



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS FÚNGICOS
CONTRA *MELOIDOGYNE INCOGNITA* (KOFOID &
WHITE) CHITWOOD Y ESTABLECIMIENTO DE
BIOENSAYOS DE INOCUIDAD.**

Tesis que presenta

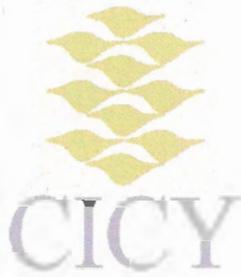
ABRIL JESÚS DÍAZ BRAGA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán., Marzo del 2012





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado Evaluación de extractos fúngicos contra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood y establecimiento de bioensayos de inocuidad fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del (los) Dra. María Marcela Gamboa Angulo y Dr. Jairo Cristobal Alejo, dentro de la Opción Biología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

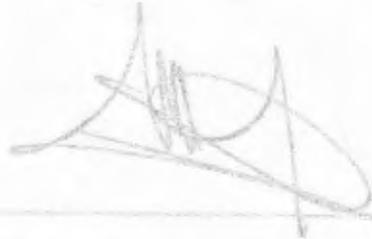
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado Evaluación de extractos fitoquímicos contra *Meloidoxyna immanis* (Köhlér & Wirth) Chitwood y establecimiento de bioensayos de toxicidad fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del (los) Dr. María Marín Gamboa Angulo y Dr. Jaime Cristóbal Aljau, dentro de la Unidad Biológica, perteneciente al Programa de Investigación en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México; a 8 de Marzo de 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:



Nombre: Abril Jesús Díaz Braga

DEDICATORIA

A mi madre, Teresita Braga, por todo su apoyo, amor y dedicación, porque sin ella no estaría aquí.

Para mi hijo, Gustavo Valle Díaz, que es el motor de mi vida y mi motivación para salir adelante.

A Raúl Valle, por darme la dicha de ser madre y por todo su apoyo en este transcurso.

AGRADECIMIENTOS

- A mis directores de tesis: Dra. Maria Marcela Gamboa Angulo y Dr., Jairo Cristobal Alejo por haberme aceptado y asesorado, por sus observaciones, sugerencias y comentario que sirvieron para la elaboración de esta tesis.
- A mi comité revisor formado por la Dra. Roció de Lourdes Borjes Argáez, Dr. Javier Mijangos Cortes y Dr. Esaú Ruíz Sánchez por sus observaciones y sugerencias que ayudaron a enriquecer este documento.
- A la Q.I Irma Leticia Medina Baizabal por su apoyo técnico en el laboratorio, a I. A. Fernando Contreras Marín y M. en C. Eduardo Balam Uc por su apoyo técnico en los viveros.
- Al Lic. Sergio Pérez y Narcedalia Gamboa por su apoyo técnico en las búsquedas bibliográficas.
- A mis mejores amigos de laboratorio: Andrés Uc, Edgar Caamal, Carlos Quintal, Arely Vargas, Ana Lilia Ruíz, Nacho Hernandez, Angel Cruz y Jesús Yam. Por sus consejos y sobretodo por su amistad, muchas gracias.
- El trabajo fue financiado por el proyecto Conacyt “Adiciones al estudio de hongos microscópicos tropicales con potencial biotecnológico en farmacia y agricultura (Proyecto No. 2009/CB131256)”.
- A la Unidad de Biotecnología por las instalaciones proporcionadas para realizar el trabajo experimental y los cursos impartidos.
- Al CONACYT por el apoyo otorgado por medio de la beca No. 236001.

Contenido

Contenido	i
Índice de cuadro	iv
Índice de figuras.....	v
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPITULO I	
ANTECEDENTES GENERALES	7
1.1 NEMATODOS FITOPARÁSITOS	7
1.2 GENERO <i>Meloidogyne</i>	7
1.3 DISTRIBUCIÓN DE <i>Meloidogyne</i> spp. EN LA REPÚBLICA MEXICANA	9
1.4 NEMATODO AGALLADOR <i>Meloidogyne incognita</i>	9
1.4.1 PARASITISMO DE <i>Meloidogyne incognita</i>	9
1.4.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>Meloidogyne incognita</i>	11
1.4.3 SÍNTOMAS OCASIONADOS POR <i>Meloidogyne incognita</i>	12
1.5 MÉTODOS DE CONTROL DE FITONEMATODOS	12
1.5.1 CONTROL QUÍMICO	14
1.5.2 BIOPLAGUICIDAS MICROBIANOS	15
1.6 EXTRACTOS SELECCIONADOS DE HONGOS MICROSCÓPICOS.....	19
1.6.1 <i>Clonostachys rosea</i> SCHROERS, SAMUELS, SIEFERT & GAMS	22
1.7 EVALUACIONES DE RIESGO EN EL AMBIENTE.....	25
1.8 OBJETIVOS.....	26
1.8.1 OBJETIVO GENERAL	26
1.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
1.10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

CAPITULO II

CULTIVO Y EXTRACCIÓN ORGÁNICA DE <i>Clonostachys rosea</i>	37
2.1 INTRODUCCIÓN	37
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.2.1 <i>Clonostachys rosea</i>	38
2.2.2 ACTIVACIÓN DE <i>Clonostachys rosea</i>	38
2.2.3 SUSPENSIÓN DE ESPORAS (INOCULANTE)	38
2.2.4 MEDIOS PARA EL CULTIVO DE <i>Clonostachys rosea</i>	39
2.2.5 EXTRACCIÓN ORGÁNICA DE <i>Clonostachys rosea</i>	40
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
2.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

CAPITULO III

EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE EXTRACTOS FÚNGICOS CONTRA J ₂ DE <i>Meloidogyne incognita</i>	47
3.1 INTRODUCCIÓN	47
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.2.1 OBTENCIÓN DE J ₂ DE <i>Meloidogyne incognita</i>	49
3.2.2 IDENTIFICACIÓN DE <i>Meloidogyne incognita</i>	49
3.2.3 BIOENSAYO <i>IN VITRO</i> PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE EXTRACTOS FÚNGICOS	50
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.3.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA ESPECIE <i>M. incognita</i>	51
3.3.2 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE <i>C. rosea</i>	52
3.3.3 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE EXTRACTOS DE DISTINTAS CEPAS FUNGICAS	55
3.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

CAPITULO IV

ESTABLECIMIENTOS DE DOS ENSAYOS DE INOCUIDAD Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES CON PROPIEDADES PLAGUICIDAS.....	63
4.1 INTRODUCCIÓN.....	63
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
4.2.1 BIOENSAYO DE FITOTOXICIDAD EN LECHUGA Y TOMATE	66
4.2.2 BIOENSAYO DE EXTRACTOS ORGÁNICOS EN LOMBRIZ DE TIERRA (<i>Eisenia fetida</i>).....	67
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.3.1 EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS EN LECHUGA.....	71
4.3.2 EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS EN TOMATE	77
4.3.3 EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS CON LOMBRIZ DE TIERRA (<i>Eisenia fetida</i>).....	83
4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

CAPITULO V

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	93
5.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	93
5.2 CONCLUSIONES GENERALES	95
5.3 PERSPECTIVAS	97
5.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

Índice de cuadro

Cuadro 1.1. Productos naturales de origen microbiano que se encuentran patentados para el control de plagas y enfermedades en plantas.....	17
Cuadro 1.2. Productos naturales de origen fúngico reportados con actividad biológica contra fitonematodos.. ..	19
Cuadro 1.3. Actividad biológica reportada de las cepas fúngicas seleccionadas ..	21
Cuadro 1.4. Estudios de aplicaciones reportadas para <i>Clonostachys rosea</i>	23
Cuadro 1.5. Estudios realizados de la cepa <i>C. rosea</i> TH27 aislada del cenote Temozón de la Península de Yucatán.. ..	25
Cuadro 2.1. Rendimiento de los extractos orgánicos del hongo <i>C. rosea</i> cultivado en arroz fermentado (400 g).. ..	42
Cuadro 2.2. Rendimientos de extractos orgánicos de <i>C. rosea</i> cultivada en Czapek Dox-Extracto de levadura (CDL, 1.5 L).. ..	43
Cuadro 3.1. Extractos de diferentes cepas fúngicas evaluados <i>in vitro</i> contra J ₂ de <i>M. incognita</i>	48
Cuadro 3.2. Productos y extractos naturales provenientes de cepas fúngicas con actividad nematicida contra J ₂ de <i>Meloidogyne incognita</i>	58
Cuadro 4.1. Clave de identificación de extractos orgánicos seleccionados para evaluar contra organismos benéficos para pruebas de inocuidad.	65
Cuadro 4.2. Extractos orgánicos con actividad plaguicida promisorio contra varios organismo blanco.....	70
Cuadro 4.3. Productos naturales provenientes de plantas con actividad fitotóxica en Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>).....	75
Cuadro 4.4. Productos naturales provenientes de plantas con actividad fitotoxica en Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).. ..	81
Cuadro 4.5. Productos naturales y sintéticos evaluados en lombrices de tierra mediante pruebas de toxicidad para medir riesgo ambiental.....	87

Índice de figuras

Figura 1.1. El nematodo agallador <i>Meloidogyne incognita</i> : a) Juveniles infecciosos del segundo estadio. Bar= 100 µm; b) Hembras disecadas de tejido de raíz. Bar= 500 µm. H= cabeza; c) Típicas agallas, síntomas en raíz de tomate.....	7
Figura 1.2. Micrografías de luz de alta amplificación de tejido de raíz de garbanzo: A) no infectados o infectados por aislamientos de <i>Meloidogyne artiellia</i> , B) <i>Ma-I</i> , C) <i>Ma-SI</i> , D) <i>Ma-S2</i> , E) <i>Ma-S3</i> , F, <i>Ma-Sy</i> ; G) <i>M. arenaria</i> ; H) <i>M. incognita</i> ; o I) <i>M. javanica</i> . A) Las flechas indican elementos del protoxilema y las células del floema y parénquima. H) El círculo señala a las células gigantes. N= Nematodo hembra adulta	10
Figura 1.3. Ciclo de vida parasitaria de <i>Meloidogyne incognita</i>	11
Figura 1.4. Métodos de control integral de nematodos fitoparásitos y sus características generales bióticas y abióticas	13
Figura 1.5. Estructuras químicas de algunos compuestos halogenados utilizados como nematicidas: a) Bromuro de metilo; b) Cloropicrina; c) Dibromuro de etileno; d) Isotiocianato.....	14
Figura 1.6. Estructuras químicas de algunos organofosforados y carbamatos utilizados como nematicidas: a) Etoprofos; b) Fenamifos; c) Carbofurano; d) Aldicarb; e) Oxamil.....	15
Figura 1.7. Fotomicrografías de <i>Clonostachys rosea</i> Grupo C, cepa TC 1304: A) Conidios de conidióforos secundarios; B) Conidióforos secundarios de medio OA; C) Conidios de medio OA; D) Masa de conidios de un conidióforo secundario; E) Fialides; F) Conidióforos secundarios de medio LcA; G) Conidios de medio LcA .	22
Figura 1.8. Metabolitos de <i>Clonostachys rosea</i> : Verticilinas tipo epipolisulfanildioxopiperazinas, gliocladina A (1), B (2), C (3), D (4) y E (5), y verticilina A (6), 11'-deoxiverticilina A (7), Sch52900 (8) y Sch52091 (9)	24
Figura 1.9. Estrategia experimental para la evaluación de extractos orgánicos	27
Figura 2.1. Esporas de <i>Clonostachys rosea</i> liofilizadas.....	38
Figura 2.2. A) Desprendimiento de esporas; B) Suspensión de esporas; C) Cámara de Neubauer	39

Figura 2.3. Estrategia experimental para la obtención de los extractos orgánicos de <i>Clonostachys rosea</i> para la evaluación <i>in vitro</i> contra J ₂ de <i>Meloidogyne incognita</i>	41
Figura 2.4. Extractos orgánicos de <i>Clonostachys rosea</i>	42
Figura 3.1. Corte perineal de una hembra de <i>M. incognita</i>	51
Figura 3.2. Macho de <i>M. incognita</i> : A) región de la cabeza; B) región de la cola ..	52
Figura 3.3. Efecto nematocida de los extractos de <i>Clonostachys rosea</i> evaluados contra J ₂ de <i>M. incognita</i> a las 48 horas de exposición. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05).....	54
Figura 3.4. Ejemplo de la evaluación de uno de los extractos A) AR-3A sin actividad nematocida; B) Control positivo (Vydate); C) Control negativo (DMSO-Tween 20%).....	54
Figura 3.5. Efecto nematocida a las 48 horas de extractos fúngicos evaluados contra J ₂ de <i>M. incognita</i> . Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05)	55
Figura 3.6. Evaluaciones de los extractos fúngicos sin actividad Nematocida: A) <i>Volutella</i> sp. TH22 (SRH-61); B) 2TS9 (SRH-60); C) Ligera inmovilidad de J ₂ de <i>M. incognita</i> por el extracto de <i>Verticillium</i> sp. TH8 (SRH-53).....	56
Figura 4.1. Bioensayo de fitotoxicidad de extractos orgánicos en lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) y tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	67
Figura 4.2. Bioensayo de inocuidad de extractos orgánicos con lombriz de tierra (<i>Eisenia fetida</i>).....	69
Figura 4.3. Efecto fitotóxico de extractos orgánicos sobre el porcentaje de germinación en lechuga. CCR: <i>Croton chichenesis</i> ; EWH: <i>Eugenia winzerlingii</i> ; ACR: <i>Acalypha gaumeri</i> ; AR-3A: <i>Clonostachys rosea</i> (AcOEt); AR-3B: <i>Clonostachys rosea</i> (MeOH); AR-9A: <i>Gliomastrix murorum</i> (AcOEt); AR-9B: <i>Gliomastrix murorum</i> (MeOH); AF-Ac: Arroz fermentado (AcOEt); AF-Me: Arroz fermentado (MeOH); DCRM-5B: Mezcla de Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05)	72

- Figura 4.4. Efecto en el crecimiento radicular por la exposición de extractos orgánicos en lechuga a) Control negativo MeOH + Agua; b) extracto CCR; c) ACR; d) EWH; e) Control positivo 2,4-D y f) Control positivo natural DCRM-5B 73
- Figura 4.5. Efecto fitotóxico de extractos orgánicos sobre el porcentaje de crecimiento radicular en lechuga: CCR: *Croton chichensis*; EWH: *Eugenia winzerlingii*; ACR: *Acalypha gaumeri*; AR-3A: *Clonostachys rosea* (AcOEt); AR-3B: *Clonostachys rosea* (MeOH); AR-9A: *Gliomastrix murorum* (AcOEt); AR-9B: *Gliomastrix murorum* (MeOH); AF-Ac: Arroz fermentado (AcOEt); AF-Me: Arroz fermentado (MeOH); DCRM-5B: Mezcla de Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05) 73
- Figura 4.6. Estructura química del sesquiterpeno p-benzoquinona (Perezona) aislado de *Perezia adnata* var. *alamani* (Asteraceae) y sus derivados 77
- Figura 4.7. Efecto fitotóxico de extractos orgánicos sobre el porcentaje de germinación en tomate: CCR: *Croton chichensis*; EWH: *Eugenia winzerlingii*; ACR: *Acalypha gaumeri*; AR-3A: *Clonostachys rosea* (AcOEt); AR-3B: *Clonostachys rosea* (MeOH); AR-9A: *Gliomastrix murorum* (AcOEt); AR-9B: *Gliomastrix murorum* (MeOH); AF-Ac: Arroz fermentado (AcOEt); AF-Me: Arroz fermentado (MeOH); DCRM-5B: Mezcla de Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05) 78
- Figura 4.8. Efecto en el crecimiento radicular por la exposición de extractos orgánicos en tomate a) Control positivo 2,4-D; b) Control negativo MeOH + H₂O c) extracto EWH; d) AR-3B; e) AR-3A; f) ACR y g) CCR 79
- Figura 4.9. Efecto tóxico de extractos orgánicos sobre el porcentaje de crecimiento radicular en tomate: CCR: *Croton chichensis*; EWH: *Eugenia winzerlingii*; ACR: *Acalypha gaumeri*; AR-3A: *Clonostachys rosea* (AcOEt); AR-3B: *Clonostachys rosea* (MeOH); AR-9A: *Gliomastrix murorum* (AcOEt); AR-9B: *Gliomastrix murorum* (MeOH); AF-Ac: Arroz fermentado (AcOEt); AF-Me: Arroz fermentado (MeOH); DCRM-5B: Mezcla de Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05) 80

Figura 4.10. Efecto tóxico de extractos orgánicos en *Eisenia fetida*: BFT: *Bonellia flamea*; EWH: *E. winzerlingii*; AR-8A: *F. incarnatum* (AcOEt); AR-8B: *F. incarnatum* (MeOH); DCRM-5B: Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05)83

Figura 4.11. Pruebas de inocuidad de extractos orgánicos contra *Eisenia fetida*: A) Control negativo (Agua); B) Control positivo (Vydate); C) DCRM-5B (bergapteno y xantotoxina); D) BFT; E) AR-8A; F) AR-8B; G) EWH.....84

Figura 4.12. Estructura molecular del Bergapteno, Bergaptol y derivado glucosilado de Bergaptol.....85

RESUMEN

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de productos naturales de diversos orígenes para el control de plagas y enfermedades. Esto debido a sus diversas propiedades biológicas y su baja residualidad en el ambiente. En particular, en el presente trabajo la finalidad fue contribuir a las aportaciones de productos nematocidas alternativos, así como también verificar la inocuidad de los candidatos potenciales a convertirse en plaguicidas naturales. En la primera etapa del trabajo se realizó el cultivo masivo del hongo *Clonostachys rosea* TH27 en dos medios de cultivo, de los cuales se obtuvieron cinco extractos. Estos extractos fúngicos junto con otros cuatro, de trabajos previos con *C. rosea*, se evaluaron *in vitro* contra larvas J₂ de *Meloidogyne incognita*. Adicionalmente se evaluaron otros 20 extractos fúngicos (*Cladosporium* sp. 2XA10, *Colletotrichum* sp. TH17, *Colletotrichum* sp. XH1G4, *Fusarium* sp. 2XA6, *Helicosporium talbootii*, *Penicillium citrinum* XR1b, *Ramichloridium apiculatum*, *Verticillium* sp. TH8, *Volutella* sp. TH22, *Volutella* sp. y diez cepas no identificados). Los resultados en las pruebas *in vitro* mostraron que ninguno de los 29 extractos fúngicos evaluados posee una actividad inhibitoria marcada contra *M. incognita* a una concentración de 300 µg/mL.

En la segunda etapa del trabajo se establecieron en el laboratorio dos ensayos de inocuidad: el de fitotoxicidad con dos cultivos hortícolas (*Lactuca sativa* y *Solanum lycopersicum*) y toxicidad directa a la lombriz de tierra (*Eisenia fetida*). Posteriormente se evaluaron 10 extractos orgánicos en al menos uno de los bioensayos de inocuidad establecidos. Estos extractos se obtuvieron de cuatro plantas (*Acalypha gaumeri*, *Bonellia flammea*, *Croton chichensis* y *Eugenia winzerlingii*), seis hongos (*C. rosea*, *Fusarium incarnatum* y *Gliomastrix murorum*), así como una mezcla de furanocumarinas (Bergapteno y Xantotoxina). Los resultados de los ensayos de inocuidad permitieron detectar que el extracto correspondiente a *E. winzerlingii* no afectó a los tres blancos evaluados. También, el extracto de AcOEt de *F. incarnatum* no mostró toxicidad sobre las lombrices de tierra a las 72 horas de aplicación (100 µg⁻¹ · cm²). La mayor parte de los extractos, con excepción de *G. murorum* (AcOEt) y *C. chichensis*, no mostraron efecto alguno sobre las semillas de lechuga y tomate a una concentración de 250 µg · disco⁻¹. Por lo que se recomienda continuar con los estudios de los extractos considerados inocuos en la presente investigación, para su desarrollo como agroquímicos alternativos.

ABSTRACT

Last decades, there has been increasing the use of natural products to control pests and diseases. This is due to their diverse biological properties and low residual impact on the environment. In particular, in the present work the objective was to contribute at the generation of new alternative nematicidas, and also to verify safety of potential products to development in natural pesticides. In the first step of the study a massive culture of the fungi *Clonostachys rosea* TH27 was performed in two different media, these yield five extracts. These fungal extracts together other four (from previous studies with *C. rosea*), were tested *in vitro* against J₂ juveniles of *Meloidogyne incognita*. Additionally, we selected and screened on other 20 fungal extracts (*Cladosporium* sp. 2XA10, *Colletotrichum* sp. TH17, *Colletotrichum* sp. XH1G4, *Fusarium* sp. 2XA6, *Helicosporium talbotii*, *Penicillium citrinum* XR1b, *Ramichloridium apiculatum*, *Verticillium* sp. TH8, *Volutella* sp. TH22, *Volutella* sp. TH24, and ten unidentified strains). The results showed that none of the 29 fungal extracts had a marked inhibitory activity against *M. incognita* at 300 µg · mL⁻¹.

In the second step, we established two safety bioassays: phytotoxicity in two horticultural crops (*Lactuca sativa* and *Solanum lycopersicum*) and direct toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). Later, 10 organic extracts were tested in at least one of the safety assays, These extracts were obtained from four plants (*Acalypha gaumeri*, *Bonellia flammea*, *Croton chichenesis* y *Eugenia winzerlingii*) and six fungal extracts (*C. rosea*, *Fusarium incarnatum* and *Gliomastrix murorum*) and a mixture of furanocoumarins (Bergapten and Xanthotoxin). The results of the safety bioassays showed that *E. winzerlingii* did not affect any target. Also the EtOAc extract of *F. incarnatum* did not display toxicity to earthworms after 72 hours of application (100 µg⁻¹ · cm²). All extracts tested, excepting *G. murorum* EtOAc and *C. chichenesis*, did not showed any effects against lettuce and tomato seeds at a concentration of 250 µg · disc⁻¹. It is recommended to continue studying the extracts considered safe in the present research in order to develop them as alternative agrochemicals.

INTRODUCCIÓN

Las plantas pueden ser dañadas por plagas y enfermedades, los cuales en gran medida limitan el potencial de rendimiento y la calidad de los productos cosechados. Por lo tanto en la agricultura siempre se está en la búsqueda constante de formas para proteger sus cultivos de los fitoparásitos (Oerke, 2006; Abawi y Widmer, 2000). A pesar de los avances sustanciales en las estrategias de control de enfermedades en plantas, el suministro de alimentos a nivel mundial aún se encuentra amenazado por dichos organismos y el impacto de brotes de enfermedades es particularmente grave en los países en desarrollo (McDowell y Woffenden, 2003). En especial, las enfermedades de raíz ocasionadas por hongos y nematodos fitoparásitos son comunes en cultivos alimenticios como hortalizas, plantas frutales y ornamentales (Khan *et al.*, 2006).

A nivel mundial, los nematodos fitoparásitos causan anualmente pérdidas en el rendimiento de las cosechas por más de 100 mil millones de dólares (Huang *et al.*, 2010). En particular, los nematodos agalladores del género *Meloidogyne* son el grupo económicamente más importante, con el 70% de los daños reportados. Este género es capaz de reproducirse en más de 2000 especies de plantas cultivadas y silvestres pertenecientes a varias familias (Vasyukova *et al.*, 2009; Haase *et al.*, 2007; Semblat *et al.*, 2001). El control químico es una opción ampliamente utilizado para el manejo de estos nematodos fitopatógenos. Sin embargo, los agroquímicos sintéticos están siendo ahora reevaluados en cuanto al riesgo ambiental (fauna benéfica, agua, suelo, etc.), altos costos, disponibilidad limitada en muchos países en desarrollo y disminución de su eficacia después de repetidas aplicaciones ya que inducen resistencia a los patógenos (Taba *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Dong y Zhang, 2006). Con base a lo anterior, el desarrollo de métodos alternativos de control de los fitonematodos es de gran importancia. Adicionalmente, el control con métodos alternativos puede proveer de un método ecoamigable para el manejo de estas plagas. En la literatura se han reportado varios microorganismos antagónicos y sus productos metabólicos para el control de nematodos en diversos campos agrícolas (Huang *et al.*, 2010; Reino *et al.*, 2008). Con el objetivo de contribuir a la búsqueda de alternativas naturales al control de organismos fitoparásitos, en la Unidad de Biotecnología del CICY se han realizado estudios dirigidos al control de nematodos mediante la evaluación de extractos orgánicos de plantas y hongos microscópicos aislados de varios sitios de la Península de Yucatán (Cristóbal-

Alejo *et al.*, 2006; Reyes-Estebanez, 2011). Resultados previos mostraron que extractos orgánicos del hongo *Clonostachys rosea*, cepa TH27, aislada de un cenote de la Península de Yucatán, posee la capacidad de inhibir a juveniles del segundo estadio (J₂) de *M. incognita*, a nivel *in vitro*. También, se observó la supresión en las poblaciones de *M. incognita* cuando se aplicó la masa micelial de la cepa *C. rosea* TH27 en plántulas de tomate, a nivel invernadero, observándose la reducción en el número de agallas y de hembras en las raíces (Díaz, 2009; Herrera, 2007).

Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó el monitoreo de la actividad nematocida de 20 extractos orgánicos de distintas cepas fúngicas a nivel *in vitro* y los extractos correspondientes de *C. rosea*. En paralelo se estableció en el laboratorio ensayos de toxicidad, en los cuales se evaluaron 11 extractos orgánicos (5 de plantas y 6 de hongos) que previamente han mostrado alguna actividad biológica contra fitopatógenos (Ruiz, 2011, Vargas, 2009, Cruz, 2009, Gamboa-Angulo *et al.*, 2008, Cristobal-Alejo *et al.*, 2006). Dichos ensayos se llevarón a cabo con dos modelos *in vitro*: con la lombriz de tierra, un organismo benéfico de suelo y el de plantas de tomate y lechuga para determinar la inhibición de la germinación y elongación de la raíz. Con este estudio se pretende enriquecer el conocimiento y las alternativas para elaborar agroquímicos de origen natural que sean incorporados y aplicados en programas de manejo integrado de plagas.

CAPITULO I.

