ± 3.2	50.4 ± 6.3			
		2 mg/ml	60.0 ± 4.3	40.0 ± 4.3	34.8 ± 7.7			
<i>Clonostachys rosea</i> TZH27	AR-3b	20 mg/ml	96.7 ± 2.1	3.3 ± 2.1	95.1 ± 3.4	87.9 ± 2.1	12.1 ± 2.1	84.6 ± 2.9
		10 mg/ml	94.4 ± 1.2	5.7 ± 1.2	93.3 ± 1.4	86.6 ± 2.0	13.4 ± 2.0	81.5 ± 3.3
		5 mg/ml	88.0 ± 3.5	12.0 ± 3.5	83.8 ± 5.4	72.2 ± 4.0	27.8 ± 4.0	54.3 ± 7.9
		2 mg/ml	79.5 ± 3.8	20.5 ± 3.8	70.0 ± 6.5			
		0.4 mg/ml	57.7 ± 4.6	42.3 ± 4.6	33.7 ± 7.2			

%C: porcentaje del control; %T: porcentaje del tratamiento; %IE: porcentaje de la inhibición del establecimiento

Continuación del Anexo 5.

Clave cepa	Clave extracto	Concentración	<i>Myzus persicae</i>			<i>Rophalosiphum padi</i>		
			%C	%T	%E	%C	%T	%E
<i>Gliomastix murorum</i> MRH36	AR-9a	20 mg/ml	96.8 ± 1.6	3.2 ± 1.6	96.0 ± 2.0	92.6 ± 2.0	7.4 ± 2.0	91.0 ± 2.5
		10 mg/ml	93.7 ± 1.7	6.3 ± 1.7	91.7 ± 2.5	93.3 ± 1.3	6.7 ± 1.3	91.9 ± 1.7
		5 mg/ml	82.0 ± 2.9	18.0 ± 2.9	74.6 ± 5.3	77.3 ± 3.7	22.7 ± 3.7	66.6 ± 6.5
		2 mg/ml	68.3 ± 4.5	31.7 ± 4.5	50.9 ± 7.7	60.7 ± 2.7	39.3 ± 2.7	34.3 ± 5.6
		0.4 mg/ml	49.2 ± 6.2	50.8 ± 6.2	22.6 ± 8.7	57.5 ± 2.2	42.5 ± 2.2	26.5 ± 5.2
<i>Verticillium</i> sp.	TZH28	10 mg/ml	95.0 ± 1.1	5.03 ± 1.06	93.7 ± 1.3			
		2 mg/ml	70.34 ± 5.0	29.7 ± 5.0	53.6 ± 8.4			
		0.4 mg/ml	63.5 ± 4.3	36.5 ± 4.3	41.6 ± 7.4			

Anexo 6. Programa en Stargrafic del análisis de varianza de los extractos sobre *Spodoptera littoralis*.

AR-10a	1	26.6
AR-10a	2	0.0
AR-10a	3	0.0
AR-10a	4	0.0
AR-10a	5	0.0
AR-10a	6	0.0
AR-10b	1	30.6
AR-10b	2	95.7
AR-10b	3	46.4
AR-10b	4	45.2
AR-10b	5	0.0
AR-10b	6	42.6
AR-1a	1	100.0
AR-1a	2	98.9
AR-1a	3	41.5
AR-1a	4	44.2
AR-1a	5	0.0
AR-1b	1	30.8
AR-1b	2	38.1
AR-1b	3	0.0
AR-1b	4	34.5
AR-1b	5	0.0
AR-1b	6	0.0
AR-2a	1	98.4
AR-2a	2	0.0
AR-2a	3	0.0
AR-2a	4	0.0
AR-2a	5	0.0
AR-2a	6	22.6
AR-2b	1	0.0
AR-2b	2	94.9
AR-2b	3	100.0
AR-2b	4	41.3
AR-2b	5	0.0
AR-2b	6	27.7
AR-3a	1	0.0

Continuación del Anexo 6.