ANTECEDENTES GENERALES

1.1 NEMATODOS FITOPARÁSITOS

Los nematodos parásitos de plantas son organismos microscópicos obligados (endoparásitos sedentarios) de ambiente húmedo que se alimentan de las raíces de la planta, afectan todo tipo de cultivos, particularmente en regiones con clima cálido (Verdejo-Lucas, 1999). Las pérdidas anuales por nematodos excede de los 100 mil millones de dólares, y a pesar de que su impacto podría ser subestimado, los síntomas del daño son usualmente no específicos y son medidos en campos infestados (Huang *et al.*, 2010; Zinov'eva *et al.*, 2004). Los endoparásitos sedentarios pueden ser divididos en dos grandes grupos: los nematodos sedentarios formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.) de sexualidad dimórfica y los formadores de quistes (*Heterodera*, *Globodera*, entre otros) que alteran la fisiología de su hospedero, la expresión de genes e inducen las células de alimentación en la raíz (pero no forman agallas) (Barker, 2003).

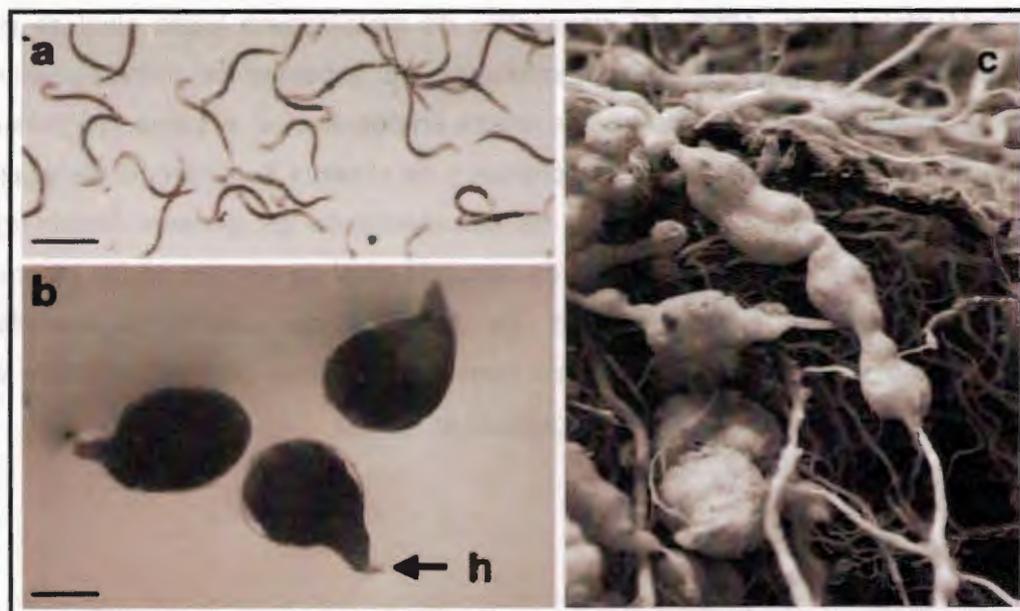
1.2 GENERO *Meloidogyne*

Figura 1.1. El nematodo agallador *Meloidogyne incognita*: **a)** Juveniles del segundo estadio. Bar= 100 μ m; **b)** Hembras disecadas de tejido de raíz. Bar= 500 μ m. H= cabeza; **c)** Típicas agallas, síntomas en raíz de tomate (Castagnone-Sereno, 2006).

Los organismos pertenecientes al género *Meloidogyne* (Figura 1.1) se caracterizan por poseer estilete, que es una especie de aguja hipodérmica, provista de un conducto interior, una musculatura que permite que el órgano sea retráctil y se pueda introducir dentro de la raíz y los tejidos de las plantas para inyectar secreciones y retirar los nutrientes de las células radiculares infectadas (Castagnone-Sereno, 2006; Bello *et al.*, 2000). *Meloidogyne* es el género de nematodos fitoparásitos más importante ya que es, considerado como el grupo más avanzado en parasitismo. Estos infectan casi todas las plantas cultivables, siendo responsables de pérdidas anuales en billones de dólares en cultivos agrícolas (McCarter *et al.*, 2003) y se les encuentra en áreas tropicales y subtropicales así bien como en invernaderos por todo el mundo (De Waele y Elsen, 2007; Darban *et al.*, 2005).

Más de 5500 especies diferentes de plantas, abarcando monocotiledóneas, dicotiledóneas, herbáceas, plantas leñosas, arbustos y árboles pueden ser parasitadas por *Meloidogyne* spp. (Blok *et al.*, 2008; Darban *et al.*, 2005). Las especies más comunes de este género a nivel mundial y en México son: *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* (Montero *et al.*, 2007; Cid del Prado-Vera *et al.*, 2001; Carrillo-Fasio *et al.*, 2000; Verdejo-Lucas, 1999). El diagnóstico de *Meloidogyne* hasta nivel de género resulta relativamente fácil, pero la determinación de especies es compleja debido a variaciones intra-específicas, por lo que se realiza en dos niveles: el primer diagnóstico se ejecuta en el campo, cuando se extraen plantas y se observa la presencia de agallas en sus raíces, lo que indicará la existencia de nematodos de los géneros *Meloidogyne* o *Nacobbus*, mientras que la identificación de segundo nivel se ejecuta en los laboratorios (Rodríguez *et al.*, 2007), por medio de estudios de caracteres morfológicos (observaciones al microscopio), histológicos (cortes perineales) y moleculares (De Waele y Elsen, 2007; Montero *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007).

1.3 DISTRIBUCIÓN DE *Meloidogyne* spp. EN LA REPÚBLICA MEXICANA

Las especies del nematodo agallador *Meloidogyne* están presentes en varias zonas agrícolas de México, atacando a un gran número de especies de cultivos: básicos, frutales, hortícolas y ornamentales (tomate, piña, berenjena, sandía, plátano, estropajo, vid, papaya, etc.) (Cid del Prado-Vera *et al.*, 2001). Sin embargo, por mucho tiempo se desconocía con precisión la distribución que guardan las especies y razas de este género, por lo que en los últimos años los científicos se han dado a la tarea de monitorear varias zonas agrícolas del país para determinar la presencia del nematodo agallador.

Cid del Prado-Vera *et al.*, (2001) indicaron que por lo menos en 18 estados de México (Aguascalientes, Chiapas, Durango, Edo. de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas), está presente *Meloidogyne* spp., en los cuales muestrearon de manera aleatoria 47 localidades, seleccionando cultivos agrícolas como tomate, piña, sandía, chile, café, frijol, pepino, etc. En total obtuvieron 56 poblaciones, de las cuales el 60.7% correspondió a *M. incognita*, el 21.4% para *M. arenaria*, el 12.5% para *M. javanica* y un 5.3% para *M. hapla*.

En el Estado de Yucatán, *M. incognita* se encuentra afectando a cultivos de melón, pepino, calabaza, sandía, chile, girasol, gerbera, heliconia, kalancho y sábila. También se han encontrado poblaciones mezcladas de *M. incognita* y *M. arenaria* en cultivos de tomate, chile habanero, frijol, morera, noni, tulipán, chile Xkat'ic y dulce, ocasionando graves daños (Herrera-Parra *et al.*, 2011).

1.4 NEMATODO AGALLADOR *Meloidogyne incognita*

1.4.1 PARASITISMO DE *Meloidogyne incognita*

El nematodo fitoparásito *M. incognita* es un endoparásito obligado sedentario, que penetra la raíz en hospederos susceptibles. Estos entran como juveniles filiformes del segundo estadio juvenil (J_2), estableciendo sitios de alimentación permanentemente en el cilindro vascular (Escobar *et al.*, 1999; Hussey, 1989). *M. incognita* posee estilete, que está adaptado para la penetración de la pared celular, y las glándulas esofágicas (una dorsal y dos subventrales) que descargan las secreciones dentro del tejido vegetal (Zinov'eva *et al.*, 2004). El J_2 depende de la modificación del tejido de la planta para inducir estructuras especializadas de alimentación conocidas como "células gigantes" (Figura 1.2), que le

servirá como un recurso permanente de nutrientes para su posterior crecimiento, desarrollo y reproducción (Sijmons *et al.*, 1994; Hussey, 1989; Zinov'eva *et al.*, 2004).

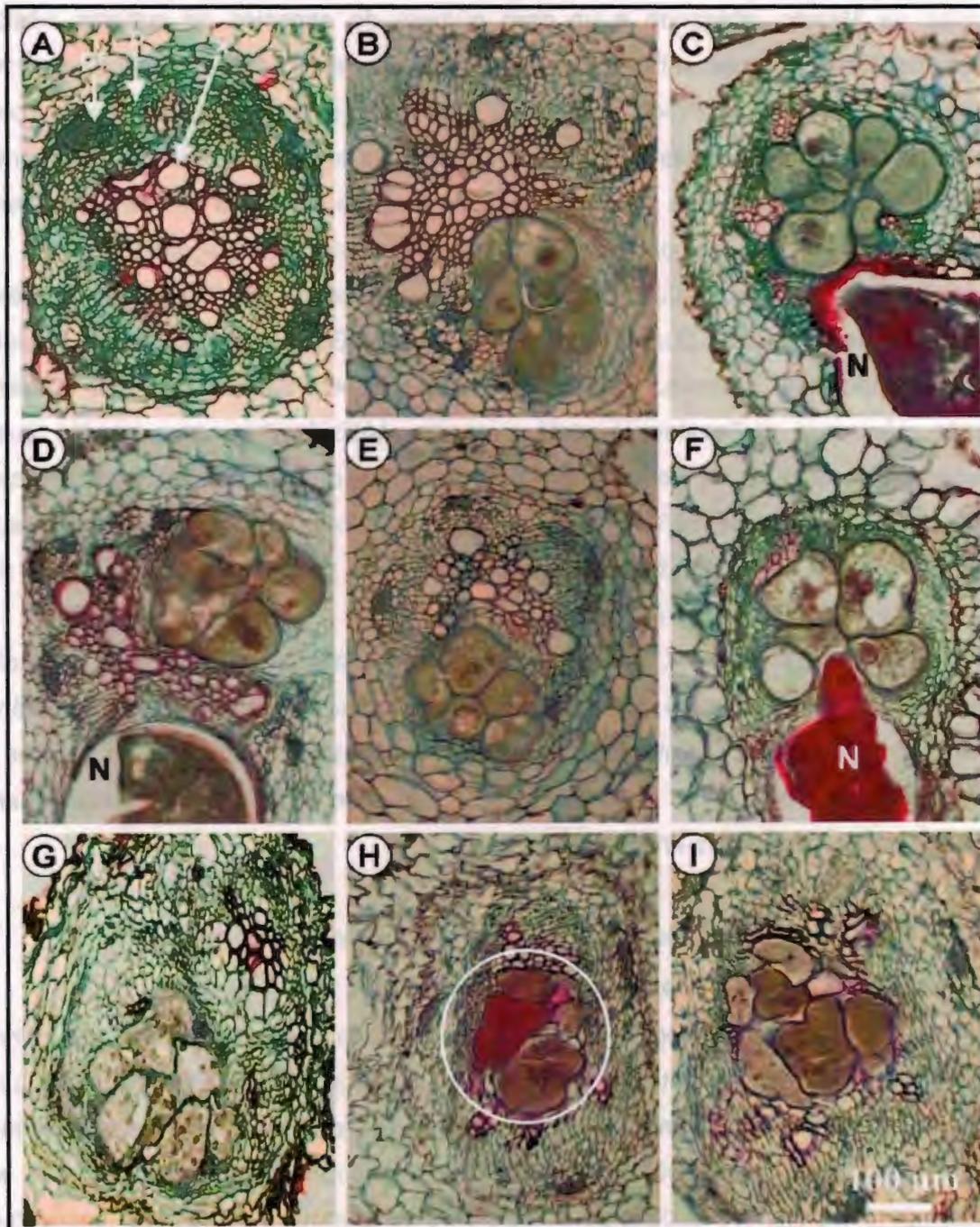


Figura 1.2. Micrografías de luz de alta amplificación de tejido de raíz de garbanzo: **A)** no infectados o infectados por aislamientos de *Meloidogyne artiellia*, **B)** *Ma-I*, **C)** *Ma-SI*, **D)** *Ma-S2*, **E)** *Ma-S3*, **F)** *Ma-Sy*; **G)** *M. arenaria*; **H)** *M. incognita*; o **I)** *M. javanica*. **A)** Las flechas indican elementos del protoxilema y las células del floema y parénquima. **H)** El círculo señala a las células gigantes. **N=** Nematodo hembra adulta (Vovlas *et al.*, 2005).

1.4.2 CICLO BIOLÓGICO DE *Meloidogyne incognita*

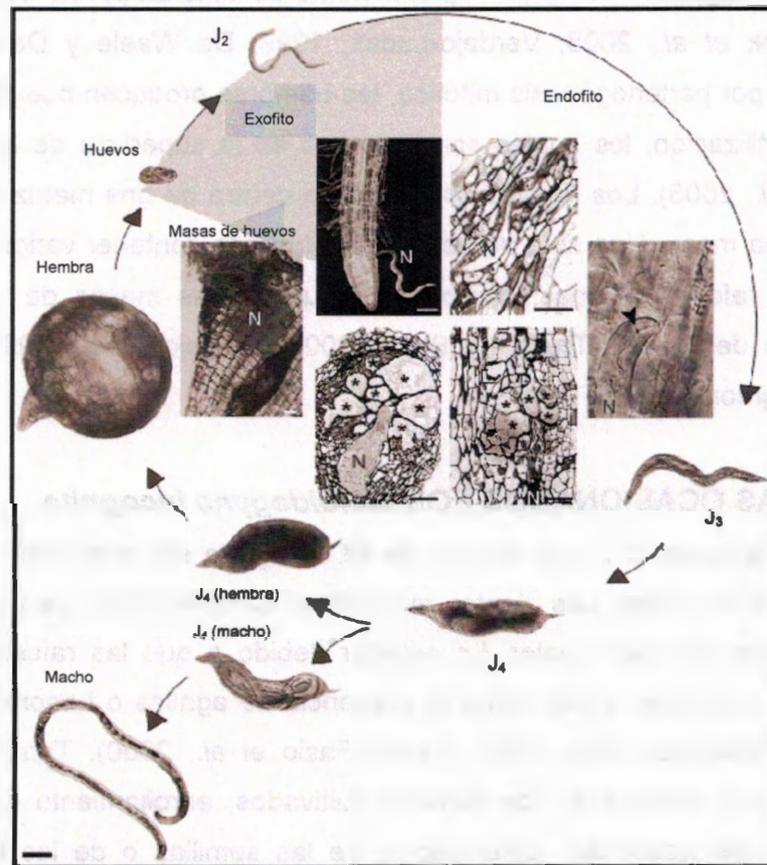


Figura 1.3. Ciclo de vida parasitaria de *Meloidogyne incognita* (Abad *et al.*, 2008).

El ciclo de vida de *M. incognita* comprende seis fases biológicas: huevo, cuatro estadios juveniles y adulto (Figura 1.3) (Abad *et al.*, 2008). La primera fase juvenil se desarrolla en el interior del huevo, después de pasar la primera muda dentro de él, se desarrolla el segundo estadio juvenil (J_2). Esta fase eclosiona del huevo y llega al suelo donde se desplaza hasta que encuentre una raíz susceptible. El J_2 es la etapa infectiva del nematodo y su invasión no ocurre por debajo de los 15 °C. Una vez dentro del tejido cortical, el J_2 establece un sitio de alimentación (Haseeb *et al.*, 2005; Verdejo-Lucas, 1999). Los J_2 se alimentan de las células gigantes inducidas por ellos mismos y mudan tres veces consecutivamente (J_3 , J_4 , adulto), en los cuales interrumpe su alimentación hasta convertirse en adultos. De vez en cuando, los machos desarrollan y emigran de las raíces. Sin embargo, se cree que no juegan ningún papel en la reproducción. Las

hembras adultas, en forma de pera reanudan la alimentación y crecen rápidamente. La disección de las agallas revela las típicas hembras hinchadas en varias etapas de maduración (Blok *et al.*, 2008; Verdejo-Lucas, 1999; De Waele y Davide, 1998). La reproducción es por partenogénesis mitótica, las hembras producen huevos sin meiosis y no requieren fertilización, los cuales son liberados en la superficie de la raíz (Sijmons, 1993; Abad *et al.*, 2008). Los huevos se depositan dentro de una matriz gelatinosa para que se forme una masa. Una sola de estas masas puede contener varios centenares de huevos. En las raíces primarias, carnosas y gruesas, las masas de huevos pueden quedarse dentro de la raíz (Trudgill y Block, 2001; Verdejo-Lucas, 1999; De Waele y Davide, 1998; Sijmons, 1993).

1.4.3 SÍNTOMAS OCASIONADOS POR *Meloidogyne incognita*

Los síntomas ocasionados por el ataque de *M. incognita* son enanismo de la planta y amarillamiento de las hojas. Las plantas manifiestan también síntomas de deficiencia de agua en las horas de mayor calor. Lo anterior debido a que las raíces son dañadas, presentando los síntomas típicos como la presencia de agallas o tumores (Castagnone-Sereno, 2006; Velásquez-Valle, 2001; Carrilo-Fasio *et al.*, 2000). También se pueden observar zonas con clorosis en los campos cultivados, enrollamiento o muerte de las hojas, detención del desarrollo, deformación de las semillas o de los frutos, necrosis externa e interna de las raíces, exhiben agrietamiento en la zona del cuello de la raíz y parte baja del tronco. El resultado final es la destrucción de la capacidad vegetativa del cultivo (Rodríguez *et al.*, 2007).

1.5 MÉTODOS DE CONTROL DE FITONEMATODOS

Antes de decidir que tipo de técnicas de control son las más adecuadas, en cada caso es necesario caracterizar el problema, determinar los nematodos patógenos y conocer su densidad, biología e interacción del parásito con el cultivo (Bello *et al.*, 2000). En la actualidad se han implementado tácticas químicas, biológicas, uso de plantas resistentes, rotación de cultivos, métodos físicos y otras prácticas culturales para el control de nematodos (Figura 1.4) (González *et al.*, 2004; Chitwood, 2002; Kerry, 2001; Bello *et al.*, 2000).

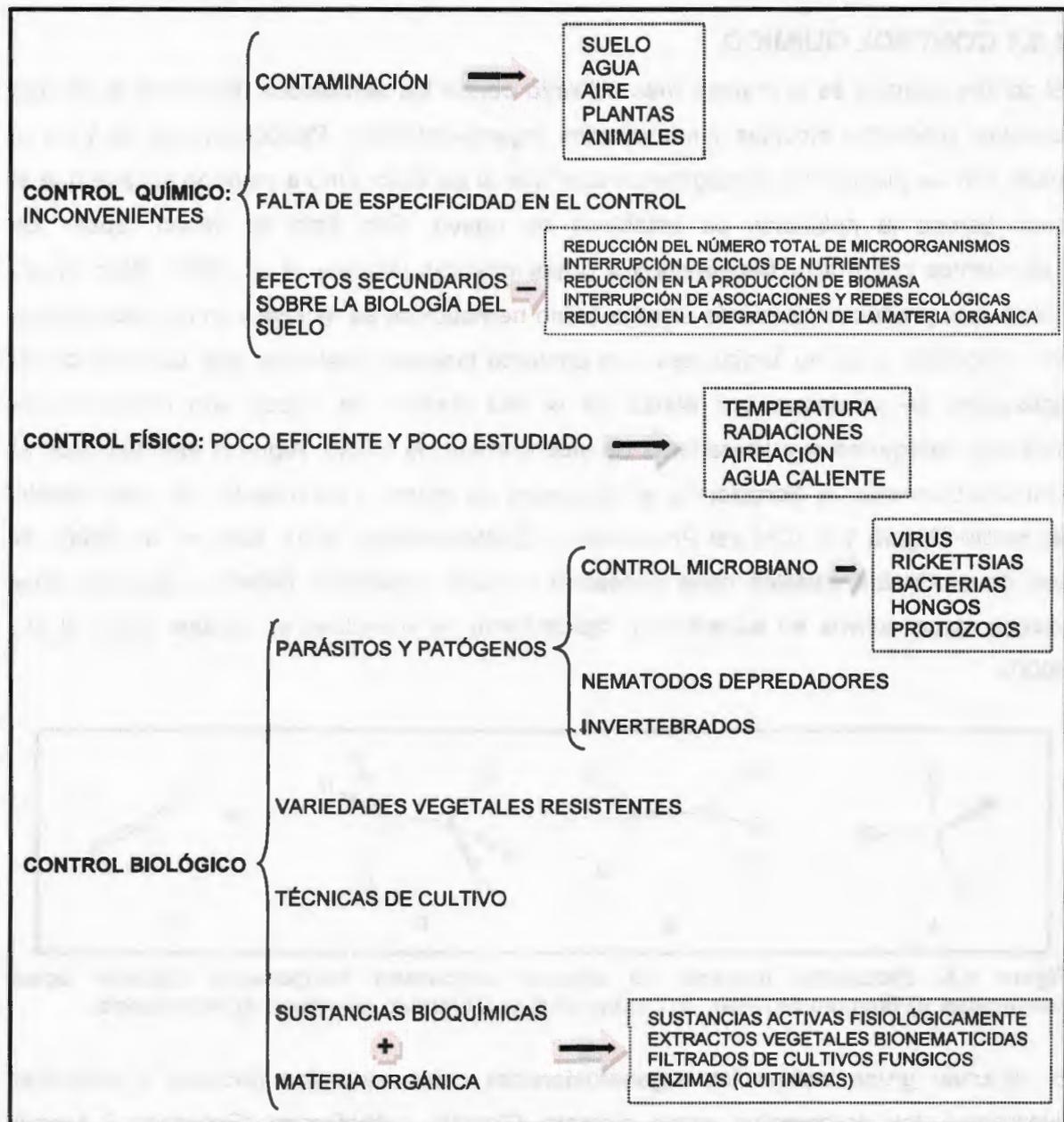


Figura 1.4. Métodos de control integral de nematodos fitoparásitos y sus características generales bióticas y abióticas (Bello *et al.*, 2000).

1.5.1 CONTROL QUÍMICO

El control químico es el manejo más utilizado contra los nematodos fitoparásitos, el cual emplean productos biocidas y nematicidas órgano-sintéticos. Periódicamente se trata el suelo con los plaguicidas consiguiendo controlar al parásito, pero a menudo sucede que al poco tiempo la población se establece de nuevo. Con esto se deben repetir los tratamientos con mayor frecuencia y a dosis mayores (Aballay *et al.*, 2001; Bello *et al.*, 2000). Los productos químicos usados como nematicidas se incluyen en dos categorías, los fumigantes y los no fumigantes. Los primeros incluyen productos que, después de su aplicación, se volatilizan por efecto de la alta presión de vapor; son hidrocarburos alifáticos halogenados o liberadores de isotiocianato de metilo. Algunos ejemplos son el bromuro de metilo, la cloropicrina, el dibromuro de etileno y las mezclas de isotiocianato de metilo (Figura 1.5) (Cid del Prado-Vera y Cristóbal-Alejo, 2001; Bello *et al.*, 2000). El uso de productos volátiles hace necesario un sello superficial debido a que son muy tóxicos, poco activos en superficie y rápidamente se volatilizan en el aire (Bello *et al.*, 2000).

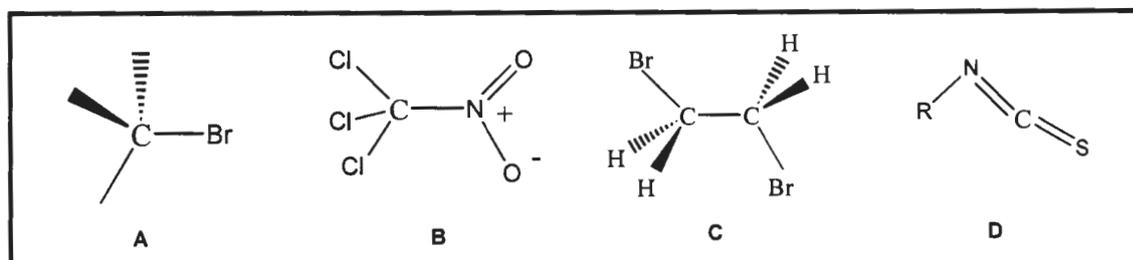


Figura 1.5. Estructuras químicas de algunos compuestos halogenados utilizados como nematicidas: a) Bromuro de metilo; b) Cloropicrina; c) Dibromuro de etileno; d) Isotiocianato.

El segundo grupo incluye los organofosforados como etoprofos (Mocap) y fenamifos (Nemacur), los carbamatos como aldicarb (Temik), carbofurano (Furadan) y oxamil (Vydate) (Figura 1.6), principalmente. Estos productos se aplican en granulados, soluciones o emulsiones. Los carbamatos y organofosforados son activos por contacto, no matan directamente a los nematodos, sino que afectan su reproducción al inhibir la actividad muscular, interferir en su movilidad por la inhibición de la enzima acetil colinesterasa, así como a su desarrollo y alimentación, produciendo nematostasis (Haseeb *et al.*, 2005; Cid del Prado-Vera y Cristóbal-Alejo, 2001; Bello *et al.*, 2000).

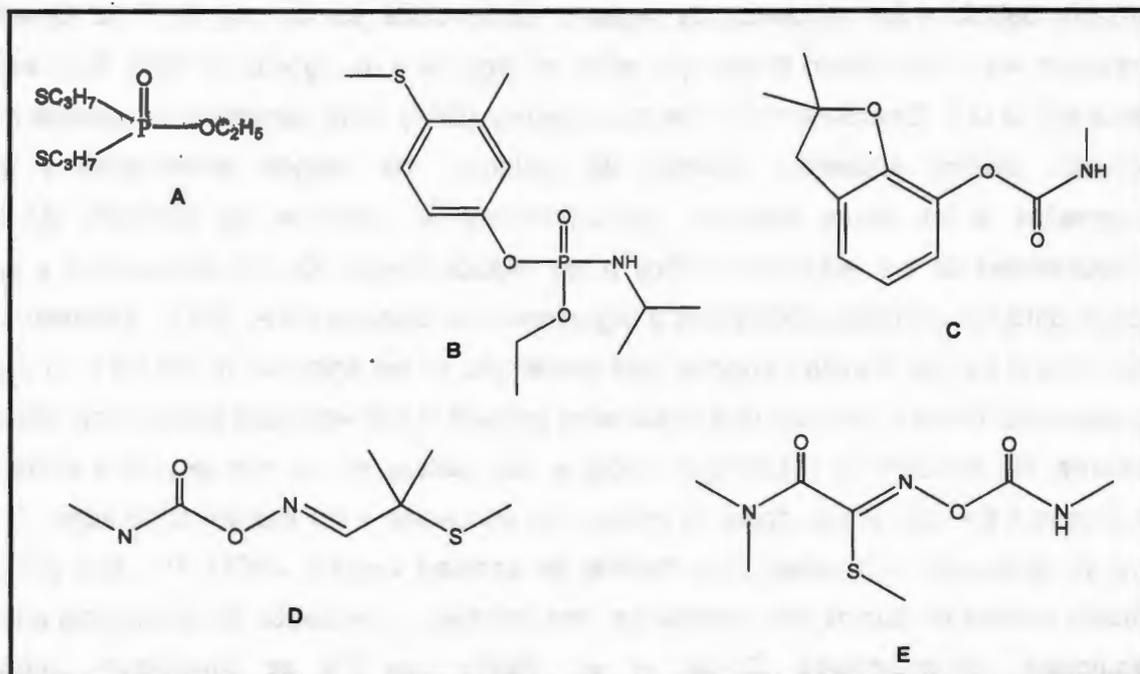


Figura 1.6. Estructuras químicas de algunos organofosforados y carbamatos utilizados como nematocidas: a) Etoprofos; b) Fenamifos; c) Carbofurano; d) Aldicarb; e) Oxamil.

1.5.2 BIOPLAGUICIDAS MICROBIANOS

El reducir las pérdidas de cosecha es de relevante importancia en la agricultura, y hasta ahora los agroquímicos sintéticos han jugado un papel fundamental en la supresión de las plagas y enfermedades, incluyendo el manejo de nematodos fitoparásitos. Sin embargo, estos productos, están siendo reevaluados, no sólo por su persistencia en la superficie de los suelos, su lixiviación a las aguas subterráneas, por sus altos costos, o la disponibilidad limitada en muchos países en desarrollo, sino también por sus efectos no deseados en áreas que no son objetivo, tales como pueblos o zonas habitadas alcanzadas por los productos volatilizados. Además, el uso masivo e indiscriminado de plaguicidas sintéticos incluyendo a los utilizados como nematocidas, ha conducido al desarrollo de resistencia en toda clase de plagas (Li *et al.*, 2007; Dong y Zhang, 2006; Biondi *et al.*, 2004). Debido a todos los problemas ya mencionados, urge la necesidad de buscar otras alternativas de control que sean prácticas, ecológicamente benignas y económicamente factibles (González *et al.*, 2004; Aballay *et al.*, 2001; Zavaleta-Mejía *et al.*, 1993).

Existe una necesidad de búsqueda de novedosos plaguicidas, incluyendo los basados en productos naturales (PN) para sustituir a los productos que han quedado fuera del

mercado debido a los requisitos de registro establecidos por la Ley de Food Quality Protection Act in the United States que entró en vigor el 3 de agosto de 1996. Bajo esta nueva ley, la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) debe considerar la química del producto, destino ambiental, química de residuos, los riesgos alimentarios y no alimentarios a los seres humanos (principalmente el potencial de aumento de la susceptibilidad de los lactantes y niños a los efectos tóxicos de los plaguicidas) y los riesgos para los animales domésticos y organismos no blancos (EPA, 2011). También se encuentra la Ley de Sanidad Vegetal, que contempla en los artículos 39, 39 bis y 40 que las personas físicas o morales que desarrollen productos con actividad fitosanitaria deben presentar los estudios de efectividad biológica, los cultivos en los que se podría aplicar, las plagas a las que ataca, dosis, el método de aplicación y los intervalos de seguridad para su aplicación (inocuidad) (Ley federal de sanidad vegetal, 2007). Por otra parte, también nuevos productos son necesarios para combatir la evolución de resistencia a los plaguicidas convencionales (Dayan *et al.*, 2009). Los PN se consideran menos perjudiciales, sobre todo por su baja residualidad en el ambiente, ya que son biodegradados más fácilmente por los microorganismos (Biondi *et al.*, 2004). Estos contribuyen al control de plagas de muchas maneras: (1) como extractos crudos o en forma purificada, por ejemplo Bt-endotoxinas, bilanafos, giberelinas, aceites esenciales piretrinas y polioxinas; (2) como materiales primarios para derivados semisintéticos, por ejemplo emamectina, dihidroazadiractina; (3) como herramientas de investigación en estudios farmacológicos, por ejemplo c-bungarotoxina, y (4) como herramientas de exploración en el descubrimiento de nuevos modos de acción, por ejemplo, hormonas (Copping y Duke, 2009; Ujváry, 2002). La búsqueda de nuevos PN es de gran importancia para el desarrollo de la agricultura orgánica, que en la actualidad se aplica a más de 17 millones de hectáreas en todo el mundo. En América Latina, Oceanía y Europa tienen un mercado de cerca de 1.7 mil millones de dólares (Biondi *et al.*, 2004). En la última década, la detección de metabolitos de origen microbiano como fuentes de nuevos candidatos para el desarrollo de bioplaguicidas ha pasado de laboratorios industriales a pequeñas compañías biotecnológicas (Genilloud *et al.*, 2011). Todos los microorganismos tienen la habilidad de biosintetizar metabolitos secundarios, los cuales generalmente corresponden a estructuras químicas de bajo peso molecular y son producidos en muy bajas cantidades. Esos metabolitos son también conocidos como productos naturales microbianos (PNM) cuya variedad y cantidad en los organismos puede ser regulada por factores externos

bióticos y abióticos. En general, los PNM tienen muchas aplicaciones beneficiosas para el hombre, que han trascendido más allá de sus propiedades antibióticas, incluyendo su uso como bioplaguicidas (Hernández-Carlos y Gamboa-Angulo, 2011). Muchos PN se han descubierto y patentado como agroquímicos (Cuadro 1.1), pero debido a los obstáculos de regularización, su introducción al mercado es largo y laborioso (Dayan *et al.*, 2009). Posteriormente a la detección de un extracto orgánico crudo clasificado como candidato potencial, se inicia el aislamiento e identificación de la molécula activa y su cuantificación analítica. Es esencial para su registro, contar con la optimización del proceso apropiado de extracción junto con la estandarización del extracto refinado. Por otra parte, con la formulación adecuada, continua la búsqueda de su espectro de acción y consecutivamente la determinación del posible riesgo para el consumidor y para el ambiente. Estos requisitos hacen una larga lista de pruebas solicitadas para constatar la aceptación legal de una marca de un producto biológico fitosanitario (Kleeberg *et al.*, 2009).

Cuadro 1.1. Productos naturales de origen microbiano que se encuentran patentados para el control de plagas y enfermedades en plantas.

Producto Natural	Organismo	Uso	Patente	Autor(es)
Mezcla de D-glucosa, D-ribosa y D-galactofuranosa	<i>Ganoderma lucidum</i> o <i>Laetiporus sulphureus</i>	Bactericida Fungicida Nematicida	PCT/US2006/ 030009	Hiramoto, 2005
Derivados monosacaridos de avermectina B1	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Insecticida, Nematicida Acaricida	PCT/EP2004/ 006442	Pitterna <i>et al.</i> , 2003
Sporotricolona	<i>Sporotrichum</i> spp.	Insecticida	PCT/IN03/ 00073	Shivanandappa <i>et al.</i> , 2002
Fracciones citoplasmáticas de membrana y pared	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fungicida	PCT/IB01/ 01850	Guardiola, 2000
Extracto etanólico	<i>Bacillus licheniformis</i> PR1-36a	Fungicida	PCT/US95/ 08536	Neyra y Sadasivan, 1995

1.5.2.1 METABOLITOS FÚNGICOS NEMATICIDAS

Los hongos son conocidos por poseer una enorme diversidad de rutas metabólicas y han proporcionado varias clases de compuestos comerciales, incluyendo muchos de los antibióticos utilizados en medicina. Por lo tanto, los metabolitos secundarios fúngicos podrían tener un gran potencial en sus nuevas estructuras y actividades nematocidas. De hecho, la bioprospección y el desarrollo comercial de estos PNM, son de especial interés por muchos grupos de investigación y empresas biotecnológicas (Li *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2004). Debido a importantes investigaciones en este ámbito, en los últimos tiempos muchos compuestos nematocidas se han detectado de hongos, aunque a la fecha, se encuentran en desarrollo los productos nematocidas comerciales basados en compuestos fúngicos (Cuadro 1.2). Por ejemplo, un nuevo péptido llamado omphalotin se obtuvo del hongo *Omphalotus olearius* el cual ha demostrado tener una actividad similar al nematocida comercial ivermectina (Li *et al.*, 2007).

(Note: The table content is extremely faint and largely illegible in the provided image. It appears to be a table with multiple columns and rows, likely detailing fungal compounds and their nematocidal activities.)

Cuadro 1.2. Productos naturales de origen fúngico reportados con actividad biológica contra fitonematodos.

Producto	Organismo	Nematodo	Autor(es)
Filtrados, Extractos y Compuesto Ly-1	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> <i>Panagrellus redivivus</i> <i>Meloidogyne incognita</i>	Liu et al., 2009
Filtrados	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>M. hapla</i>	Liu et al., 2008
Extractos	<i>Clonostachys rosea</i> , <i>Papulospora pallidula</i> y <i>Selenosporella</i> sp. GH26	<i>M. incognita</i>	Reyes- Estebanez et al., 2011; Herrera, 2007
Filtrados y Extractos	<i>Ophioceras commune</i> , <i>Pseudohalonestria adversaria</i> , <i>P. lignicola</i> , <i>Massarina thalassioidea</i> , <i>Caryospora callicarpa</i> , <i>Annulatascus</i> sp., <i>Helicomyces roseus</i> , <i>Phomatospora berkeleyi</i> , <i>Xylaria</i> sp. y <i>Hyphomycete</i> sp.	<i>B. xylophilus</i>	Dong et al., 2004
Filtrados	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. compactum</i> , <i>F. equiseti</i> <i>F. solani</i> , <i>Penicillium</i> sp. <i>Pochonia chlamydosporia</i> , <i>Ramicandelaber longisporus</i> y <i>Aspergillus</i> sp.	<i>Heterodera glycines</i> <i>M. incognita</i>	Meyer et al., 2004
Flavipina	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>H. glycines</i> <i>M. incognita</i>	Nitao et al., 2002

1.6 EXTRACTOS SELECCIONADOS DE HONGOS MICROSCÓPICOS

Una parte de los extractos fúngicos de la colección de la Unidad de Biotecnología han sido previamente evaluados contra organismos patógenos, mediante varios bioensayos para el monitoreo de actividad biológica. Entre estos, se seleccionaron veinte extractos de distintas cepas fúngicas para ser ensayados contra *M. incognita* (Cuadro 1.3). Estos han sido evaluados contra ocho microorganismos blanco, cuatro bacterias (*Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus* y *Xanthomonas campestris*), una levadura (*Candida albicans*) y tres hongos (*Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Fusarium oxysporum*) (Reyes-Estebanez et al., 2011 y De la Rosa, 2007). También se

Cuadro 1.3. Actividad biológica reportada de las cepas fúngicas seleccionadas (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011 y De la Rosa, 2007).

Cepa fúngica	Halo de inhibición (diámetro en mm)							
	Bs	Ec	Sa	Xc	Ca	At	Cg	Fo
<i>Cladosporium</i> sp. 2XA10	9	-	9	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp. TH17	-	-	8	-	-	-	NE	-
<i>Colletotrichum</i> sp. XH1G4	7	-	8	-	7	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp. 2XA6	10	10	9	-	11	-	-	-
<i>Helicosporium talbootii</i>	-	-	9	-	-	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i> Corda XR1b	13	-	9	15	-	-	-	-
<i>Ramichloridium apiculatum</i>	-	-	8	-	-	-	-	-
<i>Verticillium</i> sp. TH8	14	13	14	-	12	-	NE	-
<i>Volutella</i> sp. TH22	-	-	-	-	9	-	-	-
<i>Volutella</i> sp. TH24	8	-	11	-	11	-	8	-
2TA4	-	11	-	10	12	-	-	11
2TA7	18	18	10	14	14	-	9	14
2TA8	-	-	-	-	-	-	13	-
2TS1	9	-	12	-	8	-	-	-
2TS18	-	-	8	-	-	-	9	-
2TS5	8	-	14	-	8	-	-	-
2TS9	-	-	9	-	9	-	-	-
2XA11	13	-	12	18	11	-	-	9
TA26	9	-	12	-	-	-	-	-
TS23	9	11	8	12	10	-	-	11

Bs: *Bacillus subtilis*; **Ec:** *Erwinia carotovora*; **Sa:** *Staphylococcus aureus*; **Xa:** *Xanthomonas campestris*; **Ca:** *Candida albicans*; **At:** *Alternaria tagetica*; **Cg:** *Colletotrichum gloeosporioides*; **Fo:** *Fusarium oxysporum*; **NE:** No evaluado.

1.6.1 *Clonostachys rosea* SCHROERS, SAMUELS, SIEFERT & GAMS

El hongo filamentoso *Clonostachys rosea* (*Gliocladium roseum*: telomorfo *Bionectria ochroleuca*) (Figura 1.7) es un saprofito común con una amplia distribución.

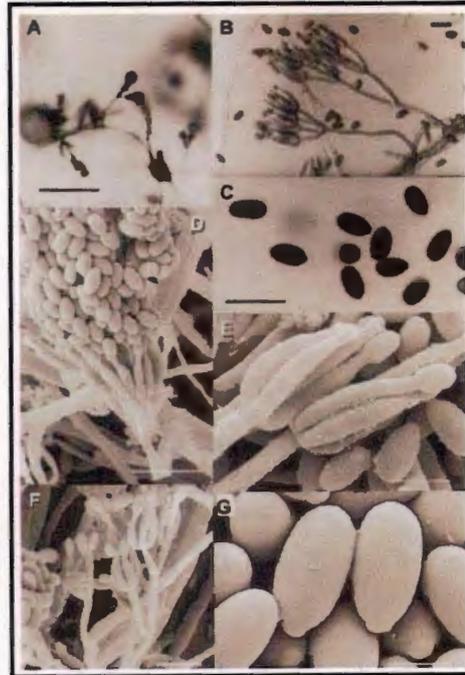


Figura 1.7. Fotomicrografías de *Clonostachys rosea* Grupo C, cepa TC 1304: **A)** Conidios de conidióforos secundarios; **B)** Conidióforos secundarios de medio OA; **C)** Conidios de medio OA; **D)** Masa de conidios de un conidióforo secundario; **E)** Fialides; **F)** Conidióforos secundarios de medio LcA; **G)** Conidios de medio LcA (Okuda *et al.*, 2000).

Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Sordariomycetes
Subclase: Hypocreomycetidae
Orden: Hypocreales
Familia: Bionectriaceae
Genero: *Clonostachys*
Especie: *Clonostachys rosea* Schroers, Samuels, Siefert & Gams.

C. rosea está asociado con organismos tales como hongos, nematodos y plantas y es versátil en términos de su nicho ecológico. Con frecuencia se le encuentra en suelos cultivados, en desechos que contienen ácidos fenólicos fitotóxicos y en órganos aéreos de

plantas (Gan *et al.*, 2007; Li *et al.* 2006; Schroers, 2001). *C. rosea* es una especie micoparásita, destructiva y necrotrófica de hifas, esporas, esclerocios y otros cuerpos fructíferos de varios hongos. Diferentes cepas de *C. rosea* en otros trabajos han demostrado ser eficientes como antagonistas contra varios hongos fitopatógenos y contra nematodos fitoparásitos. También ha sido reportado como un endófito que promueve la salud vegetal y últimamente se le ha empleado para la producción de hidrocarburos volátiles, ya que los compuestos producidos por *C. rosea* se encuentran relacionados químicamente con el combustible diesel, denominados mico-diesel (cuadro 1.4). Por otra parte, los metabolitos reportados de *C. rosea* evaluados contra nematodos incluyen a cinco de tipo verticilina, nombrados como gliocladina A (1), B (2), C (3), D (4) y E (5), junto con los compuestos conocidos verticilina A (6), 11' -deoxiverticilina A (7), Sch52900 (8) y Sch52901 (9) (Figura 1.8). Estos se obtuvieron de la fermentación en trigo sólido de *C. rosea* 1A, exhibiendo actividad nematocida contra *Caenorhabditis elegans* y *Panagrellus redivivus* (Dong *et al.*, 2005). La extraordinaria versatilidad ecológica de *C. rosea* la hacen una excelente candidata para su uso en la agricultura (Gan *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006).

Cuadro 1.4. Estudios de aplicaciones reportadas para *Clonostachys rosea*.

Parte de <i>C. rosea</i> utilizado	Sitio de aislamiento	Fitopatógeno	Uso	Autor(es)
Esporas	Planta guisante en campo (Canadá).	<i>Gibberella zeae</i>	Antagonista	Xue <i>et al.</i> , 2009
Esporas	Ecosistemas de Brasil.	Moho gris (<i>Botrytis cinerea</i>)	Antagonista	Cota <i>et al.</i> , 2008
Micelio	Endófito de <i>Eucryphia cordifolia</i> al norte de la Patagonia.	<i>Pythium ultimum</i>	Antagonista Producción de hidrocarburos volátiles	Strobel <i>et al.</i> , 2008
Micelio	Suelo de Yunnan China.	<i>Rhizoctonia solani</i>	Antagonista	Gan <i>et al.</i> , 2007
Micelio	-	-	Promotor del crecimiento vegetal	Ravnskov <i>et al.</i> 2006
Esporas	Planta guisante en campo (Canada).	<i>Fusarium</i> ssp.	Antagonista	Xue, 2003
Esporas	Costa rica.	Moho gris (<i>Botrytis cinerea</i>)	Antagonista	Chaves y Wang, 2004

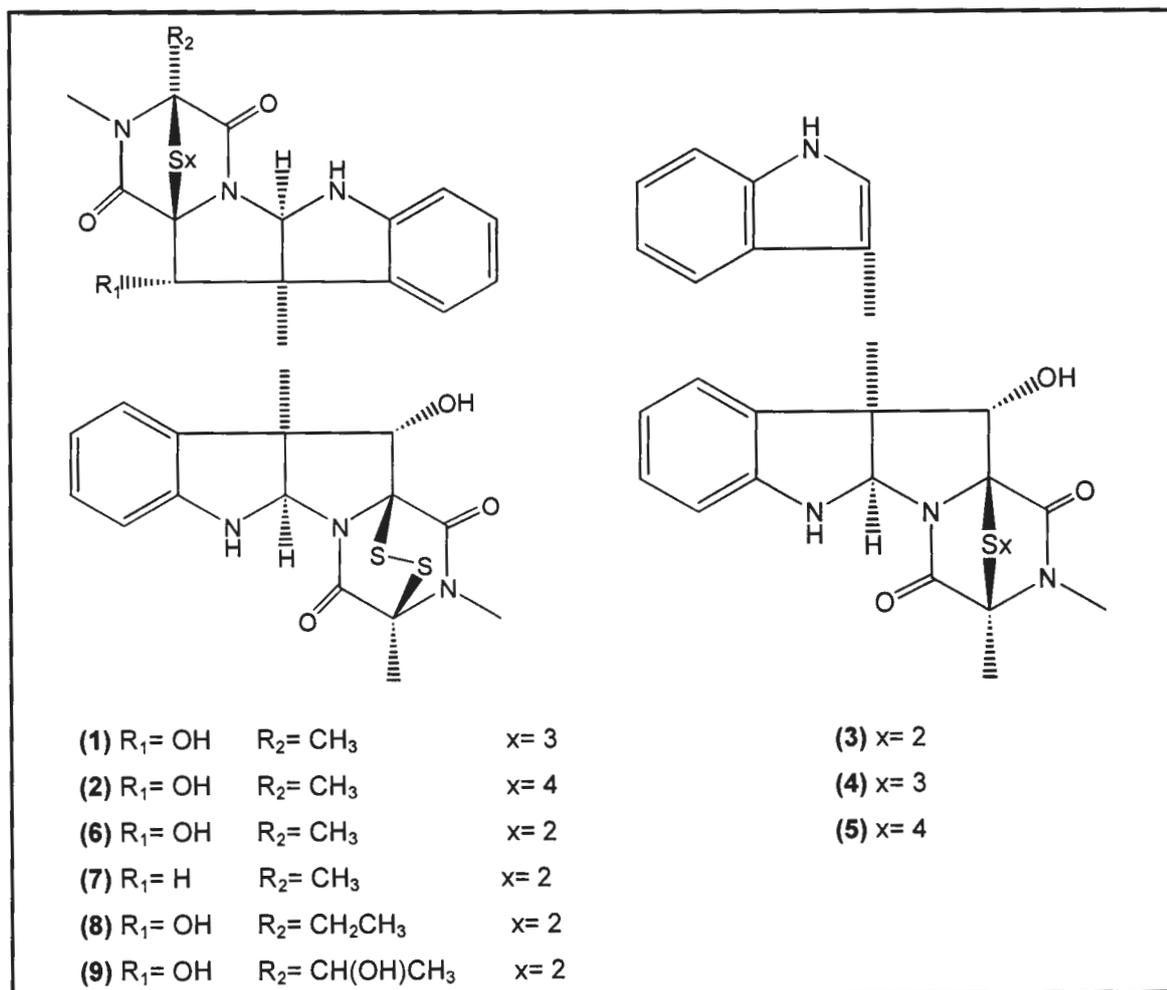


Figura 1.8. Metabolitos de *Clonostachys rosea*: Verticilinas tipo epipolisulfanildioxopiperazinas, gliocladina A (1), B (2), C (3), D (4) y E (5), y verticilina A (6), 11'-deoxiverticilina A (7), Sch52900 (8) y Sch52091 (9) (Dong *et al.*, 2005).

Por otra parte, en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán se ha evaluado la capacidad de actividad biológica de la cepa *C. rosea* TH-27 contra varios organismos patógenos (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5. Estudios realizados de la cepa *C. rosea* TH27 aislada del cenote Temozón de la Península de Yucatán.

Producto de <i>C. rosea</i> utilizado	Fitopatógeno	Actividad	Autor
Extractos	<i>Myzus persicae</i> <i>Rophalosiphum padi</i>	Repelente	Ruiz, 2011.
Extractos Esporas y Micelio	<i>Meloidogyne incognita</i>	Nematicida Antagonista	Díaz, 2009.
Extractos	<i>M. incognita</i>	Nematicida	Herrera, 2007.

1.7 EVALUACIONES DE RIESGO EN EL AMBIENTE

Los productos agroquímicos sintéticos no actúan sobre un organismo plaga específico, en general son de espectro amplio y sus efectos tóxicos actúan sobre una gama de plantas y animales que viven en los ecosistemas. La persistencia de estos agentes tóxicos en el ambiente producen efectos no deseados que se pueden ampliar y con ello pasar a formar parte de la cadena alimenticia y por lo tanto afectar la salud humana (D' Abrosca *et al.*, 2004). Por lo tanto, los productos antes de pasar a diversas etapas de un proceso comercial, deben cubrir pruebas de toxicidad en las diferentes fases del proceso. En las etapas iniciales, es importante contar con los ensayos con organismos benéficos para estudiar la toxicidad de estos sobre su uso en pruebas estándar (Mazoir *et al.*, 2008; OECD, 1984). Estos estudios de toxicidad de los plaguicidas agrícolas se han llevado a cabo obligatoriamente con productos sintéticos utilizando organismos modelo como por ejemplo la lombriz de tierra (De Silva *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2009; Miyazaki *et al.*, 2002) o los de alelopatía para detectar que no dañen a los cultivos donde se aplicarán. Sin embargo, estas pruebas también se están aplicando a los productos de origen natural, (Muangphra y Gooneratne, 2011; Burqueño-Tapia *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2008). Por lo anteriormente mencionado, en el presente trabajo se seleccionaron extractos orgánicos de la colección de la Unidad de Biotecnología del CICY que han presentado alguna propiedad biológica contra organismos plaga, y se evaluaron para medir su toxicidad por medio de pruebas de inocuidad en organismos benéficos reportados previamente como modelos.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* extractos orgánicos fúngicos contra *Meloidogyne incognita* y establecer bioensayos de inocuidad utilizando controles y candidatos potenciales a agroquímicos naturales.

1.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar *in vitro* contra juveniles J₂ de *M. incognita* nueve extractos de *C. rosea* generados de cultivos masivos.
- Monitorear 20 extractos orgánicos de distintas cepas fúngicas contra juveniles J₂ de *M. incognita*
- Establecer el bioensayo de fitotoxicidad con *Lactuca sativa* y *Solanum lycopersicum* y evaluar siete extractos orgánicos selectos.
- Establecer el bioensayo de toxicidad de extractos con *Eisenia fetida* y determinar la inocuidad de cuatro extractos orgánicos y una mezcla de furanocumarinas con propiedades plaguicidas en lombriz de tierra.