AR-3a	2	0.0
AR-3a	3	16.1
AR-3a	4	18.9
AR-3a	5	0.0
AR-3a	6	0.0
AR-3b	1	82.9
AR-3b	2	98.0
AR-3b	3	33.7
AR-3b	4	68.0
AR-3b	5	2.1
AR-3b	6	0.0
AR-4a	1	0.0
AR-4a	2	42.0
AR-4a	3	0.0
AR-4a	4	28.6
AR-4a	5	100.0
AR-4a	6	0.0
AR-4b	1	98.9
AR-4b	2	0.0
AR-4b	3	0.0
AR-4b	4	20.6
AR-4b	5	40.0
AR-4b	6	43.4
AR-5a	1	59.8
AR-5a	2	100.0
AR-5a	3	26.6
AR-5a	4	0.0
AR-5a	5	32.6
AR-5b	1	0.0
AR-5b	2	29.8
AR-5b	3	0.0
AR-5b	4	0.0
AR-5b	5	43.8
AR-5b	6	0.0
AR-6a	1	22.1
AR-6a	2	0.0
AR-6a	3	26.3
AR-6a	4	0.0
AR-6a	5	103.1
AR-6a	6	100.0

Continuación del Anexo 6.

AR-6b	1	77.1
AR-6b	2	90.2
AR-6b	3	29.3
AR-6b	4	0.0
AR-6b	5	22.7
AR-6b	6	100.0
AR-7a	1	0.0
AR-7a	2	0.0
AR-7a	3	39.0
AR-7a	4	0.0
AR-7a	5	39.8
AR-7a	6	0.0
AR-7b	1	0.0
AR-7b	2	0.0
AR-7b	3	12.3
AR-7b	4	0.0
AR-7b	5	36.4
AR-7b	6	48.1
AR-8a	1	35.2
AR-8a	2	0.0
AR-8a	3	0.0
AR-8a	4	0.0
AR-8a	5	17.5
AR-8a	6	22.4
AR-8b	1	38.8
AR-8b	2	0.0
AR-8b	3	0.0
AR-8b	4	0.0
AR-8b	5	74.1
AR-8b	6	52.5
AR-9a	1	0.0
AR-9a	2	30.5
AR-9a	3	57.9
AR-9a	4	0.0
AR-9a	5	0.0
AR-9a	6	35.1
AR-9b	1	0.0
AR-9b	2	54.8
AR-9b	3	41.7
AR-9b	4	43.6

Continuación Anexo 6.

AR-9b	5	0.0
AR-9b	6	0.0
AR-11a	1	0.0
AR-11a	2	0.0
AR-11a	3	14.8
AR-11a	4	0.0
AR-11a	5	48.5
AR-11a	6	45.3
AR-11b	1	0.0
AR-11b	2	0.0
AR-11b	3	30.7
AR-11b	4	32.4
AR-11b	5	20.5
AR-11b	6	0.0
AR-12b	1	0.0
AR-12b	2	0.0
AR-12b	3	0.0
AR-12b	4	0.0
AR-12b	5	0.0
AR-12b	6	0.0
AR-13a	1	46.4
AR-13a	2	25.0
AR-13a	3	0.0
AR-13a	4	0.0
AR-13a	5	40.8
AR-13a	6	14.0
AR-13b	1	0.0
AR-13b	2	0.0
AR-13b	3	24.6
AR-13b	4	21.1
AR-13b	5	0.0
AR-13b	6	0.0
AR-14a	1	30.3
AR-14a	2	39.6
AR-14a	3	45.4
AR-14a	4	0.0
AR-14a	5	0.0
AR-14a	6	0.0
AR-14b	1	0.0
AR-14b	2	0.0

Continuación Anexo 6.

AR-14b	3	0.0
AR-14b	4	0.0
AR-14b	5	0.0
AR-14b	6	0.0
AR-15a	1	0.0
AR-15a	2	45.0
AR-15a	3	0.0
AR-15a	4	32.9
AR-15a	5	74.1
AR-15a	6	0.0
AR-15b	1	41.9
AR-15b	2	32.4
AR-15b	3	83.9
AR-15b	4	38.5
AR-15b	5	99.5
AR-15b	6	71.9
AR-16b	1	0.0
AR-16b	2	0.0
AR-16b	3	0.0
AR-16b	4	75.6
AR-16b	5	39.8
AR-16b	6	0.0
AF-AcOEt	1	0.0
AF-AcOEt	2	19.1
AF-AcOEt	3	46.0
AF-AcOEt	4	47.2
AF-AcOEt	5	0.0
AF-AcOEt	6	50.7
AF-MeOH	1	0.0
AF-MeOH	2	0.0
AF-MeOH	3	30.5
AF-MeOH	4	32.2
AF-MeOH	5	20.4
AF-MeOH	6	0.0