1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

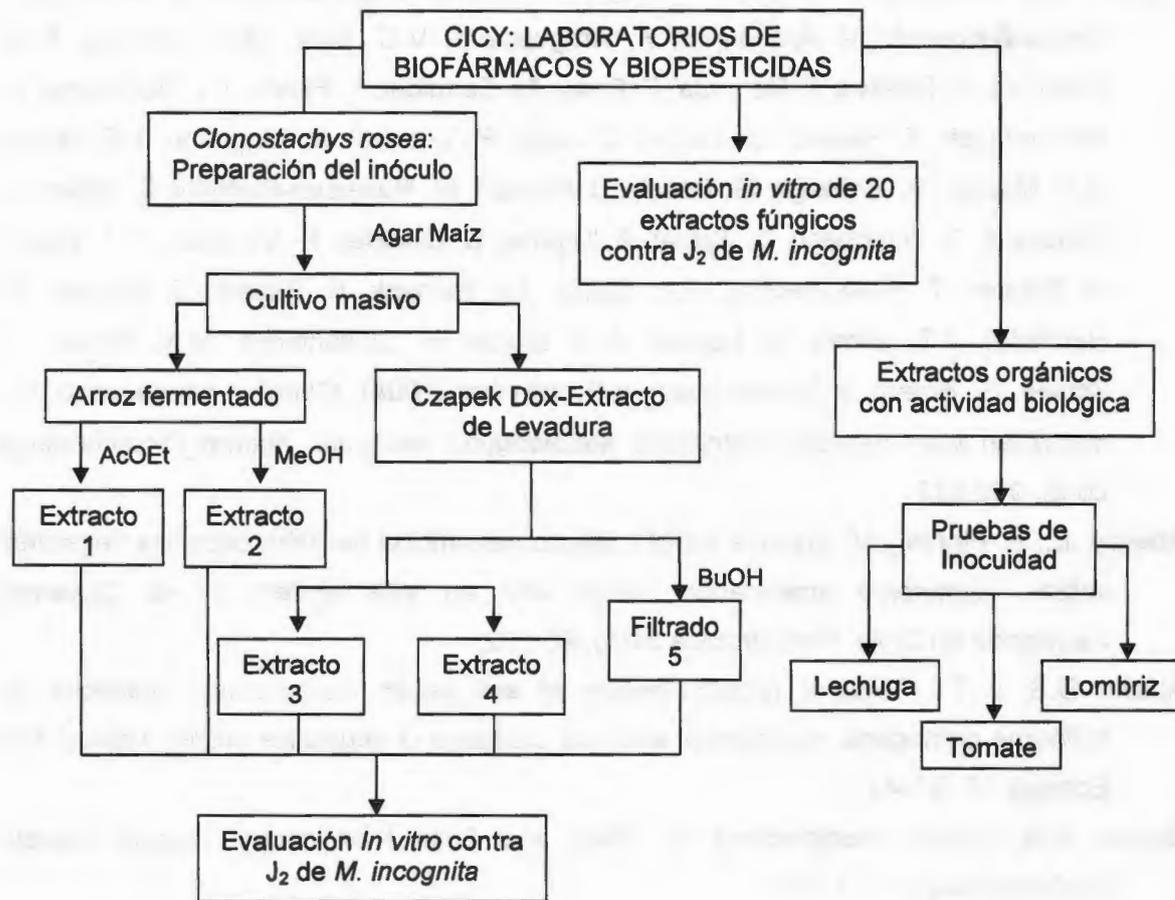


Figura 1.9. Estrategia experimental para la evaluación de extractos orgánicos.

1.10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, P., J. Gouzy, J.M. Aury, P. Castagnone-Sereno, E.G.J Danchin, E. Deleury, L. Perfus-Barbeoch, V. Anthouard, F. Artiguenave, V.C. Blok, M.C. Caillaud, P.M. Coutinho, C. Dasilva, F. De Luca, F. Deau, M. Esquibet, T. Flutre, J.V. Goldstone, N. Hamamouch, T. Hewezi, O. Jaillon, C. Jubin, P. Leonetti, M. Magliano, T.R. Maier, G.V. Markov, P. McVeigh, G. Pesole, J. Poulain, M. Robinson-Rechavi, E. Sallet, B. Ségurens, D. Steinbach, T. Tytgat, E. Ugarte, C. Ghelder, P. Veronico, T.J. Baum, M. Blaxter, T. Bleve-Zacheo, E.L. Davis, J.J. Ewbank, B. Favery, E. Grenier, B. Henrissat, J.T. Jones, V. Laudet, A.G. Maule, H. Quesneville, M.N. Rosso, T. Schiex, G. Smart, J. Weissenbach y P. Wincker (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26(8), 909-915.
- Aballay, E., P. Flores y V. Insunza (2001). Efecto nematocida de ocho especies vegetales sobre *Xiphinema americanum sensu lato*, en *Vitis vinifera* L. var Cabernet Sauvignon en Chile. *Nematropica* 31(1), 95-102.
- Abawi, G.S. y T.L. Widmer (2000). Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology* 15, 37-47
- Barker, K.R. (2003). Perspectives on Plant and Soil Nematology. *Annual Review Phytopathology* 41, 1-25.
- Bello, A., M. Escuer y M.A. Pastrana (2000). Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos, In: *Patología Vegetal Tomo II*, Llácer, G., M.M. López, A. Trapero y A. Bello (eds). Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid. pp: 1039 y 1069.
- Biondi, N., R. Piccardi, M.C. Margheri, L. Rodolfi, G.D. Smith y M.R. Tredici (2004). Evaluation of nostoc strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3313-3320.
- Blok, V.C., J.T. Jones, M.S. Phillips y D.L. Trudgill (2008). Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: the conundrum of polyphagy versus specialization. *BioEssays* 30, 249-259.
- Burgueño-Tapia, E., L. Castillo, A. González-Coloma y P. Joseph-Nathan (2008). Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene *p*-benzoquinone perezona and some of its derivatives. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 766-771.
-

- Carrillo-Fasio, J.A., R.S. García-Estrada, R. Allende-Molar, I. Márquez-Zequera y J.E. Cruz-Ortega (2000). Identificación y distribución de especies del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en hortalizas, en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(2), 115-119.
- Castagnone-Sereno, P. (2006). Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* 96, 282-289.
- Chaves, N. y A. Wang (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía Costarricense* 28(2), 73-85.
- Chitwood, D.J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40, 221-249.
- Cid del Prado-Vera, I., A. Tovar-Soto y J.A. Hernández (2001). Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1), 32-39.
- Cid del Prado-Vera, I. y J. Cristóbal-Alejo (2001). Estudios de efectividad biológica con nematicidas. In: Bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas, Bautista N. y O. Díaz (eds). Colegio de Postgraduados Montecillo, Texcoco, Estado de México. pp. 99-105.
- Copping, L.G. y S.O. Duke (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science* 63, 524-554.
- Cota, L.V., L.A. Maffia y E.S.G. Mizubuti (2008). Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. *Letters in Applied Microbiology* 46, 312-317.
- Cristóbal-Alejo, J., J.M. Tun-Suárez, S. Moguer-Catzin, N. Marbán-Mendoza, L. Medina-Baizabal, S. Simá-Polanco, R. Peraza-Sánchez y M. Gamboa-Angulo (2006). *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. *Nematropica*, 36(1), 89-97.
- D'Abrosca, B., M. Dellagrecia, A. Fiorentino, P. Monaco y A. Zarrelli (2004). Low molecular weight phenols from the bioactive aqueous fraction of *Cestrum parqui*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4101-4108.
- Darban, D.A., M.A. Pathan, A.G. Bhatti y S.A. Maitelo (2005). The effect of different initial densities of nematode (*Meloidogyne javanica*) on the build-up of *Pasteuria penetrans* population. *Journal of Zhejiang University Science* 6(2), 113-118.
- Dayan, F.E., C.L. Cantrell y S.O. Duke (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 4022-4034.

- De la Rosa, S. (2007). Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la península de Yucatán. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 184 p.
- De Silva, P.M.C.S., A. Pathiratne y C.A.M. van Gestel (2010). Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavates*. *Applied Soil Ecology*, 44, 56-60.
- De Waele, D. y A. Elsen (2007). Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology* 45, 457-485.
- De Waele, D. y R.G. Davide (1998). INIBAP, Plagas de musa. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano. Parc Scientifique Agropolis II, Montpellier Cedex, Francia. 4 p. (Hoja divulgativa No. 3).
- Díaz, A. (2009). Uso de *Clonostachys rosea* Samuels, Seifert & Gams para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, en condiciones protegidas. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México. 67 p.
- Ding, L., L. Qi, H. Jing, J. Li, W. Wang y T. Wang (2008). Phytotoxic effects of leukamenin E (an *ent*-kaurene diterpenoid) on root growth and root hair development in *Lactuca sativa* L. seedlings. *Journal Chemical Ecology*, 34, 1492-1500.
- Dong, J.Y., H.P. He, Y.M. Shen y K.Q. Zhang (2005). Nematicidal Epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *Journal of Natural Products* 68(10), 1510-1513.
- Dong, J.Y., Z.X. Zhao, L. Cai, S.Q. Liu, H.R. Zhang, M. Duan y K.Q. Zhang (2004). Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Fungal Diversity* 15, 125-135.
- Dong, L.Q. y K.Q. Zhang (2006). Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant Soil* 288, 31-45.
- EPA (2011). Food quality protection act (FGPA) of 1996. <http://www.epa.gov/pesticides/regulating/laws/fqpa/>.
- Escobar, C., J. De Meutter, F. Aristizabal, S. Sanz-Alfárez, F.F. Del Campo, N. Barthels, W. Van Der Eycken, J. Seurinck, M. Montagu, G. Gheysen y C. Fenoll (1999). Isolation of LEMMI9 gene and promoter analysis during a compatible plant nematode interactions. *Molecular plant microbe interactions* 12(5), 440-449.

- Gan, Z., J. Yang, N. Tao, Z. Yu y K.Q. Zhang (2007). Cloning and expression analysis of a chitinase gene *Crchi1* from the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*). *The Journal of Microbiology* 45(5), 422-430.
- Genilloud, O., I. González, O. Salazar, J. Martín, J.R. Tormo y F. Vicente (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38,375-389.
- González, R., J. Montealegre y R. Herrera (2004). Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agraria* 31 (1), 21-28.
- Guardiola, M. (2000). Elicitor of fungal origin and method for its preparation. International application published under the patent cooperation treaty. World Intellectual Property Organization. 1-5.
- Haase, S., L. Ruess, G. Neumann, S. Marhan y E. Kandeler (2007). Low-level herbivory by root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) modifies root hair morphology and rhizodeposition in host plants (*Hordeum vulgare*). *Plant Soil* 301, 151-164.
- Haseeb, A., A. Sharma y P.K. Shukla (2005). Studies on the management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*-wilt fungus, *Fusarium oxysporum* disease complex of green gram, *Vigna radiata* cv ML-1108. *Journal of Zhejiang University Science* 6(8), 736-742.
- Hernández-Carlos, B. y M.M. Gamboa-Angulo (2011). Metabolites from freshwater aquatic microalgae and fungi as potential natural pesticides. *Phytochemistry Reviews* 10(2), 261-286.
- Herrera, E. (2007). Actividad nematostática de extractos fúngicos y vegetales contra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White.) Chitwood. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Conkal. México. 57 p.
- Herrera-Parra, E., J. Cristóbal-Alejo, J.M. Tún-Suárez, J.A. Góngora-Jiménez y C.T. Lomas-Barrie (2007). Nematofauna nociva (*Meloidogyne* spp.) en cultivos hortícolas tropicales: Distribución y perspectivas de manejo en Yucatán, in: Recursos genéticos microbianos en la Zona Golfo-Sureste de México, Gamboa-Angulo, M. y R. Rojas-Herrera (eds). Subnargem. México. pp. 137-150.
- Hiramoto, B. (2005). Carbohydrate compositions from basidiomycete fungi as biocidal agents active against pathogens. International application published under the patent cooperation treaty. World Intellectual Property Organization, 1-3.

- Huang, Y., C. Xu, L. Ma, K. Zhang, C. Duan y M. Mo (2010). Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* 126, 417-422.
- Hussey, R.S. (1989). Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 27, 123-141.
- Kerry, B.R. (2001). Exploitation of the nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, Butt, T.M., C. Jackson y N. Magan (eds). CAB International. New York. pp. 155-167.
- Khan, A., K.L. Williams y H.K.M. Nevalainen (2006). Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. *BioControl* 51, 643-658.
- Kleeberg, H., N. Walther, B. Ruch, E. Hummel, S. Cergel y J. Runte (2009). Development and registration of new botanicals for the plant protection market. 8 th PSE Meeting on Biopesticides and 2nd RSEQ-GPQNP, La Palma, Islas Canarias, España 21-26 de Septiembre.
- Li, G., K. Zhang, J. Xu, J. Dong y Y. Liu (2007). Nematicidal substances from fungi. *Recent Patents on Biotechnology* 1, 1-22.
- Li, J., J. Yang, X. Huang y 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.
- Liu, T., L. Wang, Y.X. Duan y X. Wang (2008). Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 113-118.
- Liu, Y.J., C.Y. Zhai, Y. Liu y K.Q. Zhang (2009). Nematicidal activity of *Paecilomyces* spp. and isolation of a novel active compound. *The Journal of Microbiology* 47(3), 248-252.
- Marques, C., R. Pereira y F. Goncalves (2009). Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. *Journal of Soils and Sediments*, 9, 137-147.

- Mazoir, N., A. Benharref, M. Bailén, M. Reina y A. González-Coloma (2008). Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. *Phytochemistry* 69, 1328-1338.
- McCarter, J.P., M.D. Mitreva, J. Martin, M. Dante, T. Wylie, U. Rao, D. Pape, Y. Bowers, B. Theising, C.V. Murphy, A.P. Kloek, B.J. Chiapelli, S.W. Clifton, D.McK Bird y R.H. Waterston (2003). Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. *Genome Biology* 4(4), 1-19.
- McDowell, J.M. y B.J. Woffenden (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology* 21(4), 178-183.
- Meyer, S.L.F., R.N. Huettel, X.Z. Liu, R.A. Humber, J. Juba y J.K. Nitao (2004). Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. *Nematology* 6(1), 23-32.
- Miyazaki, A., T. Amano, H. Saito y Y. Nakano (2002). Acute toxicity of chlorophenols to earthworms using a simple paper contact method and comparison with toxicities to fresh water organisms. *Chemosphere*, 47, 65-69.
- Montero Z., C. García, L. Salazar, R. Valverde y L. Gómez-Alpizar (2007). Detección de *Meloidogyne incognita* en tubérculos de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 31(1), 77-84.
- Muangphra, P. y R. Gooneratne (2011). Toxicity of commercial neem extract to earthworms (*Pheretima peguana*). *Applied and Environmental Soil Science*, vol. 2011, Article ID 925950, 8 pages. doi:10.1155/2011/925950
- Neyra, C.A. y L. Sadasivan (1995). *Bacillus licheniformis* producing antifungal agents and uses thereof for control of phytopathogenic fungi. International application published under the patent cooperation treaty. World Intellectual Property Organization, 1-44.
- Nitao, J.K., S.L.F. Meyer, J.E. Oliver, W.F. Schmidt y D.J. Chitwood (2002). Isolation of flavipin, a fungus compound antagonistic to plant-parasitic nematodes. *Nematology*, 4(1), 55-63.
- OECD, Organization of Economic Cooperative Development (1984). Earthworm Acute Toxicity Tests #207.
- Oerke, E.C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144, 31-43.
- Okuda, T., J. Kohno, N. Kishi, Y. Asai, M. Nishio y S. Komatsubara (2000). Production of TMC- 151, TMC- 154 and TMC- 171, a new class of antibiotics, is specific to "*Gliocladium roseum*" group. *Mycoscience* 41, 239-253.

- Pitterna, T., P. Jung, F. Murphy-Kessabi, J. Cassayre, L. Quaranta y O. Hueter (2003). Avermectin B1 monosaccharide derivatives. International application published under the patent cooperation treaty. World Intellectual Property Organization, 1-54.
- Ravnskov, S., B. Jensen, I.M.B. Knudsen, L. Bodker, D.F. Jensen, L. Karlinski y J. Larsen (2006). Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 3453-3462.
- Reino, J.L., R.F. Guerrero, R. Hernández-Galán y I.G. Collado (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7, 89-123.
- Reyes-Estebanez, M., E. Herrera-Parra, J. Cristóbal-Alejo, G. Heredia-Abarca, B. Canto-Canché, I. Medina-Baizabal y M. Gamboa-Angulo (2011). Antimicrobial and nematocidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in Mexico. *African Journal of Microbiology Research* 5(9), 1083-1089.
- Rodríguez, M.G., L. Gómez y B. Peteira (2007). *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann, plaga emergente para la agricultura tropical y subtropical. *Revista de Protección Vegetal* 22(3), 183-198.
- Ruiz, A. (2011). Evaluación de extractos fúngicos en modelos insecticidas y antifúngicos. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 133 p.
- Schroers, H.J. (2001). A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology* 46, 1-212.
- 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(2), 365-385.
- Semblat, J.P., M.N. Rosso, R.S. Hussey, P. Abad y P. Castagnone-Sereno (2001). Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *The American Phytopathological Society* 14 (1), 72-79.
- Shivanan-Dappa, T., A.P. Sattur, Sherren, S. Divakar y N.K.G. Karanth. (2002). A compound as cholinesterase inhibitor and its isolation from fungus *Sporotrichum*

- species*. International application published under the patent cooperation treaty. World Intellectual Property Organization. 1-13.
- Sijmons, P.C. (1993). Plant-nematode interactions. *Plant molecular biology* 23, 917-931.
- Sijmons, P.C., H.J. Atkinson y U. Wyss (1994). Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annual Review of Phytopathology* 32, 235-259.
- Strobel, G.A., B. Knighton, K. Kluck, Y. Ren, T. Livinghouse, M. Griffin, D. Spakowicz y J. Sears. (2008). The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology* 154, 3319-3328.
- Taba, S., J. Sawada y Z. Moromizato (2008). Nematicidal activity of Okinawa Island plants on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Plant Soil* 303, 207-216.
- Trudgill, D.L. y V.C. Blok (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39, 53-77.
- Ujváry, I. (2002). Transforming natural products into natural pesticides experience and expectations. *Phytoparasitica* 30(5), 439-442.
- Vasyukova, N.I., S.V. Zinovieva, Z.V. Udalova, N.G. Gerasimova, O.L. Ozeretskovskaya y Corresponding Member of the RAS M.D. Sonin (2009). Jasmonic acid and tomato resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Doklady Biological Sciences*, 428, 448-450.
- Velásquez-Valle, R. (2001). Nematodos agalladores afectando hortalizas y otros cultivos en el norte de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1), 107-109.
- Verdejo-Lucas, S. (1999). Nematodes. In: *Integrated pest and disease management in greenhouse crops*, Albajes, R., M.L. Gullino, J.C. Lenteren y Y. Elad (eds). Springer Netherlands. Netherlands. pp. 61-68.
- Vovlas, N., H.F. Rapoport, R. M. Jiménez-Díaz y P. Castillo (2005). Differences in feeding sites induced by root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in chickpea. *Phytopathology* 95, 368-375.
- Xue, A.G. (2003). Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* 93, 329-335.

- Xue, A.G., H.D. Voldeng, M.E. Savard, G. Fedak, X. Tian y T. Hsiang (2009). Biological control of *Fusarium* head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Canadian Journal of Plant Pathology* 31, 169-179.
- Zavaleta-Mejía. E., E. Castro A. y V. Zamudio G. (1993). Efecto del cultivo e incorporación de *Tajetes erecta* L. sobre la población e infección de *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood en Chile (*Capsicum annum* L). *Nematropica* 23, 49-56.
- Zinov'eva, S.V., N.I. Vasyukova y O.L. Ozeretskovskaya (2004). Biochemical Aspects of Plant Interactions with Phytoparasitic Nematodes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40(2), 111-119.

CAPITULO II.

CULTIVO Y EXTRACCIÓN ORGÁNICA DE *Clonostachys rosea*

2.1 INTRODUCCIÓN

La fermentación microbiana se lleva a cabo con el propósito de generar moléculas orgánicas, que son invariablemente producidas en un medio líquido o sólido (Barrow, 2006). La producción masiva de hongos requiere de un proceso eficiente de estandarización, pero los estudios se han enfocado principalmente hacia la efectividad de las esporas en el manejo de enfermedades en lugar de la producción de estas por si mismas. Las esporas son generalmente producidas por fermentación en estado sólido (SSF) en granos de trigo. Otros sustratos sólidos han sido probados, como el arroz, la mezcla de turba y salvado de trigo, agar papa dextrosa, harina de maíz, salvado de avena, etc. (Viccini *et al.*, 2007). Esto es importante para la producción masiva de nuevas cepas microbianas como fuentes de nematocidas biológicos ya que la obtención de cantidades mayoritarias de éstas, permitiría su empleo en el campo y por consiguiente, contribuiría a reducir los importantes daños económicos causados por nematodos fitoparásitos (Brand *et al.*, 2004). Como otros microorganismos, los hongos pueden parasitar directamente a los nematodos o secretar metabolitos secundarios, proteínas o enzimas que afectan la viabilidad de estos fitopatógenos. Estos pueden ser moléculas de diferente tamaño y estructuralmente sencillas o complejas, así como producir efectos tóxicos e inhibitorios, los cuales han sido confirmados en varios filtrados de hongos (Das y Khosla, 2009; Dong *et al.*, 2004). Previamente, los extractos orgánicos de la cepa de *C. rosea* ha sido reportada con actividad nematostática a nivel *in vitro*, cuando es cultivada en los medio de arroz fermentado (AF) y Czapek Dox-extracto de levadura (CDL), así como el micelio seco aplicado en cultivos de tomate en condiciones protegidas. Ambos experimentos con resultados promisorios (Díaz, 2009). Sin embargo, es importante verificar la reproducibilidad de estos eventos, así como evaluar los extractos orgánicos en condiciones de invernadero también, para en un futuro continuar con la optimización del cultivo masivo de *C. rosea* para su potencial aplicación en campo. Con lo anteriormente expuesto, en el presente capítulo se cultivó la cepa de *C. rosea* en los dos medios reportados (AF y CDL) en los laboratorios de la UBT. Esto con la finalidad de corroborar la actividad nematostática de los extractos orgánicos de esta cepa, así como obtener

cantidades suficientes para su evaluación a futuro en condiciones protegidas en modelos vegetales de importancia económica.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 *Clonostachys rosea*

La cepa de *C. rosea* TH27 se obtuvo del cepario de la Unidad de Biotecnología (UBT). Esta especie se aisló a partir de hojarasca sumergida del cenote Temozón, ubicado en la localidad “La noria” de la Península de Yucatán. La identificación se realizó por taxonomía tradicional en el Instituto de Ecología de Xalapa, Veracruz por la Dra. Gabriela Heredia Abarca (De la Rosa, 2007) y por taxonomía molecular en los laboratorios de Agrobiotecnología por la Dra. Blondy Canto Canche.

2.2.2 ACTIVACIÓN DE *Clonostachys rosea*

La cepa liofilizada de *C. rosea* TH27 (Figura 2.1) se reactivó en cajas Petri conteniendo medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) en condiciones de esterilidad, posteriormente estas se incubaron a 25°C en condiciones de luz/oscuridad (12/12 horas).



Figura 2.1. Esporas de *Clonostachys rosea* liofilizadas.

2.2.3 SUSPENSIÓN DE ESPORAS (INOCULANTE)

La cepa de *C. rosea* se inoculó en cajas Petri de 100 x 15 mm conteniendo agar maíz (AM), a una temperatura de 25° C durante 7-15 días, con un fotoperiodo de 12/12 horas de luz/oscuridad para la obtención del inoculo. Al término de la incubación, a las cajas cubiertas con el hongo se le adicionaron 5 mL de solución fisiológica y con la ayuda de un portaobjetos se suspendió cuidadosamente el micelio y los conidios, los cuales se filtraron a través de capas de tela de gasa a tubos Falcon. Esta suspensión de esporas, se diluyo

a 1×10^7 esporas \cdot mL⁻¹, contando las esporas con la cámara de Neubauer (Figura 2.2) (Manacorda *et al.*, 2007).

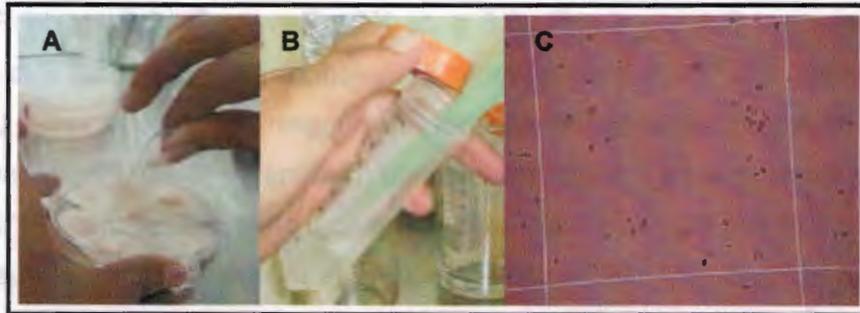


Figura 2.2. A) Desprendimiento de esporas; B) Suspensión de esporas; C) Cámara de Neubauer

Se empleó la siguiente fórmula para determinar la cantidad de esporas por mililitro:

$$\text{No. Esporas/mL} = \frac{\bar{X}}{0.1} (1000)(Dil)$$

Donde:

\bar{X} = Promedio de la suma de los cuatro campos de la cámara de Neubauer

0.1 = Constante

(1000) = Constante

(Dil) = Número de dilución

Finalmente se realizó una regla de tres para ajustar la suspensión a una concentración deseada.

2.2.4 MEDIOS PARA EL CULTIVO DE *Clonostachys rosea*

a) *Medio sólido de Arroz Fermentado (AF)*. El arroz (marca La Merced®) se lavó con agua destilada, se secó a 50°C por aproximadamente 2 horas y se trituró suavemente de manera manual. Una cantidad de 400 g de este arroz se depositaron en una botella de vidrio (20 g/botella) y se le agregó agua destilada (30 mL/botella), las cuales se mantuvieron en reposo durante 24 horas para su fermentación. Finalmente el medio se esterilizó por 30 min a 121°C y 15 lb de presión (Soman *et al.*, 2001). En cada frasco con arroz fermentado se inocularon 3 mL de la suspensión de esporas (1×10^7 esporas \cdot mL⁻¹) y se incubaron a 25°C por 40 días con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad.

b) *Medio líquido de Czapek Dox- Extracto de Levadura Modificado (CDL)*. Para un litro de solución se utilizaron 30 g de sacarosa (Productos químicos Monterrey, S.A. de C.V.®), 3 g de NaNO₃ (High Purity®), 1 g de K₂HPO₄ (J.J. Baker®), 0.5 g de MgSO₄·7H₂O (Productos químicos Monterrey, S.A. de C.V.®), 0.5 g de KCl (Fermont®), 0.01 g de FeSO₄·7H₂O (Técnica química, S.A.®) y 1 g de extracto de levadura (BBLTM Yeast Extract®). Estos reactivos se diluyeron en el termo agitador, la dilución se aforó a un 1 L con agua destilada y se ajustó el pH a 7 con ácido fosfórico (Parkinson, 1994). Finalmente, 1.5 L del medio se transfirieron a botellas Roux (150 mL/botella), se esterilizaron a 121°C y 15 lb de presión por un lapso de 30 min. A cada frasco se le inoculó 1 mL de la suspensión de esporas (1×10^7 esporas · mL⁻¹) y se mantuvieron a 25°C por 24 días en condiciones ambientales.

2.2.5 EXTRACCIÓN ORGÁNICA DE *Clonostachys rosea*

2.2.5.1 EXTRACCIÓN DEL MEDIO ARROZ FERMENTADO INOCULADO CON *C. rosea*

Al finalizar el período de crecimiento, el hongo en AF se fragmentó con una espátula, se depositó en un matraz Erlenmeyer y se maceró a temperatura ambiente con acetato de etilo por 24 horas, este proceso se repitió tres veces y en la última extracción, el disolvente se calentó 50°C por aproximadamente 30 min. Una cuarta extracción se realizó con metanol por 24 horas. Los disolventes se eliminaron a presión reducida usando un rotaevaporador marca Buchi modelo 461 con un baño de agua a 40° C, hasta el secado total de los extractos (Soman *et al.*, 2001). De esta forma se obtuvieron los extractos MAAC y MAME de acetato de etilo y metanol, respectivamente (Cuadro 2.1).

2.2.5.2 EXTRACCIÓN DEL MEDIO CZAPEK DOX-EXTRACTO DE LEVADURA INOCULADO CON *C. rosea*

El medio con el crecimiento micelial de *C. rosea* se separó por filtración rápida a través de tela de gasa y servitoallas de papel. El micelio se extrajo siguiendo el mismo proceso que con el medio AF, hasta obtener los extractos orgánicos MCAc y MCMe de acetato de etilo y metanol, respectivamente. El filtrado se sometió a una partición líquido-líquido con BuOH (1:2) y después de eliminar el disolvente se obtuvo el extracto FCBu (Cuadro 2.2; Figura 2.3).

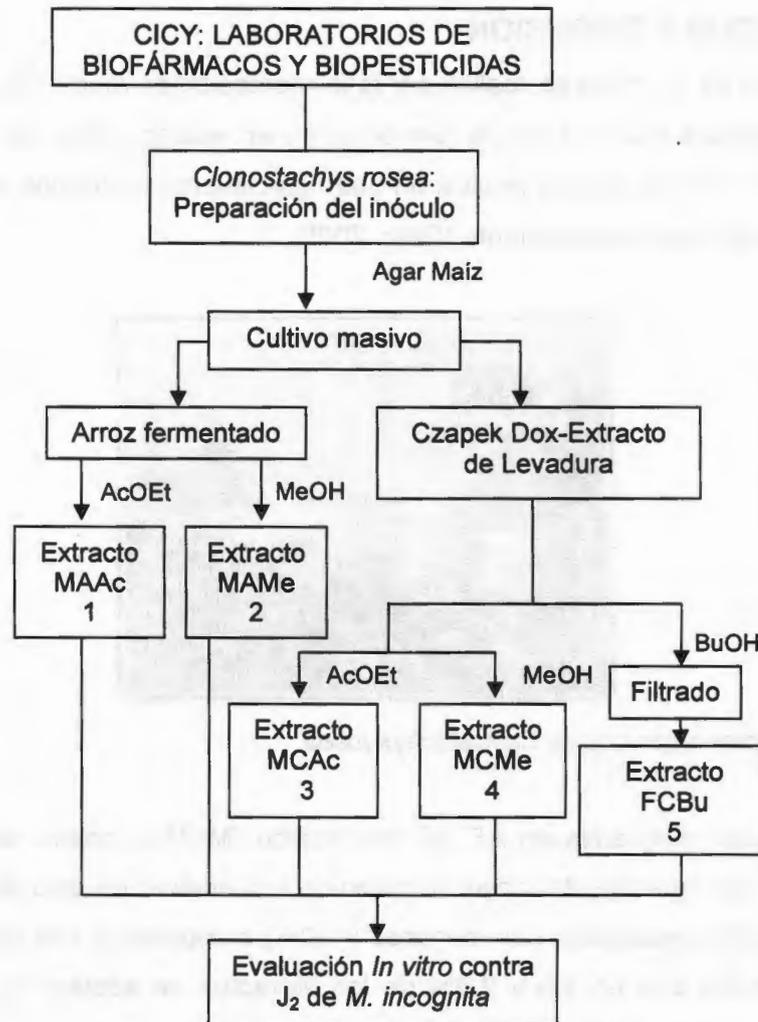


Figura 2.3. Estrategia experimental para la obtención de los extractos orgánicos de *Clonostachys rosea* para la evaluación *in vitro* contra J₂ de *Meloidogyne incognita*.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo masivo de *C. rosea* se realizó por la fermentación en medio líquido Czapek Dox-Extracto de levadura (CDL) y por la fermentación en estado sólido en granos de arroz fermentado (AF). Los resultados mostraron buen crecimiento en ambos medios de cultivo, como se había reportado previamente (Díaz, 2009).



Figura 2.4. Extractos orgánicos de *Clonostachys rosea*

Entre los extractos cultivados en AF, el metanólico (MAMe) mostró un rendimiento de 1.26%, siendo este ligeramente mayor al obtenido con acetato de etilo (MAAc) con 1.01% (Cuadro 2.1). Estos resultados son menores (<50%) comparados con el cultivo realizado en estudios previos con un 2.5 y 2.6% de los extractos de acetato de etilo y metanol, respectivamente (Díaz, 2009).

Cuadro 2.1. Rendimiento de los extractos orgánicos del hongo *C. rosea* cultivado en arroz fermentado (400 g).

Clave de extracto	Extracto total (g)		Rendimiento % (g ET/100g AF)	
	AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH
MAAc	4.0705	-	1.01	-
MAMe	-	5.0655	-	1.26
Blanco-AF	-	-	0.049	0.08

M: Micelio; A: Arroz; Ac: acetato de etilo; Me: Metanol; ET: Extracto total; AF: Arroz fermentado

En cuanto a los extractos obtenidos en el cultivo líquido CDL, todos presentaron bajos rendimientos, siendo el metanólico (MCM_e) el más alto con 0.082%, seguido del extracto de acetato de etilo (MCAc) con 0.036% g/100 mL, el más bajo correspondió al del filtrado de cultivo extraído con butanol (FCBu) con la cantidad de 0.0242% (Cuadro 2.2). Por el contrario estos rendimientos son mucho menores en comparación con el trabajo reportado, del orden de 0.19 y 0.11% en los extractos de acetato de etilo y metanol, respectivamente del micelio cultivado en CDL (Díaz, 2009).

Cuadro 2.2. Rendimientos de extractos orgánicos de *C. rosea* cultivada en Czapek Dox-Extracto de levadura (CDL, 1.5 L).

Clave de extracto	Extracto total (g)			Rendimiento % (g ET /100 mL CDL)		
	AcOEt	MeOH	BuOH	AcOEt	MeOH	BuOH
MCAc	0.5379	-	-	0.036	-	-
MCM _e	-	1.2369	-	-	0.082	-
FCBu	-	-	0.7255	-	-	0.0242
Blanco-CDL	-	-	-	0.003	-	-

M: Micelio; C: Czapek Dox-Extracto de levadura; F: Filtrado Ac: acetato de etilo; Me: Metanol; Bu: Butanol; ET: Extracto total.

La variabilidad de los rendimientos en los cultivos puede deberse a diferentes factores, entre ellos a la marca del sustrato utilizado, al cambio de alguno de los factores ambientales que no se haya controlado por diversos factores. Otro factor a considerar es la mutación de la cepa por algún manejo inadecuado en su almacenamiento. Por lo tanto, se recomienda repetir los cultivos para monitorear y mejorar las condiciones de cultivo.

En general, los dos cultivos presentaron rendimientos que pueden considerarse promedio en cultivos tanto sólidos como en líquidos (Chí, 2008; Pérez, 2007), los cuales pueden incrementarse en estudios de optimización cuando la cepa candidato lo justifique, dada su importancia biotecnológica. El proceso de estandarización para la producción masiva de *C. rosea*, así como de cualquier otra cepa fúngica que sea de interés biotecnológico es sumamente importante debido a que debe contarse con método confiable y reproducible para que sea llevado a escalar a otros niveles fuera del laboratorio. La producción de micelio y esporas de *C. rosea* se han obtenido por fermentación en estado líquido en los medios PDB, V8, Czapek Dox, etc., (Mamaradabi *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2000) entre otros; también se han cultivado en estado sólido principalmente en granos

de trigo (Ravnskov *et al.*, 2006; Sutton *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha reportado que la fermentación en estado sólido (FES) tiene dos ventajas sobre la fermentación en estado líquido. Primero, las esporas fúngicas producidas por la FES son típicamente más robustas y tiene más vida útil que las producidas por la fermentación en estado líquido. Segundo, los procesos de FES pueden llevarse a cabo por personas que no son altamente capacitadas. Por lo tanto, con la FES puede ser posible la transferencia de tecnología para la producción del material deseado en forma masiva (Viccini *et al.*, 2007). Esto es importante, porque con ello se podría obtener un mejor material biológico que permita obtener extractos orgánicos con altos rendimientos. En una siguiente etapa es imprescindible detectar a él o los metabolitos responsables de la actividad biológica, de tal forma que se lleve a cabo una purificación biodirigida para aislar e identificar la estructura química de los principios nematocidas de la cepa *C. rosea* TH27. Estos metabolitos serán los estándares para monitorear los extractos producidos en los procesos de optimización y control de calidad de los cultivos masivos.

2.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrow, R. (2006). Isolation of Microbial Natural Products, in: *Methods in Biotechnology*, Sarker, S.D., Z. Latif y A.I. Gray (eds). Natural Products Isolation, 2nd ed. Humana Press Inc. New Jersey. pp. 391-414.
- Brand, D., S. Roussos, A. Pandey, P.C. Zilioli, J. Pohl y C.R. Soccol (2004). Development of a Bionematicide With *Paecilomyces lilacinus* to Control *Meloidogyne incognita*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118, 81-88.
- Chi, W. (2008). Obtención de extractos fúngicos con propiedades antimicrobianas y antiprotozoarias. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. México. 53 p.
- Das, A. y C. Khosla (2009). Biosynthesis of Aromatic Polyketides in Bacteria. *Accounts of chemical research* 42(5), 631-639.
- De la Rosa, S. (2007). Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la península de Yucatán. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 184 p.
- Díaz, A. (2009). Uso de *Clonostachys rosea* Samuels, Seifert & Gams para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, en condiciones protegidas. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México. 67 p.
- Dong, J.Y., Z.X. Zhao, L. Cai, S.Q. Liu, H.R. Zhang, M. Duan y K.Q. Zhang (2004). Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Fungal Diversity* 15, 125-135.
- Jensen, B., I.M.B. Knudsen y D.F. Jensen (2000). Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 106, 233-242.
- Mamarabadi, M., B. Jensen y M. Lübeck (2008). Three endochitinase-encoding genes identified in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* are differentially expressed. *Current Genetics*, 54, 57-70.
- Manacorda, A.M., D.P. Cuadros y A. Alvarez (2007). *Manual de Microbiología Ambiental I*, 2a edición. Universidad Nacional del Comahue. Buenos Aires. 69 p.
- Parkinson, D. (1994). Filamentous fungi, in: *Methods of Soil Analysis part 2*, Soil Science Society of America (ed). *Microbiological and Biochemical Properties*. USA. pp. 329-349.

- Pérez, J. (2007). Obtención de extractos fúngicos con propiedades nematostáticas. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México. 45 p.
- Ravnskov, S., B. Jensen, I.M.B. Knudsen, L. Bodker, D.F. Jensen, L. Karlinski y J. Larsen (2006). Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 3453-3462.
- Soman, A.G., J.B. Gloer, R.F. Angawi, D.T. Wicklow y P.F. Dowd (2001). Vertilecanins: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products* 64(2), 189-192.
- Sutton J.C., W. Liu, R. Huang y N. Owen-Going (2002). Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse Tomatoes. *Biocontrol Science and Technology*, 12(4), 413-425.
- Viccini, G., M. Mannich, D.M. Fontana, R. Valdebenito-Sanhueza y D.A. Mitchell (2007). Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry* 42, 275-278.
- Zhao, M.L., J.S. Huang, M.H. Mo y Zhang, K.Q. (2005). A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. *Fungal Diversity* 19, 217-234.

CAPITULO III.

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE EXTRACTOS FÚNGICOS CONTRA J₂ DE
*Meloidogyne incognita*****3.1 INTRODUCCIÓN**

Los hongos, como otros microorganismos, pueden parasitar directamente a los nematodos y/o secretar sus metabolitos nematocidas y/o enzimas que afectan su viabilidad (Shinya *et al.*, 2008). La evaluación de un gran número de cepas fúngicas para la detección de sus propiedades antagónicas en nematodos, en investigaciones a nivel invernadero, puede ser intensivamente laboriosa y tardada. Un método *in vitro* rápido para detectar candidatos con potencial nematocida ayudaría en la preselección de estos para continuar con ensayos a nivel invernadero. Dicho procedimiento ha sido utilizado con éxito con otros organismos microbianos (Meyer *et al.*, 2004; Nitao *et al.*, 1999). Los bioensayos en nematodos se enfocan a detectar los efectos de las muestras a evaluar sobre la eclosión de huevos y la movilidad de los juveniles en el segundo estadio (J₂) (Liu *et al.*, 2008; Nitao *et al.*, 2001). Un parámetro a considerar es obtener los huevos libres de contaminación microbiana y en grandes cantidades. Para esto, los huevos no contaminados pueden ser producidos a partir del cultivo monoxénico en explantes de raíz. Alternativamente, nematodos cultivados en plantas mantenidas en invernadero pueden proveer una fuente abundante de huevos (Nitao *et al.*, 2002; Nitao *et al.*, 1999). Con la finalidad de complementar la exploración nematocida realizada previamente (Reyes-estebanez *et al.*, 2011; Herrera-Parra, 2007) en el presente capítulo se evaluaron 20 extractos fúngicos (Cuadro 3.1) obtenidos de hongos anamorficos, seleccionados del banco de extractos de la UBT. Estos extractos se evaluaron en el ensayo nematocida *in vitro* contra J₂ de *M. incognita*. También, se evaluaron aquellos extractos generados en los cultivos masivos de *C. rosea* (Cuadro 2.1 y 2.2).

Cuadro 3.1. Extractos de diferentes cepas fúngicas evaluados *in vitro* contra J₂ de *M. incognita*.

	Cepa	Disolvente Utilizado	Clave de Extractos
1	<i>Cladosporium</i> sp. 2XA10	Acetato de etilo	SRH-86
2	<i>Colletotrichum</i> sp. TH17	"	SRH-48
3	<i>Colletotrichum</i> sp. XH1G4	"	SRH-45
4	<i>Fusarium</i> sp. 2XA6	"	SRH-62
5	<i>Helicosporium talbootii</i> Goos, MR48 ^a	"	MRH-48
6	<i>Penicilium citrinum</i> Corda, XR1b	"	SRH-66
7	<i>Ramichloridium apiculatum</i> J.H. Mill., Giddens y A.A. Foster) de Hoog, MR39 ^a	"	MRH-39
8	<i>Verticillium</i> sp. TH8	"	SRH-53
9	<i>Volutella</i> sp. TH22	"	SRH-61
10	<i>Volutella</i> sp. TH24	"	SRH-51
11	TA26	"	SRH-54
12	TS23	"	SRH-70
13	2TA4	"	SRH-71
14	2TA7	"	SRH-74
15	2TA8	"	SRH-75
16	2TS1	"	SRH-57
17	2TS5	"	SRH-56
18	2TS9	"	SRH-60
19	2TS18	"	SRH-63
20	2XA11	"	SRH-79
21	<i>Clonostachys rosea</i> Schroers, Samuels, Siefert & Gams TH27	"	MCAc
22	"	Metanol	MCMc
23	"	Butanol	FCBu
24	"	Acetato de etilo	MAAc
25	"	Metanol	MAMc
26	"	"	MCMc-2007
27	"	"	MAMc-2009
28	"	Acetato de etilo	AR-3A
29	"	Metanol	AR-3B

M: Micelio; **C:** Czapek Dox-Extracto de levadura; **A:** Arroz; **Ac:** acetato de etilo; **Me:** Metanol; **Bu:** Butanol; **AR:** Ana Ruiz; **3A:** *C. rosea* Acetato **3B:** *C. rosea* Metanol; ^aaislamiento hecho por Reyes-Estebanez *et al.*, 2011.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 OBTENCIÓN DE J₂ DE *Meloidogyne incognita*

Las plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq) infectadas con *M. incognita* se obtuvieron de invernaderos de Xmatkuil, Yucatán. Las raíces de chile habanero con agallas se llevaron al laboratorio, se lavaron con agua corriente y se separaron las agallas. Las masas de huevos, se depositaron en cajas Petri de cristal de 10 cm de diámetro con agua destilada; para la eliminación de tierra adherida a ellas posteriormente se lavaron en tamices de malla No. 325 y No. 400, una sobre otra, respectivamente para la eliminación de tierra adherida a ellas. Estas masas con huevos se desinfestaron con hipoclorito de sodio comercial al 1% por un minuto, para el desprendimiento de los huevos contenidos en la masa gelatinosa y la eliminación de microorganismos. Se realizó un segundo lavado nuevamente con agua para eliminar residuos del hipoclorito de sodio y se transfirieron a cajas Petri. Con agua destilada se mantuvieron en incubación a 33 ± 2 °C, hasta la eclosión de los huevos. Las larvas en el estado J₂ se traspasaron a cajas Petri mas pequeñas para facilitar su captura en el momento de establecer las evaluaciones de los extractos fúngicos (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Nitao *et al.*, 1999; Ayoub, 1977).

3.2.2 IDENTIFICACIÓN DE *Meloidogyne incognita*

Para la extracción de hembras y su identificación se seleccionaron las raíces de chile habanero colectadas, se cortaron y se lavaron con agua de la llave y con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por un tiempo de cuatro minutos. Posteriormente, se eliminaron los residuos del hipoclorito de sodio, se enjuagaron y se dejaron reposar en un recipiente con agua corriente por espacio de 15 minutos, finalmente se envolvieron en tela tipo gasa. Un mL de solución madre de fucsina ácida (3.5 de fucsina en 250 ml de ácido acético y 750 ml de agua destilada) se disolvió hasta 50 mL con agua destilada. Las raíces limpias se sumergieron en la fucsina ácida previamente diluida y se colocaron en un termo agitador a punto de ebullición durante 30 segundos, una vez transcurrido este tiempo, se retiraron y se dejaron a enfriar (Daykin y Hussey, 1985). Una vez fría la fucsina, se sacaron las raíces, se lavaron con agua corriente y se depositaron en frascos con glicerina para conservarlas. Para extraer a las hembras, las raíces se disectaron con la ayuda de jeringas. A las hembras se les realizó cortes perineales y cortes de la región anterior con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Ayoub, 1977). Estas se

colocaron sobre porta objetos, preparados con anillos de cera, a los cuales se les agregó glicerina al 100% y un cubreobjetos, se etiquetaron y se dejaron en la plancha de calentamiento a 60 °C hasta que sellaron. La identificación de especies de *Meloidogyne* se realizó mediante reconocimiento del patrón perineal y forma del estilete de la hembra. También se realizaron montajes permanentes de machos; para su identificación se consideraron la forma de la cápsula cefálica y del estilete del macho. Las observaciones se hicieron con un microscopio compuesto Zeiss y las fotos se tomaron directamente con una cámara Canon con un aumento de 400 veces (Figura 3.1 y 3.2) (Góngora, 2011; Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Eisenback *et al.*, 1983).

3.2.3 BIOENSAYO *IN VITRO* PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE EXTRACTOS FÚNGICOS

En el presente trabajo se evaluaron *in vitro* los diferentes extractos fúngicos (Cuadro 3.1), a una dosis de 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (300 ppm), los controles negativos utilizados correspondieron a una mezcla de DMSO+TWEEN 20%, los extractos metanólicos y de acetato de etilo del medio AF (AF-Ac y AF-Me), un extracto de acetato de etilo del medio CDL (CF-Ac) y agua destilada. Como control positivo se utilizó Vydate (Oxamyl) a una concentración de 1 $\mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$. Cada tratamiento se repitió cuatro veces bajo condiciones de laboratorio y se emplearon placas de pocillos marca *Orange Scientific* para la evaluación. En cada pocillo se depositaron 1990 μl de agua destilada estéril y el extracto fúngicos a evaluar resuspendido en 10 μl de la mezcla DMSO-Tween 20% en cada pocillo. Finalmente se depositaron 20 juveniles viables del segundo estadio (J_2) de *M. incognita* y la actividad nematocida se evaluó a las 24 y 48 horas. La inmovilización se corroboró utilizando un pincel con el cual se estimulo al nematodo en su región cefálica, si no hubo respuesta de movimiento al estímulo se consideró no viable. Con el porcentaje de muerte se sacaron promedios para conocer los tratamientos que causen al menos el 50% de efectividad (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Ayoub, 1977).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA ESPECIE *M. incognita*

3.3.1.1 HEMBRAS

Los análisis morfológicos de los cortes perineales de las hembras observados al microscopio correspondieron a los de la especie *M. incognita*, los cuales presentaron un arco dorsal alto y cuadrado, formado por estrías generalmente de lisas a onduladas (Figura 3.1) (Eisenback *et al.*, 1983). El cono del estilete se observó curvado dorsalmente, la columna ligeramente más ancha en la base y los nódulos fueron anchos y planos, características típicas en *M. incognita* (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006).

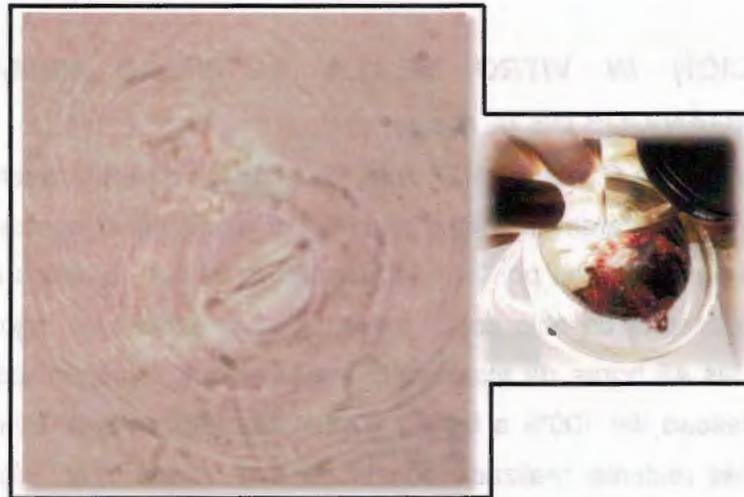


Figura 3.1. Corte perineal de una hembra de *M. incognita*.

3.3.1.1 MACHOS

La capsula cefálica es alta y ancha, con disco labial cóncavo, labios medios separados. El estilete de forma roma, nódulos basales redondeados a elongados (Figura 3.2) (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Eisenback *et al.*, 1983).

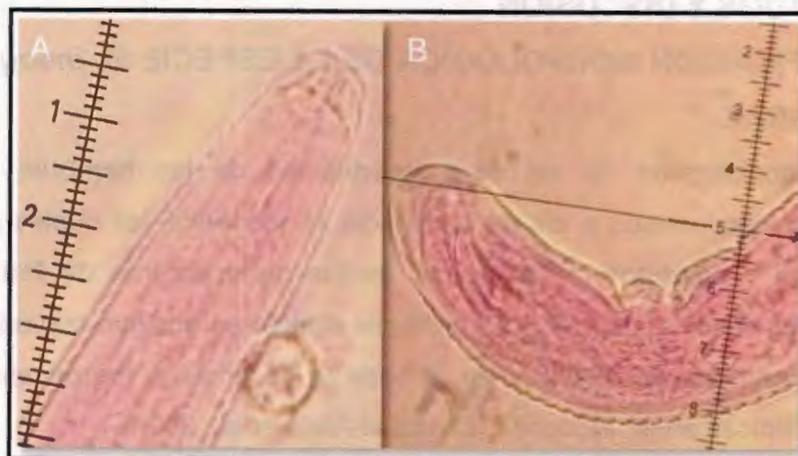


Figura 3.2. Macho de *M. incognita*: **A)** región de la cabeza; **B)** región de la cola.

3.3.2 EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *C. rosea*

Los extractos orgánicos de *C. rosea* TH27 obtenidos con los distintos disolventes (AcOEt, MeOH y BuOH) no mostraron actividad nematocida significativa contra los J₂ de *M. incognita*, después de exponerse por 24 y 48 horas (Figura 3.3). El único extracto el cual correspondió al de acetato de etilo de *C. rosea* (AR-3A) exhibió un bajo porcentaje de actividad (21%) a las 48 horas de exposición, mientras que el control positivo (Vydate) presentó una mortalidad del 100% a las 24 y 48 horas (Figura 3.4). El extracto AR-3A correspondió al más reciente realizado con la cepa *C. rosea* TH27 (Ruíz, 2011). En estudios previos, el extracto metanólico (CRA-MCM) de la misma cepa de *C. rosea* cultivada bajo las mismas condiciones de crecimiento que las utilizadas en el presente estudio demostraron poseer actividad nematocida a las 24 y 48 horas en un porcentaje de mortalidad de hasta 97.7 y 100% respectivamente (Díaz, 2009). También Herrera, (2007) realizó evaluaciones *in vitro* de extractos de la misma cepa de *C. rosea* TH27 y menciona que el extracto de acetato de etilo mostró actividad nematocida contra J₂ de *M. incognita* a las 24 horas en un 87%. Con todo lo mencionado, en el presente trabajo se pretendía continuar estudiando los extractos miceliales de la cepa *C. rosea* TH27 para corroborar las propiedades *in vitro* y darle continuidad al estudio de la cepa, pero al no obtener los resultados deseados no se pudo continuar con la siguiente etapa que es la de evaluación a nivel invernadero.

La pérdida de la actividad nematocida de los extractos orgánicos evaluados de la cepa de *C. rosea* TH27 en el presente estudio, podría deberse a diversos factores. Entre ellos al tiempo de obtención del extracto, a las condiciones de almacenaje del extracto, en el caso de los extractos más antiguos. Asimismo, puede atribuirse a la senescencia de la cepa y a las condiciones de cultivo a que se somete en laboratorio para su desarrollo, proporcionándole los nutrientes necesarios y con ello no tenga la necesidad de sintetizar moléculas con cierta toxicidad que les confiere la actividad nematocida. En general estos compuestos bioactivos se producen en estado de estrés por escases de alimento, por competencia del mismo con otros hongos u organismos en su entorno o por factores abióticos. A pesar de que *C. rosea* se encuentra distribuida en una gran variedad de suelos alrededor del mundo, se ha reportado de que no todas las cepas de *C. rosea* tienen la misma morfología, reproductibilidad o el mismo material genético (Stewart y Brown, 2006). Como se menciona anteriormente todos estos factores podrían haber influido en la actividad nematocida de los extractos orgánicos de *C. rosea* TH27.

Por otra parte, a partir de cultivos en fermentado de trigo de la cepa *C. rosea* 1A se obtuvieron nueve compuestos, cinco nuevos de tipo verticilina denominados Gliocladina A, B, C, D y E; y cuatro conocidos, Verticilina A, 11'-deoxyverticilina A, Sch52900 y Sch52901 los cuales exhibieron capacidad nematocida *in vitro* contra los nematodos no patógenos *Caenorhabditis elegans* y *Panagrellus redivivus*; siendo el 11'-deoxyverticilina A el más potente con una DE_{50} de 10 y 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Además observaron que los compuestos Gliocladina A y B causaron una mortalidad de por lo menos el 50% en *C. elegans* y *P. redivivus* a bajas concentraciones (25-50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) a las 24 horas, Sin embargo, no menciona actividad alguna contra especies del género *Meloidogyne* (Dong *et al.*, 2005).

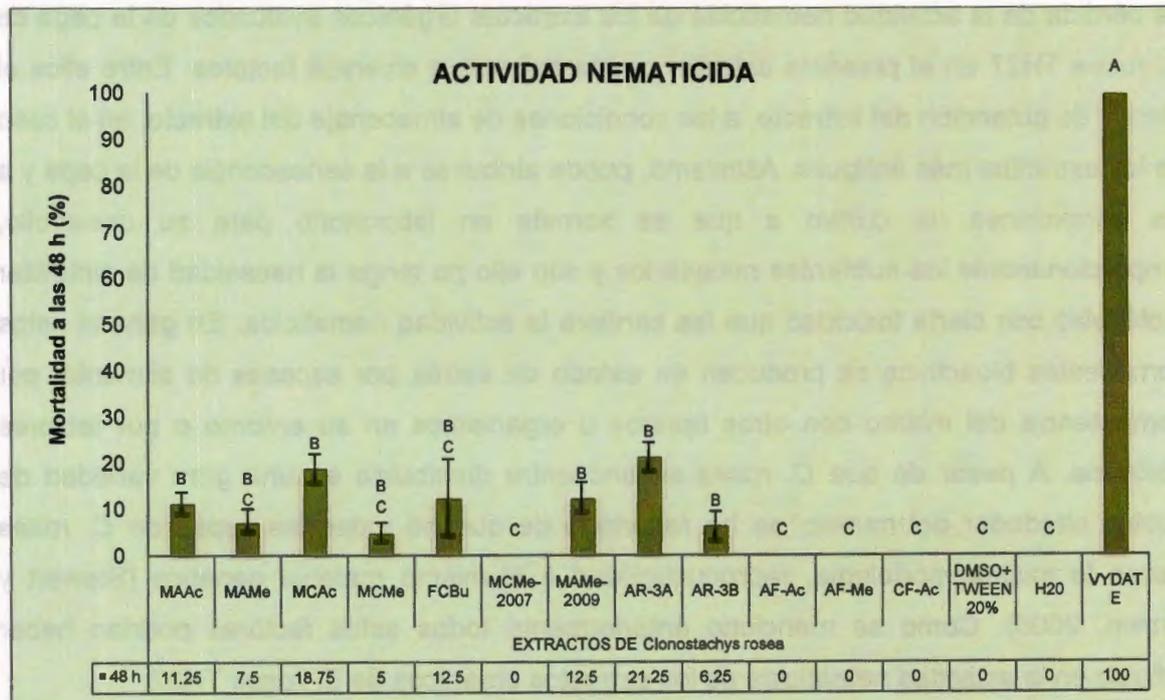


Figura 3.3. Efecto nematicida de los extractos de *Clonostachys rosea* evaluados contra J₂ de *M. incognita* a las 48 horas de exposición. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05).

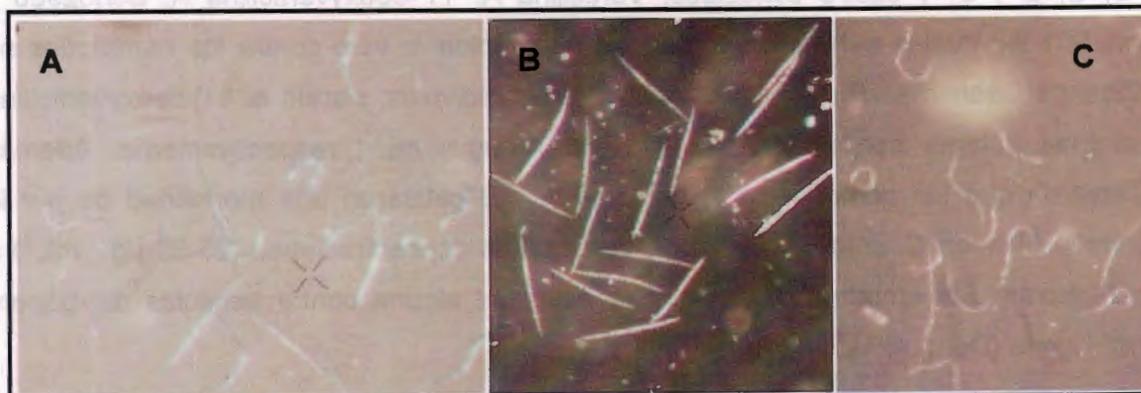


Figura 3.4. Ejemplo de la evaluación de uno de los extractos A) AR-3A sin actividad nematicida; B) Control positivo (Vydate); C) Control negativo (DMSO-Tween 20%).

3.3.3 EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA DE EXTRACTOS DE DISTINTAS CEPAS FUNGICAS

Los veinte extractos orgánicos selectos de distintas cepas fúngicas (Cuadro 3.1) se evaluaron contra J₂ de *M. incognita* a las 24 y 48 horas a 300 µg · ml⁻¹. Los resultados de la evaluación mostraron que ninguno de los extractos fúngicos seleccionados presentaron porcentajes de inhibición de *M. incognita* considerados efectivos (≥50%) observando la viabilidad de los J₂ al ser estimulados en la región cefálica con un pincel (Figura 3.5). En el extracto de la cepa *Verticillium* sp. TH8 (SRH-53) se observó un 31% de inmovilidad en los J₂ de *M. incognita* a las 48 horas, siendo este el más alto en cuanto a mortalidad con respecto a los demás tratamientos. Por otra parte el control positivo (Vydate) como se esperaba, exhibió el 100% de inmovilidad de los J₂ tanto a las 24 horas como a las 48 horas, siendo este el más mortal con respecto a todos los tratamientos (Figura 3.6).

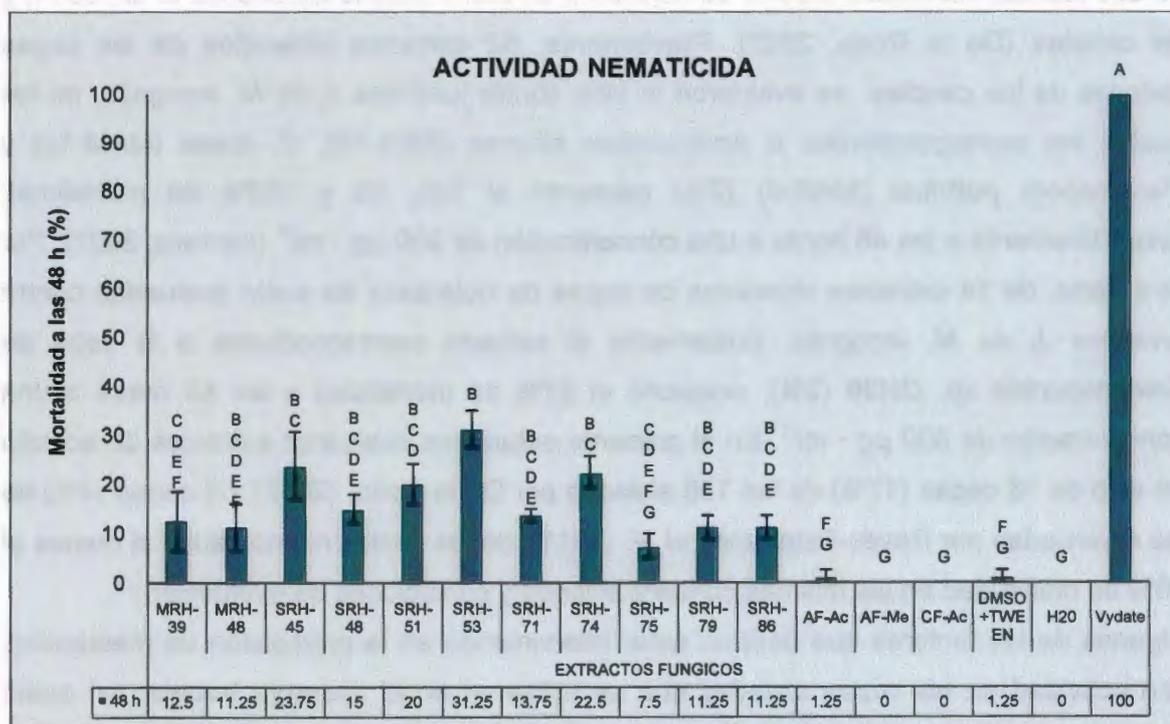


Figura 3.5. Efecto nematocida a las 48 horas de extractos fúngicos evaluados contra J₂ de *M. incognita*. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05).

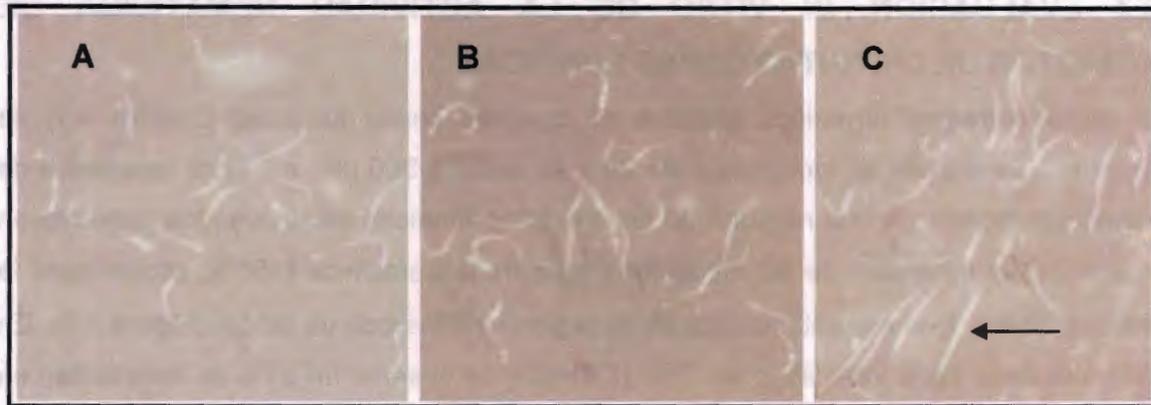


Figura 3.6. Evaluaciones de los extractos fúngicos sin actividad Nematicida: **A)** *Volutella* sp. TH22 (SRH-61); **B)** 2TS9 (SRH-60); **C)** Ligera inmovilidad de J_2 de *M. incognita* por el extracto de *Verticillium* sp. TH8 (SRH-53).

Los extractos evaluados se seleccionaron del cepario de la UBT, los cuales se originaron de dos fuentes diferentes, a partir de hojarasca en suelo (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011) y de cenotes (De la Rosa, 2007). Previamente, 62 extractos obtenidos de las cepas aisladas de los cenotes se evaluaron *in vitro* contra juveniles J_2 de *M. incognita*, de los cuales los correspondientes a *Acremonium kiliense* (SRH-16), *C. rosea* (MAM-1o) y *Papulospora pallidula* (MAM-if) (2%) causaron el 100, 50 y 100% de mortalidad, respectivamente a las 48 horas a una concentración de $300 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Herrera, 2007). Por otra parte, de 14 extractos obtenidos de cepas de hojarasca de suelo evaluadas contra juveniles J_2 de *M. incognita*, únicamente el extracto correspondiente a la cepa de *Selenosporella* sp. GH26 (2%), ocasionó el 82% de mortalidad a las 48 horas a una concentración de $300 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. En el presente estudio se evaluaron extractos de acetato de etilo de 18 cepas (17%) de las 106 aisladas por De la Rosa, (2007) y 2 cepas (4%) de las 47 aisladas por Reyes-Estebanez *et al.* (2011), de los cuales ni uno causó al menos el 50% de mortalidad en las mismas concentraciones y condiciones de evaluación.

Algunos de los factores que podrían estar interviniendo en la producción de metabolitos con actividad en las cepas aisladas que se utilizaron en el presente trabajo, así como otras reportadas por otros autores, sean factores bióticos como abióticos. Esto atribuido al grado de interacción que hay entre los microorganismos en el ambiente, ya sea acuático o terrestre, debido a la competencia de espacio y alimento, así como factores de humedad, luz, pH, etc.

Dong *et al.* (2008), indicaron que el grado de actividad de los cultivos de los hongos varían según las especies de los hongos/aislamiento, parte del hongo que se extrajo, por los valores de pH de las soluciones del ensayo, la duración del tiempo de exposición del producto a evaluar sobre el organismo fitopatógeno, la edad de los nematodos y a la composición del medio. Ellos reportaron el aislamiento de 212 hongos terrestres provenientes de montañas en China, cuyos extractos acuosos se sometieron a pruebas *in vitro* para el monitoreo de actividad contra el nematodo del pino *Bursaphelenchus xylophilus*, de los cuales 83 cepas (39%) exhibieron efectividad. De estas, 12 cepas (*Amanita fulva*, *Amauroderma macer*, *Boletus* sp. (3 cepas) *Collybia dryophila*, *Cyathus* sp., *Pezinza* sp., *Pluteus fulve*, *Xerocomus chrysenteron*, *Leatiporus sulphureu* y *Laccaria tortilis*) causaron por al menos el 80% de inmovilidad *in vitro* en *B. xylophilus* a las 48 horas. También, aislaron y sometieron los extractos acuosos de 119 hongos, derivados de madera sumergida en agua dulce de diferentes habitat en China, de los cuales 88 cepas (74%) exhibieron propiedades nematicidas contra *B. xylophilus* y de éstas, 16 especies (*Aunulatascus* sp., *Caryospora callicarpa*, *Diaporthe* sp., *Dictyosporium heptasporum*, *Dyrithiopsis lakefuxianensis*, *Helicomyces roseus*, *Leptosphaeria* sp., *Nectria* sp., *Ophioceras cummune*, *Phoma* sp., *Phomatospora berkeley*, *Pseudohalonectria adversaria*, *Pseudohalonectria lignícola*, *Savoryella lignícola*, *Torula herbarum* y *Xylaria* sp.) causaron por al menos el 90% de mortalidad en el nematodo a las 48 horas de exposición *in vitro*.

La búsqueda a nivel mundial de alternativas naturales para controlar nematodos es aún insuficiente, sin embargo, existen reportes de productos de origen microbiano con resultados promisorios para el combate de nematodos fitopatógenos (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Productos y extractos naturales provenientes de cepas fúngicas con actividad nematocida contra J₂ de *Meloidogyne incognita*.

CEPA	SITIO DE AISLAMIENTO	PARTE	EXTRACTO (Concentración)	COMPUESTO (Concentración)	% MORTALIDAD 48 horas	AUTOR(ES)
<i>Selenospora</i> sp. GH26	Hojarasca	Micelio	EtOAc (300 µg/ml)	NI	82	Reyes-Estebanez <i>et al.</i> , 2011.
"		Micelio Filtrado	EtOAc (300 µg/ml)	NI NI	90 100	Pérez, 2007
<i>Fusarium compactum</i> L175	Huevos de <i>Heterodera glycines</i>	Filtrado	-	NI	86	Meyer <i>et al.</i> , 2004.
<i>F. equiseti</i> L317		"	-	NI	85	
<i>Penicillium</i> sp. L353		"	-	NI	83	
<i>Diaporthe phaseolorum</i> E99382	Órganos de plantas	Filtrado	EtOAc	Ácido 3-hidroxipropionico (3-HPA) (50 µg/ml)	90	Schwarz <i>et al.</i> , 2004.
<i>Melanconium stilbostoma</i> E00145, E00153, E01036 y E01051	"	"	-	"	"	
<i>Chaetomium globosum</i> L250	Hembras de <i>Heterodera glycines</i>	Filtrado	MeOH	Flavipina (120 µg/ml)	> 90	Nitao <i>et al.</i> , 2002.
<i>Fusarium equiseti</i>	Hembras de <i>Heterodera glycines</i>	Filtrado	Fracción EtOAc	4,15-diacetilnivalenol (25 µg/ml) Diacetoxyscirpenol (25 µg/ml)	80	Nitao <i>et al.</i> , 2001.
<i>Omphalotus olearius</i> TA90170	Esporas de cuerpos fructíferos	Micelio	MeOH	Omfalotina (100 µg/ml)	80	Mayer <i>et al.</i> , 1997; Sternner <i>et al.</i> , 1997.

NI: No identificado

3.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayoub, M.S. (1977). Plant nematology an agricultural training aid. Departament of food and agriculture division of plant industry laboratory services. Nematology. USA. 157 p.
- Cristóbal-Alejo, J., J.M. Tun-Suárez, S. Moguer-Catzin, N. Marbán-Mendoza, L. Medina-Baizabal, S. Simá-Polanco, R. Peraza-Sánchez y M. Gamboa-Angulo (2006). *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. *Nematopica*, 36(1), 89-97.
- Daykin, M. y R. Hussey (1985). Staining and histopathological techniques in nematology. In: *An advanced treatise on Meloidogyne methodology*, Bartker 2 (ed). pp. 35-36.
- De la Rosa, S. (2007). Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la península de Yucatán. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 184 p.
- Díaz, A. (2009). Uso del hongo *Clonostachys rosea* Samuels, Seifert & Gams para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, en condiciones protegidas. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México. 76 p.
- Dong, J., G. Li y K. Zhang (2008). Screening and isolation of anti-nematodal metabolites against *Bursaphelenchus xylophilus* produced by fungi and plant, in: Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems, M.M. Mota y P. Vieira (eds). Springer Science Business. China. pp. 347-358.
- Dong, J.Y., H.P. He, Y.M. Shen y K.Q. Zhang (2005). Nematicidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *Journal of Natural Products*, 68(10), 1510-1513.
- Eisenback, J.D., H. Hirschman y J.N. Sasser (1983). Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* especies). I.M.P. del Proyecto Internacional de *Meloidogyne* (ed). Carolina del Norte. pp. 17-21.
- Góngora, A. (2011). Distribución espacial de *Meloidogyne* spp. en chile habanero (*Capsicum chinense* jacq.) en Yucatán. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México. 48 p.
- Herrera, E. (2007). Actividad nematostática de extractos fúngicos y vegetales contra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White.) Chitwood. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Conkal. México. 57 p.

- Liu, T., L. Wang, Y.X. Duan y X. Wang (2008). Nematicidal activity of cultura filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 113-118.
- Mayer, A., H. Anke y O. Sterner (1997). Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematicidal activity from *Omphalotus olearius* I. Fermentation and biological activity. *Natural Product Letters*, 10, 25-32.
- Meyer, S.L.F., R.N. Huettel, X.Z. Liu, R.A. Humber, J. Juba y J.K. Nitao (2004). Activity of fungal cultura filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. *Nematology*, 6(1), 23-32.
- Nitao, J.K., S.L.F. Meyer y D.J. Chitwood (1999). *In-vitro* assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode antagonistic fungal compounds. *Journal of Nematology*, 31(2), 172-183.
- Nitao, J.K., S.L.F. Meyer, J.E. Oliver, W.F. Schmidt y D.J. Chitwood (2002). Isolation of flavipin, a fungus compound antagonistic to plant-parasitic nematodes. *Nematology* 4(1), 55-63.
- Nitao, J.K., S.L.F. Meyer, W.F. Schmidt, J.C. Fettingner y D.J. Chitwood (2001). Nematode-Antagonistic trichothecenes from *Fusarium equiseti*. *Journal of Chemical Ecology*, 27(5), 859-869.
- Pérez Cruz, J. (2007). Obtención de extractos fúngicos con propiedades nematostáticas. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal. México. 45 p.
- Reyes-Estebanez, M., E. Herrera-Parra, J. Cristóbal-Alejo, G. Heredia-Abarca, B. Canto-Canché, I. Medina-Baizabal y M. Gamboa-Angulo (2011). Antimicrobial and nematicidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 5(9), 1083-1089.
- Schwarz, M., B. Köpcke, R.W.S. Weber, O. Sterner y H. Anke (2004). 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry*, 65, 2239-2245.
- Shinya, R., D. Aiuchi, A. Kushida, M. Tani, K. Kuramochi y M. Koike (2008). Effects of fungal cultura filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(3), 291-297.

Sterner, O., W. Etzel, A. Mayer y H. Anke (1997). Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematocidal activity from *Omphalotus olearius* II. Isolation and structure determination. *Natural Product Letters*, 10, 33-38.

Stewart, J. y W. Brown (2006). The production and use of endophytes as novel inoculants for promoting enhanced plant vigor, health, growth, yield reducing environmental stress and for reducing dependency on chemical pesticides for pest control. International application published under the patent cooperation treaty. World Intellectual Property Organization, 1-64.

CAPITULO IV.

ESTABLECIMIENTOS DE DOS ENSAYOS DE INOCUIDAD Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES CON PROPIEDADES PLAGUICIDAS**4.1 INTRODUCCIÓN**

La degradación de ecosistemas terrestres y acuáticos debido a los xenobióticos es un problema recurrente y seriamente impactante. Este es un resultado directo del aumento del uso de diversos productos tóxicos, como los plaguicidas sintéticos, con el fin de aumentar la productividad en los campos agrícolas. Sin embargo, la evaluación de riesgos por plaguicidas en las zonas tropicales rara vez se realiza debido a la escasez de datos. Por otra parte, las evaluaciones de riesgo en el trópico que están disponibles en la actualidad se basan principalmente en datos obtenidos en regiones templadas (De Silva *et al.*, 2010). En los últimos años, se ha recomendado hacer pruebas biológicas en organismos blanco de diferentes niveles tróficos, para una evaluación refinada de los riesgos ambientales ocasionados por productos sintéticos, semisintéticos y ahora de los llamados otros productos no convencionales de control de plagas, como los extractos orgánicos. Entre estos están las pruebas de fitotoxicidad, como bioensayos con alfalfa, cebolla, lechuga, pepino y tomate, etc. (Anaya *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2005; D'Abrosca *et al.*, 2004; De Almeida *et al.*, 2001), donde se miden tasas de germinación y elongación de las raíces y los folíolos, los cuales son útiles para conocer los efectos que pueden tener los residuos de los plaguicidas aplicados y que pueden permanecer en el suelo. Una preocupación importante para la predicción de fitotoxicidad de un residuo plaguicida es, si el ensayo se realiza con toda la matriz extraída del suelo o con un extracto representativo del mismo. Sin embargo, actualmente se están utilizando lixiviados y/o extractos acuosos, así como los orgánicos, que contienen fracciones mayoritarias de los contaminantes de un residuo de un agroquímico para realizar dichos bioensayos (Lors *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2008). Por otra parte, los invertebrados son frecuentemente utilizados como biomarcadores para medir el posible efecto de xenobióticos aplicados al ambiente (Henson-Ramsey *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2009). Su utilización en estudios de bioacumulación hace necesario disponer de métodos prácticos y fiables para estimar la carga corporal de especies presa, como las lombrices (Henson-Ramsey *et al.*, 2007; Savard *et al.*, 2007; Booth *et al.*, 2005; Robidoux *et al.*, 2004). Aunque los bioensayos no proporcionan información sobre la identidad de los contaminantes, ellos dan información

realista acerca de sus efectos sobre los organismos vivos, el cual es una estimación más adecuada del riesgo ambiental (Ramírez *et al.*, 2008). Además, para evaluar el efecto potencial negativo del uso de extractos obtenidos de fuentes naturales sobre el ambiente biótico, es importante realizar bioensayos de toxicidad al contacto contra organismos benéficos como las lombrices (Jensen *et al.*, 2007; Brackenbury y Appleton, 1997). En el presente trabajo, se evaluaron, en condiciones de laboratorio 11 extractos orgánicos, de estos 5 son de plantas (*Acalypha gaumeri*, *Bonellia flammea*, *Croton chichenensis*, *Dorstenia contrajerva* y *Eugenia winzerlingii*) y 6 de hongos (*Clonostachys rosea* de AcOEt y MeOH, *Fusarium incarnatum* de AcOEt y MeOH y *Gliomastrix murorum* de AcOEt y MeOH) seleccionados en base a sus propiedades biológicas contra fitopatógenos (*Alternaria chrysanthemii*, *A. tagetica*, *Bemisia tabaco*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp., *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium* sp., *Meloidogyne incognita*, *Myzus persicae* y *Rophalosiphum padi*,). Para cumplir con este estudio, se seleccionaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), así como las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*), reportados como biomarcadores de contaminantes. La lombriz *Eisenia fetida* es una especie recomendada por la Organization of Economic Cooperative Development (OECD, 1984) para este tipo de evaluaciones. Con esto se pretende aportar conocimiento complementario en la búsqueda de productos naturales inocuos a especies benéficas con aplicaciones en la agricultura.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los extractos orgánicos se obtuvieron del banco de extractos del grupo de Bioplaguicidas de la Unidad de Biotecnología del CICY. Estos se conservan a 4 °C en la oscuridad. Un total de cinco extractos de plantas y seis fúngicos se evaluaron en al menos uno de los modelos seleccionados (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Clave de identificación de extractos orgánicos seleccionados para evaluar contra organismos benéficos para pruebas de inocuidad.

	Organismo/Familia/Parte vegetal	Clave de Extracto	Tipo de extracto	Organismo Evaluado		
				Lechuga	Tomate	Lombriz
1	<i>Acalypha gaumeri</i> Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae) Raíz	ACR	EtOH	√	√	NE
2	<i>Bonellia flammea</i> (Millsp. Ex Mez) Stahl & Källersjö (Theophrastaceae) Tallo	BFT	EtOH	NE	NE	√
3	<i>Clonostachys rosea</i> Schroers, Samuels, Siefert & Gams TH27 (Bionectriaceae)	AR-3A	AcOEt	√	√	NE
4	<i>Clonostachys rosea</i> Schroers, Samuels, Siefert & Gams TH27 (Bionectriaceae)	AR-3B	MeOH	√	√	NE
5	<i>Croton chichenensis</i> Lundell. (Euphorbiaceae)	CCR	EtOH	√	√	NE
6	<i>Dorstenia contrajerva</i> L. (Moraceae) Raíz	DCRM-5B	MeOH	√	√	√
7	<i>Eugenia winzertingii</i> Standl. (Myrtaceae) Hoja	EWB	EtOH	√	√	√
8	<i>Fusarium incarnatum</i> (Desm.) Saccardo, TH23 (Nectriaceae)	AR-8A	AcOEt	NE	NE	√
9	<i>Fusarium incarnatum</i> (Desm.) Saccardo, TH23 (Nectriaceae)	AR-8B	MeOH	NE	NE	√
10	<i>Gliomastix murorum</i> (Corda) S. Hughes, MR36 (Hypocreaceae)	AR-9A	AcOEt	√	√	NE
11	<i>Gliomastix murorum</i> (Corda) S. Hughes, MR36 (Hypocreaceae)	AR-9B	MeOH	√	√	NE

NE: No evaluado

4.2.1 BIOENSAYO DE FITOTOXICIDAD EN LECHUGA Y TOMATE

Un total de siete extractos orgánicos se seleccionaron para evaluarlos en el ensayo de fitotoxicidad, tres de ellos de origen vegetal, que correspondieron a *A. gaumeri*, *C. chichenesis*, y *E. winzerlingii*, las cuales fueron colectadas en distintas localidades de la Península de Yucatán, México, bajo la supervisión de botánicos en Septiembre y Noviembre del 2001; todo el material vegetal se secó bajo luz artificial (50-60 °C, 3 días) y se extrajo en el laboratorio a temperatura ambiente con etanol como se ha descrito previamente (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006) y cuatro extractos de origen fúngico, dos correspondieron a *C. rosea* TH27 (AcOEt y MeOH), cepa aislada de hojarasca sumergida del cenote Temozón, ubicado en la localidad “La noria” de la península de Yucatán y su identificación se realizó por taxonomía tradicional en el Instituto de Ecología de Xalapa, Veracruz por la Dra. Gabriela Heredia Abarca (De la Rosa, 2007) y por taxonomía molecular en los laboratorios de la UBT del CICY por la Dra. Blondy Canto Canche. Por último, dos correspondientes a *G. murorum* (AcOEt y MeOH), cepa aislada de hojarasca del jardín botánico Xiitbal Neek del CICY y su identificación se realizó por taxonomía tradicional y molecular (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). Las cepas fúngicas se cultivaron en arroz fermentado a 25 °C con un fotoperiodo de luz/obscuridad (12/12 horas). Después de 40 días, los cultivos se congelaron y se liofilizaron; posteriormente, se fragmentaron y subsecuentemente se extrajeron con AcOEt y MeOH como se ha descrito previamente (Ruíz, 2011). Como controles se emplearon tres controles negativos, un control positivo natural y un control positivo sintético.

Para las evaluaciones se utilizaron como modelos la lechuga (*Lactuca sativa*) var. Great lakes 118, lote 880 y el tomate *Solanum lycopersicum* var. OCP2B, lote 490245-31. Las semillas se hidrataron 12 horas antes del ensayo en el caso de la lechuga y dos días en el caso del tomate. En discos de papel filtro de 2 cm de diámetro, se impregnaron 25 µl del producto a ensayar diluidos con metanol (MeOH), a una concentración de 10 µg · µl⁻¹ (250 µg · disco⁻¹) en el caso de los extractos y 5 µg · µl⁻¹ (125 µg · disco⁻¹) para el producto puro. Como controles negativos se utilizaron, el disolvente utilizado en las diluciones, más el agua, los extractos del arroz fermentado obtenidos con acetato de etilo (AF-Ac) y metanol (AF-Me), la mezcla DCRM-5B (Bergapteno y Xantotoxina) como control positivo natural y el 2,4-D como control positivo sintético. Una vez evaporado el disolvente los

discos se depositaron en las placas (*Orange Scientific*) y se depositaron 10 semillas de cada especie por pozo (40/muestra) y se hidrataron con 500 μ l de agua destilada, cuatro réplicas por muestra se consideraron (Figura 4.1). Las cajas cerradas se sellaron con Kleenpack y se depositaron en una bandeja con papel filtro húmedo y se incubaron en condiciones del laboratorio. La lectura del bioensayo se realizó cada 24 horas durante siete días y se anotaron por día el número de semillas germinadas por réplica. Una vez finalizado el bioensayo se eligieron 20 raíces por tratamiento al azar y se fijaron en una hoja para medir la elongación (séptimo día) (Burgueño-Tapia *et al.*, 2008).

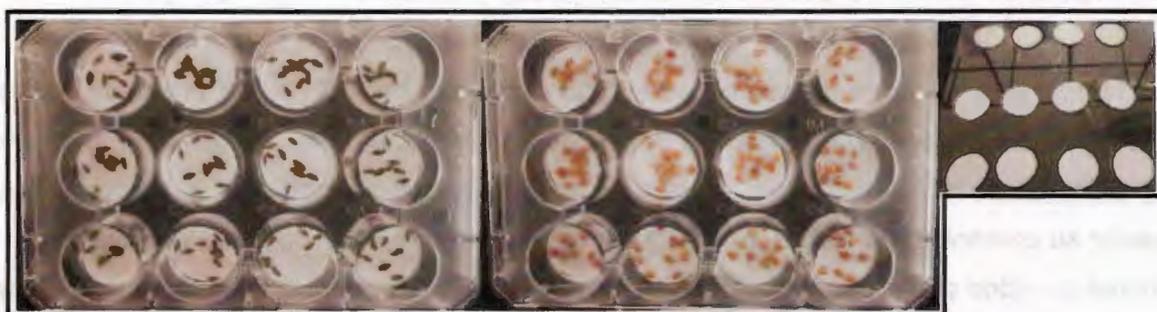


Figura 4.1. Bioensayo de fitotoxicidad de extractos orgánicos en lechuga (*Lactuca sativa*) y tomate (*Solanum lycopersicum*).

4.2.2 BIOENSAYO DE EXTRACTOS ORGÁNICOS EN LOMBRIZ DE TIERRA (*Eisenia fetida*)

En el ensayo de inocuidad contra lombrices de tierra se evaluaron cuatro extractos orgánicos, dos de ellos de origen vegetal, que correspondieron a *B. flammea*, colectada en Julio del 2001 en Yucatán (aproximadamente a 204220N y 883940W); el material vegetal se dejó a secar por una semana a temperatura ambiente, seguidamente por cuatro días en una estufa a 55 °C y se extrajo en el laboratorio a temperatura ambiente con etanol como se ha descrito previamente (Sánchez-Medina *et al.*, 2009) y *E. winzerlingii*, colectada en la Península de Yucatán en Septiembre y Noviembre del 2001; el material vegetal se secó bajo luz artificial (50-60 °C, 3 días) y se extrajo en el laboratorio a temperatura ambiente con etanol como se ha descrito previamente (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006); y dos de origen fúngico, que correspondieron a *F. incarnatum* TH23 (AcOEt y MeOH), cepa aislada de hojarasca sumergida del cenote Temozón, ubicado en la localidad “La noria” de la península de Yucatán (De la Rosa,

2007). La cepa fúngica se cultivó en arroz fermentado a 25 °C con un fotoperiodo de luz/obscuridad (12/12 horas). Después de 40 días, el cultivo se congeló y se liofilizó; posteriormente, se fragmentó y subsecuentemente se extrajo con AcOEt y MeOH como se ha descrito previamente (Ruíz, 2011). También se evaluó la mezcla de furanocumarinas de *D. contrajerva* (Bergapteno y Xantotoxina), aislados del extracto metanólico de la raíz, biodirigido por medio de una partición en columna cromatográfica previamente descrito (Gamboa-Angulo *et al.*, 2009); las raíces de *D. contrajerva* fueron colectadas en la Península de Yucatán (Peraza-Sánchez). También en las evaluaciones se emplearon, un control positivo sintético (Vydate) y un control negativo (Agua).

Lombrices adultas (dos meses de edad), con un peso entre 300-600 mg cada una se utilizaron en los ensayos. Estas se mantuvieron en papel filtro húmedo por un lapso aproximado de tres horas antes de ser colocadas en los viales, debido a que ellas podrían vaciar su contenido intestinal y posteriormente se lavaron y secaron antes de su uso.

Viales de vidrio con fondo plano (8 cm de longitud x 3 cm de diámetro) se les cubrió en su interior con papel filtro Whatman No 1 (6.4 cm de largo x 7.8 cm de ancho). Los extractos a evaluar se disolvieron con metanol a una concentración de $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($100 \text{ } \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$) y se aplicó un mL de esta solución cubriendo la superficie del papel filtro en el vial. Al control negativo se le agregó un mL de metanol y al control positivo un mL de Vydate (Oxamil) a una concentración de $1 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($4.7 \text{ } \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ i.a), posteriormente se dejaron evaporar hasta secarse bajo el aire de una campana extractora. Una vez evaporado el disolvente, se le agregó 1 mL de agua destilada a cada vial para mantener la humedad del papel filtro. A continuación se depositó una lombriz por vial, los cuales, se sellaron con Kleenpack y con la ayuda de una aguja se hicieron pequeños orificios para mantener la ventilación. Por cada tratamiento se hicieron 20 réplicas. Durante la evaluación los viales ligeramente acostados, se depositaron en bandejas con papel filtro humedecido a una temperatura de $22^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ en oscuridad. Las lombrices se monitorearon cada 24 horas por 72 horas y se consideraron muertas cuando no respondieron a pequeños estímulos en la región anterior y se reportaron comportamientos o síntomas patológicos presentes en ellas (Figura 4.2) (OECD, 1984).



Figura 4.2. Bioensayo de inocuidad de extractos orgánicos con lombriz de tierra (*Eisenia fetida*).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la búsqueda de nuevas alternativas ecoamigables para reducir el daño ocasionado por plagas y enfermedades en cultivos de importancia agrícola, el grupo de bioplaguicidas ha llevado a cabo el monitoreo de extractos orgánicos contra varios fitopatógenos de importancia agrícola. De estos, algunos han dado resultados promisorios, pudiendo ser estos en un futuro una alternativa potencial en la industria biotecnológica (Cuadro 4.2). Sin embargo, a muchos de estos productos no se les ha determinado su inocuidad hacia organismos benéficos. Por lo que el objetivo de este capítulo contempla evaluar en una primera etapa extractos orgánicos promisorios con el fin de constatar que son inocuos hacia organismos benéficos.

Cuadro 4.2. Extractos orgánicos con actividad plaguicida promisorio contra varios organismo blanco.

Especie	Clave de extracto	Organismo plaga	Efecto	% Mortalidad (efecto en)	Autor(es)	
<i>Acalypha gaumeri</i> (Raíz)	ACR	- <i>Alternaria tagetica</i>	Fungicida	94	Gamboa-Angulo <i>et al.</i> , 2008 Vargas, 2009 Cruz, 2009	
		- <i>Alternaria chrysanthemi</i>	Insecticida	81 (germinación)		
		- <i>Bemisia tabaci</i>	Insecticida	98 (huevos)		
		- <i>Meloidogyne incognita</i>	Nematicida	100 (ninfas)	Cristobal-Alejo <i>et al.</i> , 2006	
		- <i>Meloidogyne incognita</i>	Nematicida	100 (J ₂ de <i>M. incognita</i>)		
<i>Bonellia flammea</i> (Tallo)	BFT	- <i>Alternaria chrysanthemi</i>	Fungicida	82 (esporulación)	Vargas, 2009	
<i>Clonostachys rosea</i>	AR-3A	- <i>Myzus persicae</i>	Insecticida	78 (larvas)	Ruiz, 2011	
		- <i>Rhopalosiphum padi</i>	Insecticida	51 (larvas)		
"	AR-3B	- <i>Myzus persicae</i>	Insecticida	93 (larvas)	Ruiz, 2011	
		- <i>Rhopalosiphum padi</i>	Insecticida	81.6 (larvas)		
<i>Croton chichenensis</i>	CCR	- <i>Fusarium oxysporum</i>	Fungicida	83 (micelio)	Gamboa-Angulo <i>et al.</i> , 2008	
		- <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Fungicida	78 (micelio)		
<i>Dorstenia contrajerva</i> (Raíz)	DCRM-5B	- <i>Lactuca sativa</i>	Alelopático	>90 (elongación radicular)	Gamboa-Angulo <i>et al.</i> , 2009	
<i>Eugenia winzerlingii</i> (Hoja)	EWH	- <i>Bemisia tabaci</i>	Insecticida	99 (huevos)	Cruz, 2009	
		- <i>Meloidogyne incognita</i>	Nematicida	100 (ninfas)		
		- <i>Meloidogyne incognita</i>	Nematicida	100 (J ₂ de <i>M. incognita</i>)	Cristobal-Alejo <i>et al.</i> , 2006	
<i>Fusarium incarnatum</i>	AR-8A	- <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Fungicida	50	Ruiz, 2011	
		- <i>Corynespora cassiicola</i>	Fungicida	75		
		- <i>Curvularia sp.</i>	Fungicida	51		
			- <i>Helminthosporium sp.</i>	Fungicida	75	Ruiz, 2011
			- <i>Myzus persicae</i>	Insecticida	76 (larvas)	
			- <i>Rhopalosiphum padi</i>	Insecticida	63.5 (larvas)	
"	AR-8B	- <i>Helminthosporium sp.</i>	Fungicida	66 (micelio)	Ruiz, 2011	
		- <i>Corynespora cassiicola</i>	Fungicida	79 (micelio)		
		- <i>Curvularia sp.</i>	Fungicida	88 (micelio)		
		- <i>Myzus persicae</i>	Insecticida	76 (larvas)	Ruiz, 2011	
		- <i>Rhopalosiphum padi</i>	Insecticida	72 (larvas)		
<i>Gliomatrix murorum</i>	AR-9A	- <i>Myzus persicae</i>	Insecticida	91.7 (larvas)	Ruiz, 2011	
		- <i>Rhopalosiphum padi</i>	Insecticida	92 (larvas)		
"	AR-9B	- <i>Myzus persicae</i>	Insecticida	67 (larvas)	Ruiz, 2011	
		- <i>Rhopalosiphum padi</i>	Insecticida	77 (larvas)		

* Inhibición del crecimiento con hongos

4.3.1 EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS EN LECHUGA

Los extractos orgánicos de *A. gaumeri*, *C. chichenesis* *C. rosea* (AR-3A y AR-3B) y *E. winzerlingii* estadísticamente no afectaron la germinación de las semillas de *L. sativa* con respecto a los controles negativos (Agua, AF-AcOEt y AF-MeOH) a los 6 y 7 días. Sin embargo, se observó una variación en el porcentaje de germinación entre los tratamientos con respecto a los controles negativos en ambos tiempos.

A los 6 días se detectaron porcentajes de germinación entre 80-97.5% con los extractos de *A. gaumeri* (ACR), *C. chichenesis* (CCR), *C. rosea* (AR-3A y AR-3B) y *E. winzerlingii* (EWH), *A. gaumeri* con el menor porcentaje (80%) estadísticamente igual al control negativo agua (100%). Por otra parte, se observó una disminución en la germinación de las semillas al ser expuestas a los extractos de AcOEt y MeOH de *G. mororum* con porcentajes de germinación de 50 y 67% a los 6 días, este se elevó a los 7 días (65-70%, respectivamente). En el control positivo natural (DCRM-5B), se observaron bajos porcentajes de germinación a los 6 y 7 días, con valores de 30 y 32.5%, respectivamente comparado con el control agua. Finalmente, se observó una inhibición total de la germinación de las semillas de lechuga a los 6 y 7 días, al estar en contacto con el herbicida sintético 2,4-D (Figura 4.3).

Por otra parte, se estimó que las plántulas de lechuga resultantes de la germinación, al estar en contacto con los extractos de *C. chichenesis* (CCR), AcOEt y MeOH de *C. rosea* promovieron la elongación radicular en un 105.62%, 82.87% y 37.92%, respectivamente comparado con el control agua al séptimo día a una concentración de $10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. A pesar de que los extractos de las hojas de *E. winzerlingii* (EWH) y de raíz de *A. gaumeri* (ACR) no afectaron significativamente la germinación de las semillas de *L. sativa* al estar en contacto con ellas, se observó una ligera inhibición del crecimiento radicular en un 53.09 y 57.87%, respectivamente comparado con el control agua. (Figura 4.4). También se detectó que el extracto de AcOEt de *G. mororum* (AR-9A) no afectó la elongación radicular (10%), a diferencia del extracto metanólico de *G. mororum* (AR-9B) con un porcentaje de inhibición radicular del 45.22%, siendo este estadísticamente igual al control positivo natural (DCRM-5B), al estar en contacto con las plántulas obtenidas (Figura 4.5). Como se ha mencionado anteriormente, los hongos son conocidos por poseer una amplia diversidad de rutas metabólicas y que han proporcionado varias clases de compuestos (Li *et al.*, 2007). En la literatura se ha reportado al compuesto omfalotina, un potente

Nematicida, aislado del extracto micelial del basidiomicete *Omphalotus olearius*, como no fitotóxico, debido a que no se observó efecto en la germinación y crecimiento de *Lepidium sativum*, *Setaria itálica* y *Lactuca sativa* a concentraciones de $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Mayer et al., 1997; Sterner et al., 1997).

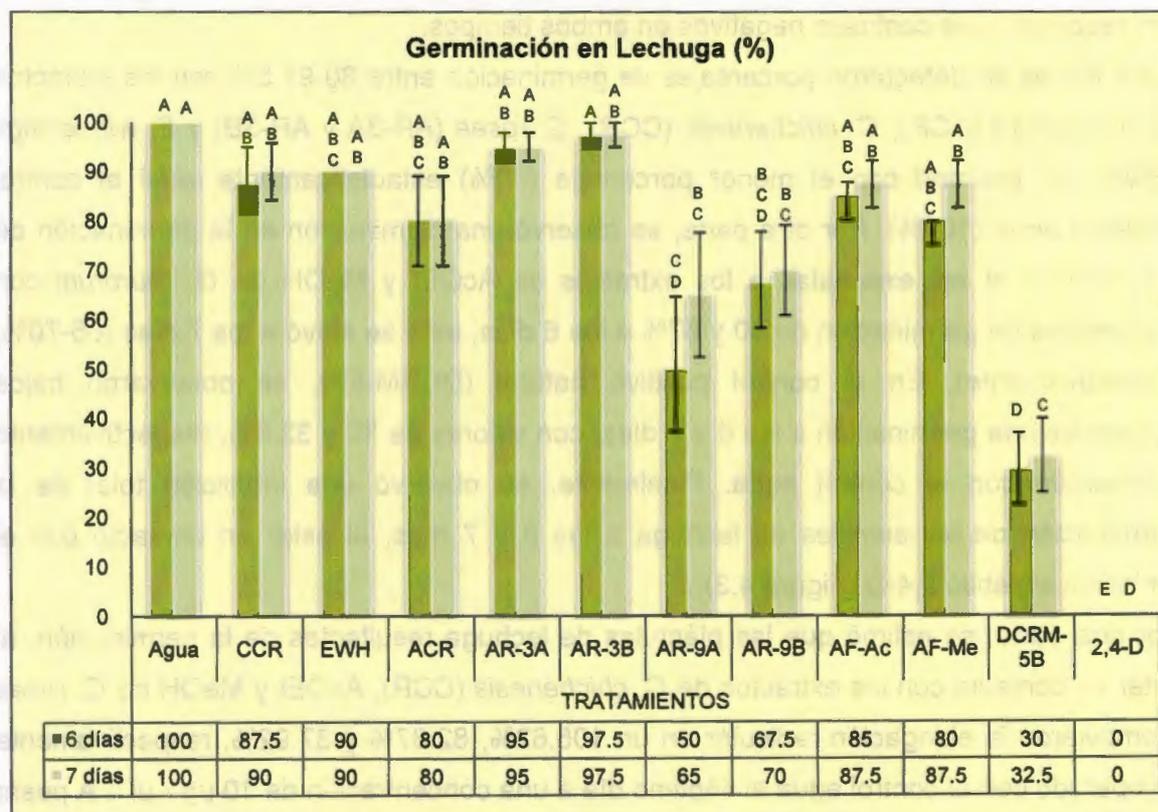


Figura 4.3. Efecto fitotóxico de extractos orgánicos sobre el porcentaje de germinación en lechuga. **CCR:** *Croton chichensis*; **EWH:** *Eugenia winzerlingii*; **ACR:** *Acalypha gaumeri*; **AR-3A:** *Clonostachys rosea* (AcOEt); **AR-3B:** *Clonostachys rosea* (MeOH); **AR-9A:** *Gliomatrix murorum* (AcOEt); **AR-9B:** *Gliomatrix murorum* (MeOH); **AF-Ac:** Arroz fermentado (AcOEt); **AF-Me:** Arroz fermentado (MeOH); **DCRM-5B:** Mezcla de Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05).

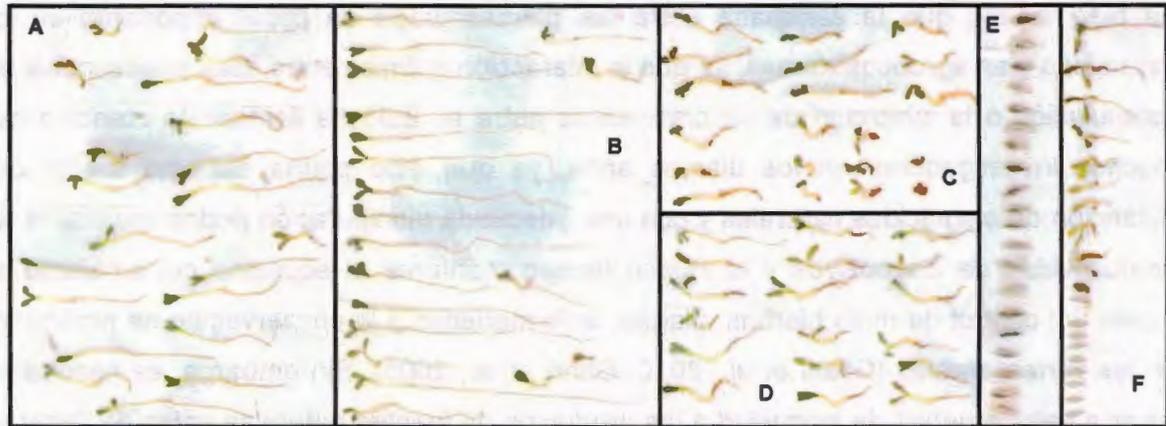


Figura 4.4. Efecto en el crecimiento radicular por la exposición de extractos orgánicos en lechuga **a)** Control negativo MeOH + Agua; **b)** extracto CCR; **c)** ACR; **d)** EWH; **e)** Control positivo 2,4-D y **f)** Control positivo natural DCRM-5B.

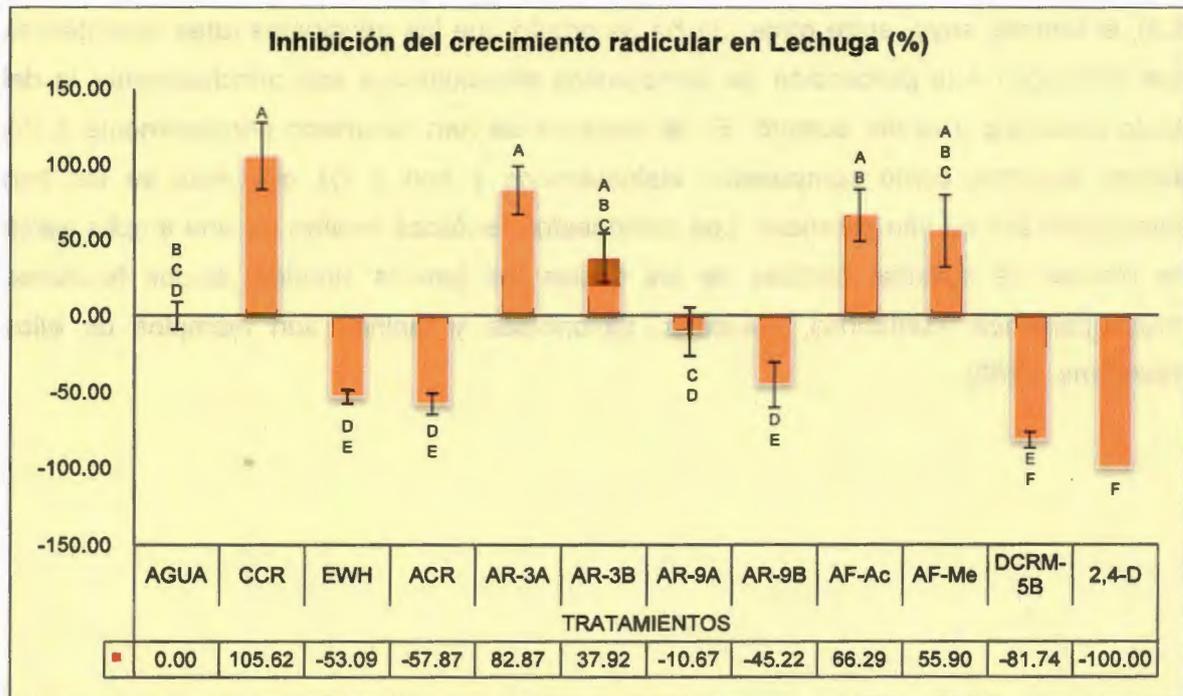


Figura 4.5. Efecto fitotóxico de extractos orgánicos sobre el porcentaje de crecimiento radicular en lechuga: **CCR:** *Croton chichensis*; **EWH:** *Eugenia winzerlingii*; **ACR:** *Acalypha gaumeri*; **AR-3A:** *Clonostachys rosea* (AcOEt); **AR-3B:** *Clonostachys rosea* (MeOH); **AR-9A:** *Gliomastrix murorum* (AcOEt); **AR-9B:** *Gliomastrix murorum* (MeOH); **AF-Ac:** Arroz fermentado (AcOEt); **AF-Me:** Arroz fermentado (MeOH); **DCRM-5B:** Mezcla de Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05).

Es bien sabido que la alelopatía entre las plantas juega un papel importante en la naturaleza y en agroecosistemas, ya que la interacción química entre ellas puede incluir la estimulación o la inhibición de su crecimiento entre si. Esto ha llamado la atención de muchos investigadores en los últimos años, ya que esto podría ser una fuente de obtención de plaguicidas naturales y con una adecuada manipulación podría mejorarse la productividad de los cultivos y al mismo tiempo mantener el equilibrio del ambiente a través del control de mala hierbas, plagas, enfermedades y la conservación de nitrógeno en las tierras arables (Gilani *et al.*, 2010; Chon *et al.*, 2005). Sin embargo, es necesario llevar a cabo pruebas de inocuidad a los productos de fuentes naturales antes de llegar a su comercialización y aplicación en campos agrícolas. Esto debido a que se ha observado que algunos compuestos que se encuentran presentes en ellos han resultado ser fitotóxicos con los cultivos de interés agrícola, como es el caso de la lechuga (Cuadro 4.3), el tomate, soya, entre otros. Se ha reportado que las principales rutas biosintéticas que conducen a la producción de compuestos aleloquímicos son principalmente la del ácido shikímico o la del acetato. En la literatura se han reportado principalmente a los ácidos fenólicos como compuestos aleloquímicos y son a los que más se les han investigado por su alto potencial. Los compuestos fenólicos existen en una amplia gama de plantas de distintas familias de los cuales los fenoles simples, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, cumarinas, quinonas, flavonoides y taninos son ejemplos de ellos (Harborne, 1980).

Figura 4.3. Estructura química de los compuestos orgánicos que se encuentran en las plantas y que actúan como aleloquímicos. Los compuestos orgánicos que se encuentran en las plantas y que actúan como aleloquímicos son: ácidos fenólicos, cumarinas, quinonas, flavonoides y taninos.

Cuadro 4.3. Productos naturales provenientes de plantas con actividad fitotóxica en Lechuga (*Lactuca sativa*).

PLANTA/FAMILIA	SITIO DE COLECTA	PARTE	EXTRACTO (Concentración)	COMPUESTO (Concentración)	INHIBICIÓN EN GERMINACIÓN Y EN ELONGACIÓN RADICULAR (%)	AUTOR(ES)
<i>Melia azedarach</i> (Meliaceae)	Africa	Hoja	Etanólico (5 y 2.5%)	-	100 (germinación)	Lungu <i>et al.</i> , 2011.
		Frutos			100 (elongación)	
		Hoja Hoja + Madera Frutos			85 (elongación)	
<i>Perezia adnata</i> var. <i>Alamani</i> (Asteraceae)	-	Raíz	-	Isoperezona (50 µg/cm ²)	23 (elongación)	Burgueño-Tapia <i>et al.</i> , 2008.
				Dihidroperezona (50 µg/cm ²)	43 (elongación)	
				Anilidoperezona (50 µg/cm ²)	19 (elongación)	
<i>Isodon racemosa</i> (Hemsl) Hara (Lamiaceae)	Gansu (China)	Hoja	-	Leukamenina E (200 µM)	63 (elongación)	Ding <i>et al.</i> , 2008.
	Marruecos	Latex	-	Derivados semisintéticos de Triterpenos (50 µg/cm ²)		Mazoir <i>et al.</i> , 2008.
<i>Euphorbia officirum</i>				C ₃₆ H ₅₂ O ₅ S C ₃₁ H ₄₈ O ₄	50 (elongación)	
<i>Euphorbia resinifera</i> (Euphorbiaceae)				C ₂₇ H ₄₄ O ₂ C ₃₈ H ₅₄ O ₅ S C ₃₃ H ₅₀ O ₄ C ₃₁ H ₅₀ O ₂ C ₃₁ H ₄₈ O ₄		

Burgueño-Tapia *et al.* (2008) reportaron al compuesto sesquiterpeno *p*-benzoquinona (Perezona) aislado de *Perezia adnata* var. *alamani* (Asteraceae) y a sus derivados no naturales, exhibiendo una fuerte actividad insecticida contra *Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata* y *Myzus persicae* a una concentración de 50 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2$. Las pruebas de fitotoxicidad de estos compuestos en semillas de Lechuga (*Lactuca sativa*) demostraron que los compuestos no afectaron el porcentaje de germinación a la concentración evaluada. Sin embargo, los derivados isoperezona, dihydroperezona y anilidoperezona de la perezona, mostraron un efecto variable en la elongación radicular, disminuyéndola en 23, 43 y 19%, respectivamente. Dedujeron un patrón estructura-actividad en los compuestos, de tal manera que observaron que la hidrogenación del doble enlace del alquilo y el cambio del grupo hidroxilo del C₃ de la perezona al C₆ aumentó la actividad fitotóxica, así como en la actividad antialimentaria (Figura 4.6).

También se han reportado derivados semisintéticos de triterpenos naturales presentes como compuestos mayoritarios en latex de *Euphorbia resinífera* (α -eufol y α -euforbol) y de *E. officinarum* (Obtusifoliol y 31-norlanostenol) con un alto efecto antialimenticio en varias especies de insectos (*S. littoralis*, *M. persicae* y *R. padi*) y citotóxico en dos tipos de líneas celulares (células de *Spodoptera frugiperda* y ováricas de hamster chino). Sin embargo, algunos de los derivados obtenidos de los triterpenos mencionados presentaron un efecto fitotóxico, inhibiendo el 50% de la elongación radicular en *Lactuca sativa* (Mazoir *et al.*, 2008).

Por lo tanto se requiere investigar más acerca de los productos que se obtienen de las diversas fuentes biológicas, para evaluar el riesgo ambiental que pudieran ocasionar los mismos.

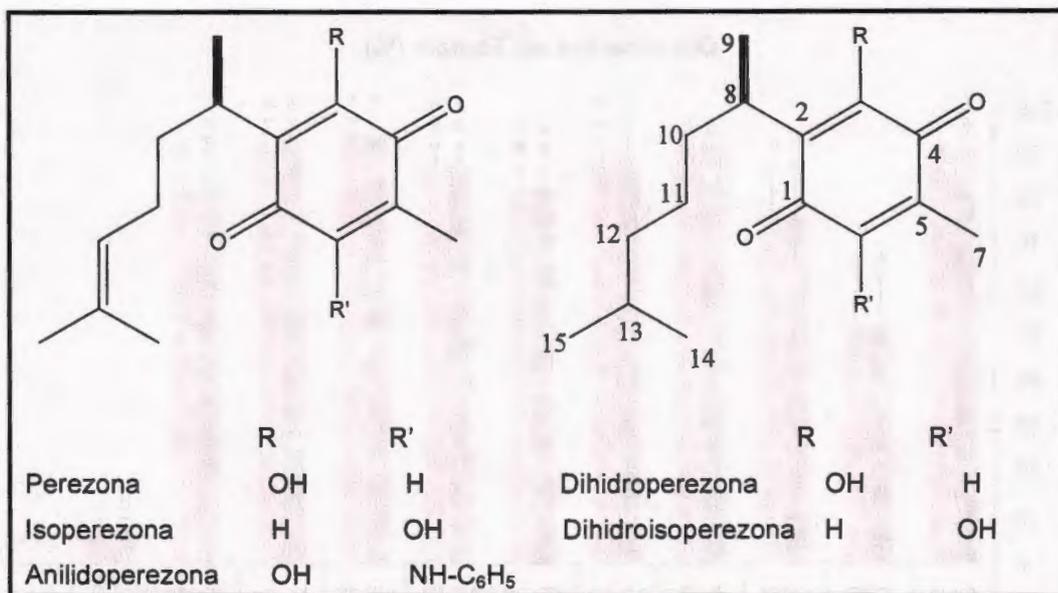


Figura 4.6. Estructura química del sesquiterpeno p-benzoquinona (Perezona) aislado de *Perezia adnata* var. *alamani* (Asteraceae) y sus derivados (Burgueño-Tapia *et al.*, 2008).

4.3.2 EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS EN TOMATE

Entre los extractos orgánicos evaluados en tomate, el correspondiente a la raíz de *C. chichensis* (CCR) inhibió el porcentaje de germinación en *S. lycopersicum* (52.5%) al sexto y séptimo día de exposición siendo este estadísticamente diferente al control agua (92.5%). En los demás tratamientos se observó una buena germinación, en mayor proporción con el extracto metanólico de *G. murorum* (AR-9B) y el control negativo AF-AcOEt, ambos con un 95% de germinación. El extracto de raíz de *A. gaumeri* presentó el 92.5% de germinación al igual que los extractos metanólicos de *C. rosea* (AR-3B) y de AcOEt de *G. murorum* (AR-9A) con 82.5 y 87.5%, respectivamente. El control negativo AF-MeOH mostró el 82.5% de germinación y por último el extracto de hoja correspondiente al de *E. winzerlingii* (EWH) con un 77.5%; siendo todos estadísticamente diferentes a los controles positivos DCRM-5B (7.5%) y 2,4-D (0%) los cuales permitieron de manera escasa o nula la germinación de las semillas de tomate (Figura 4.7).

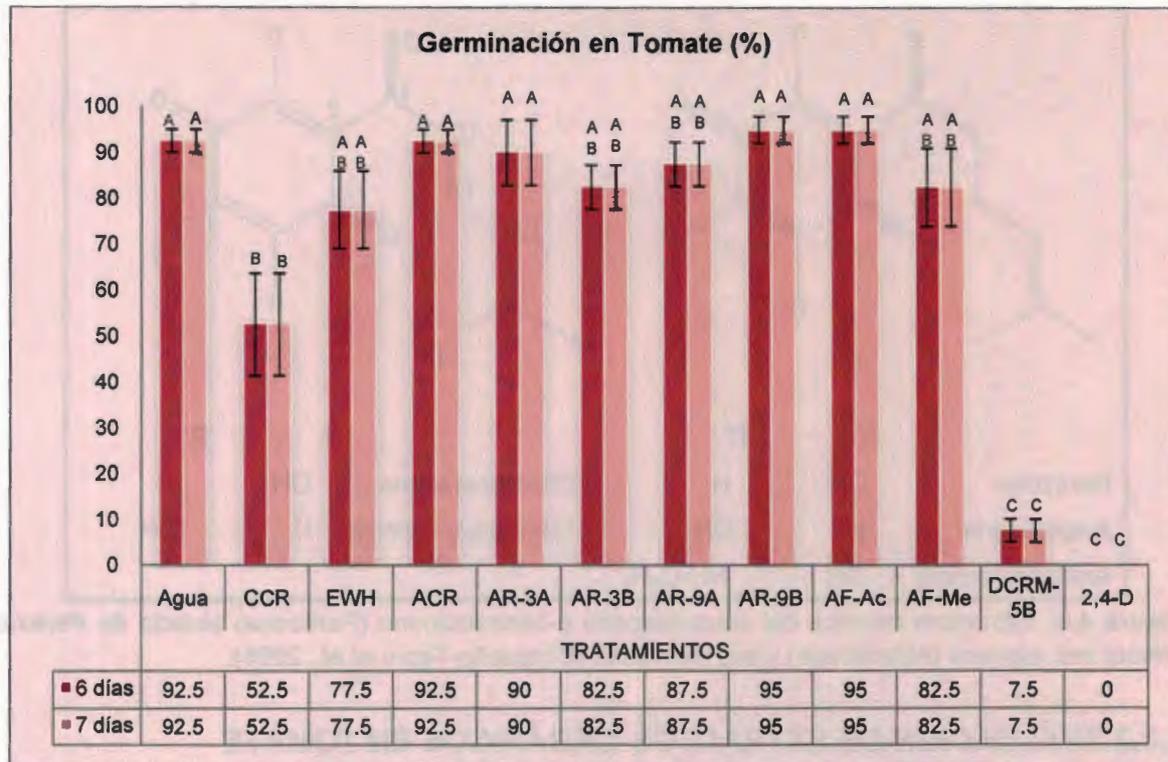


Figura 4.7. Efecto fitotóxico de extractos orgánicos sobre el porcentaje de germinación en tomate: **CCR:** *Croton chichenensis*; **EWH:** *Eugenia winzerlingii*; **ACR:** *Acalypha gaumeri*; **AR-3A:** *Clonostachys rosea* (AcOEt); **AR-3B:** *Clonostachys rosea* (MeOH); **AR-9A:** *Gliomastrix murorum* (AcOEt); **AR-9B:** *Gliomastrix murorum* (MeOH); **AF-Ac:** Arroz fermentado (AcOEt); **AF-Me:** Arroz fermentado (MeOH); **DCRM-5B:** Mezcla de Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05).

En cuando al efecto en el crecimiento radicular, de manera notoria se detectó que los extractos de raíz de *C. chichenensis* y el metanólico de *C. rosea* afectaron el crecimiento radicular del tomate con porcentajes de inhibición radicular del 82.2 y 79.7%, respectivamente, siendo estadísticamente diferentes al control agua (0% de inhibición). Además los extractos de *E. winzerlingii*, *A. gaumeri* y de AcOEt de *G. murorum* inhibieron el crecimiento radicular en un 65.9, 54.7 y 41.8% respectivamente, en las semillas de tomate. También, se observó que el extracto de AcOEt de *C. rosea* y el metanólico de *G. murorum* son los que mostraron menores efectos de inhibición en el crecimiento radicular, AR-3A con un 36.4% y AR-9B con un 20.2%, éste último estadísticamente igual al control agua. Por su parte, los controles negativos también mostraron un cierto porcentaje de inhibición, AF-Ac con un 31.08% y AF-Me con un 53.83%, siendo ambos estadísticamente diferentes al control agua. Finalmente, se pudo observar un 97.7% de inhibición radicular

en las semillas de tomate al estar en contacto con el control positivo natural DCRM-5B y un 100% de inhibición con el control positivo sintético 2,4-D (Figura 4.8 y 4.9).

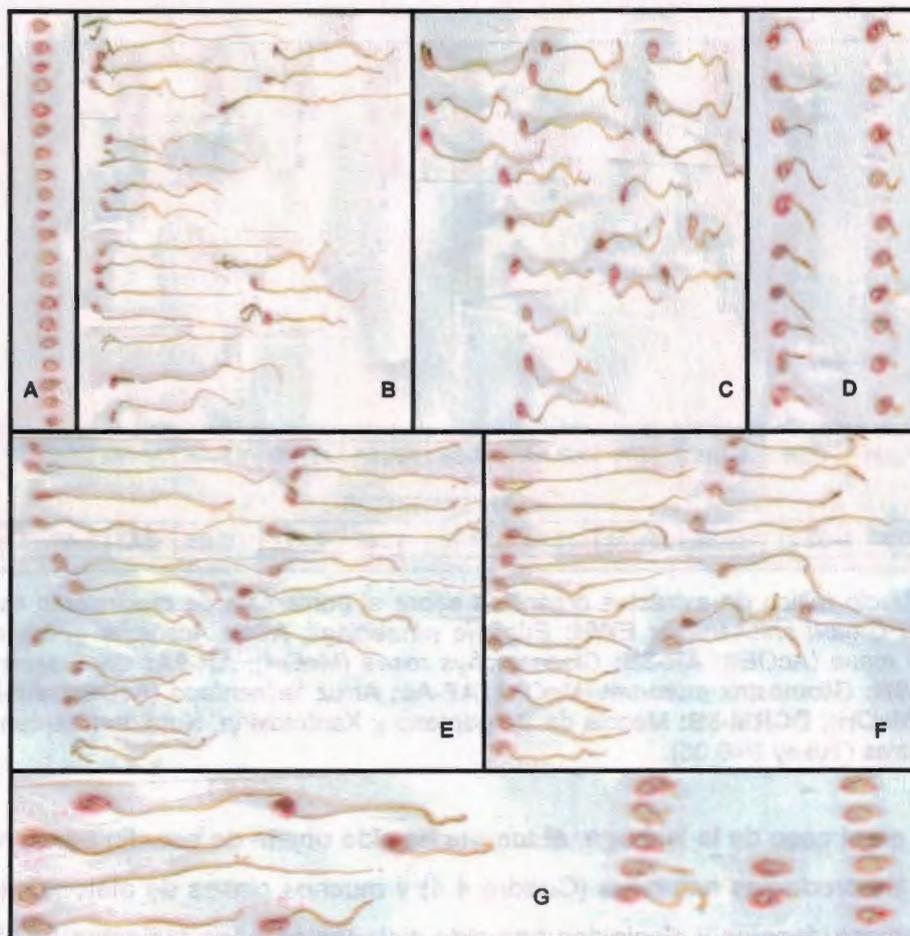


Figura 4.8. Efecto en el crecimiento radicular por la exposición de extractos orgánicos en tomate a) Control positivo 2,4-D; b) Control negativo MeOH + H₂O c) extracto EWH; d) AR-3B; e) AR-3A; f) ACR y g) CCR.

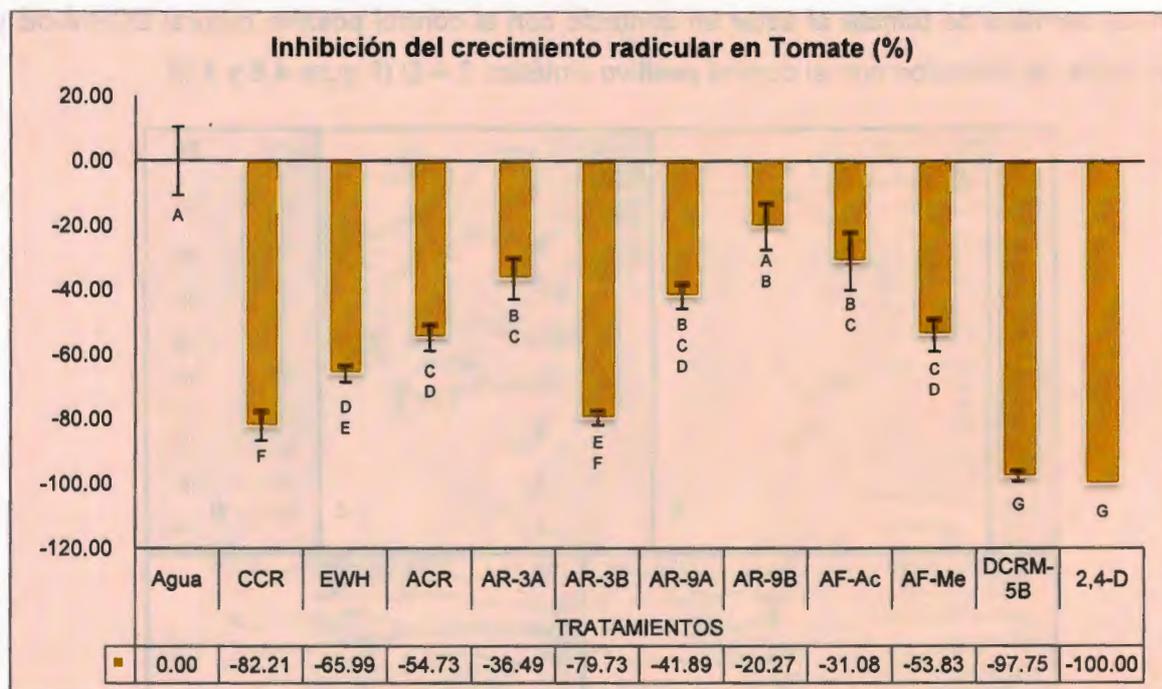


Figura 4.9. Efecto tóxico de extractos orgánicos sobre el porcentaje de crecimiento radicular en tomate: **CCR:** *Croton chichensis*; **EWH:** *Eugenia winzerlingii*; **ACR:** *Acalypha gaumeri*; **AR-3A:** *Clonostachys rosea* (AcOEt); **AR-3B:** *Clonostachys rosea* (MeOH); **AR-9A:** *Gliomastrix murorum* (AcOEt); **AR-9B:** *Gliomastrix murorum* (MeOH); **AF-Ac:** Arroz fermentado (AcOEt); **AF-Me:** Arroz fermentado (MeOH); **DCRM-5B:** Mezcla de Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05).

Al igual que en el caso de la lechuga, el tomate ha sido objeto de estudio para pruebas de fitotoxicidad de productos naturales (Cuadro 4.4) y muchas clases de aleloquímicos tales como terpenoides, fenoles y alcaloides han sido aislados en años recientes (D'Abrosca *et al.*, 2004). Zasada *et al.* (2006), reportaron la actividad nematocida de extractos acuosos ($1 \text{ g} \cdot 15 \text{ ml}^{-1}$) de hoja de *Mucuna pruriens* (Fabaceae) ocasionando el 65% de mortalidad de J_2 de *Meloidogyne incognita* a las 48 horas de exposición. Sin embargo, a pesar que tuvieron resultados prometedores para el control de este fitoparásito, al realizar pruebas de fitotoxicidad con los extractos en tomate, observaron que causaron el 88 % de inhibición en la germinación de las semillas y el 100% en la elongación radicular. Mencionan que el compuesto primario en extractos de especies de *Mucuna* es el L-dopa (L-3, 4-dihidroxifenilalanina), que inhibió la germinación en semillas de lechuga, por lo que concluyeron que este mismo compuesto puede ser el responsable de inhibir la germinación de las semillas de tomate en sus estudios.

Cuadro 4.4. Productos naturales provenientes de plantas con actividad fitotóxica en Tomate (*Solanum lycopersicum*).

PLANTA/FAMILIA	SITIO DE COLECTA	PARTE	EXTRACTO (Concentración)	COMPUESTO (Concentración)	INHIBICIÓN EN GERMINACIÓN Y EN ELONGACIÓN RADICULAR (%)	AUTOR(ES)
<i>Mucuna pruriens</i> DC var. <i>itulis</i> (Fabaceae)	Mozambique	Hoja	Acuoso 1:15 p/v	-	87 (germinación) 100 (elongación)	Zasada <i>et al.</i> , 2006.
<i>Brassica campestris</i> subs. <i>rapa</i> (Brassicaceae)	-	Hoja	Metanolico (50 g/L)		80 (elongación)	Zamorano y Fuentes. 2005.
<i>Lolium temulentum</i> (Poaceae)		Hoja	Metanolico (25 g/L)		50 (elongación)	
<i>Cestrum parqui</i> (Solanaceae)	Italia	Hoja	Acuoso (10^{-4} M)		75> (elongación)	D'Abrosca <i>et al.</i> , 2004.
			Cloruro de metileno (1000 ppm)		50> (elongación)	
<i>Callicarpa acuminata</i> (Verbenaceae)	México	Hoja	Acuoso (1% p/v)	Ácido 4- hidroxibenzoico (1nM)	50 (elongación)	Anaya <i>et al.</i> , 2003.
			Cloroformo-Metanol (1:1)	-	53.5 (elongación)	
<i>Argemone mexicana</i> (Papaveraceae)	Pakistán	Brotes (polvo) 50g/Kg de suelo	-	-	80 (mortalidad de plántulas)	Shaukat <i>et al.</i> , 2002.

Por otra parte, D'Abrosca *et al.* (2004) reportaron más del 50% de inhibición radicular en plántulas de tomate ocasionado por la exposición de fracciones orgánicas (cloruro de metileno) de *Cestrum parqui* (Solanaceae) y el 50% de inhibición por la exposición al ácido 4-hidroxibenzoico, aislado de una fracción de acetato de etilo de la misma especie vegetal en raíces de plántulas de tomate, por lo que concluyeron que el compuesto fenólico podría ser un buen candidato, por su actividad fitotóxica, como herbicida natural de maleza en la agricultura.

Es importante destacar que en este trabajo se incrementó la concentración del extracto o compuesto puro aplicado en los discos de papel, comparado a lo reportado para esta técnica (Burgueño-Tapia *et al.*, 2008; Mazoir *et al.*, 2008). El incremento en el 20% del extracto evaluado se realizó con la finalidad de observar de una manera más precisa el efecto de las semillas modelo a la exposición de los extractos, ya que también es importante concientizar que la aplicación de los plaguicidas debe ser cuidadosa, siguiendo las indicaciones del formulado. Un producto a una concentración puede ser inocuo, pero al elevar estas pueden causar cierto efecto fitotóxico, como se observó con los extractos de *A. gaumeri*, *C. chichenesis* y *E. winzerlingii*, los cuales en evaluaciones previas a la concentración estándar (200 mg · disco⁻¹) no causaron efecto fitotóxico alguno con semillas de lechuga (Gamboa-Angulo, 2001 Comunicación personal). Asimismo, también es importante evaluar una serie de variedades de semillas para conocer la sensibilidad de los productos, así como determinar las dosis efectivas de los extractos que presentaron cierta capacidad de alelopatía hacia la elongación radicular.

Varios investigadores mencionan que la composición química de los vegetales depende de su origen geográfico, parte de la planta examinada, fecha de colecta, calidad del suelo y de su entorno. En el caso de los compuestos aleloquímicos, su presencia depende en parte de la competencia por espacio, luz y nutrientes entre las especies vegetales o entre otros organismos como respuesta a factores de estrés biótico y abiótico (Lungu *et al.*, 2011; Gilani *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2008).

4.3.3 EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS CON LOMBRIZ DE TIERRA (*Eisenia fetida*)

En el ensayo de inocuidad contra lombrices de tierra se evaluaron cuatro extractos orgánicos (*B. flammea*, *E. winzerlingii*, *F. incarnatum* AR-8A y AR-8B), la mezcla de furanocumarinas de *D. contrajerva* (Bergapteno y Xantotoxina), un control positivo sintético (Vydate) y un control negativo (Agua). En los resultados se observó que el extracto de *B. flammea* y la mezcla de *D. contrajerva* ocasionaron el 100% de mortalidad a las 48 horas de exposición en *Eisenia fetida*, siendo estos estadísticamente iguales entre si y diferentes comparados con el control negativo agua, el cual no indujo mortalidad ni daño alguno. También se observaron laceraciones en la superficie del cuerpo de las lombrices, ocasionadas por la exposición de los compuestos y el extracto, mismas que se pudieron observar en las lombrices expuestas al Vydate. El extracto metanólico de *F. incarnatum* causó el 65% de mortalidad en las lombrices a las 72 horas de ser expuestas al mismo, siendo este estadísticamente igual al control positivo (Vydate). No se observó laceración alguna en el cuerpo de las lombrices sobrevivientes (35%) a la exposición del extracto AR-8B. Por último, los extractos EWH y AR-8A ocasionaron únicamente el 15 % de mortalidad en las lombrices a las 72 horas de exposición, siendo estos estadísticamente iguales al control negativo (Agua); no se observaron daños corporales en las lombrices sobrevivientes (85%) a la exposición de los extractos EWH y AR-8A (Figura 4.10 y 4.11).

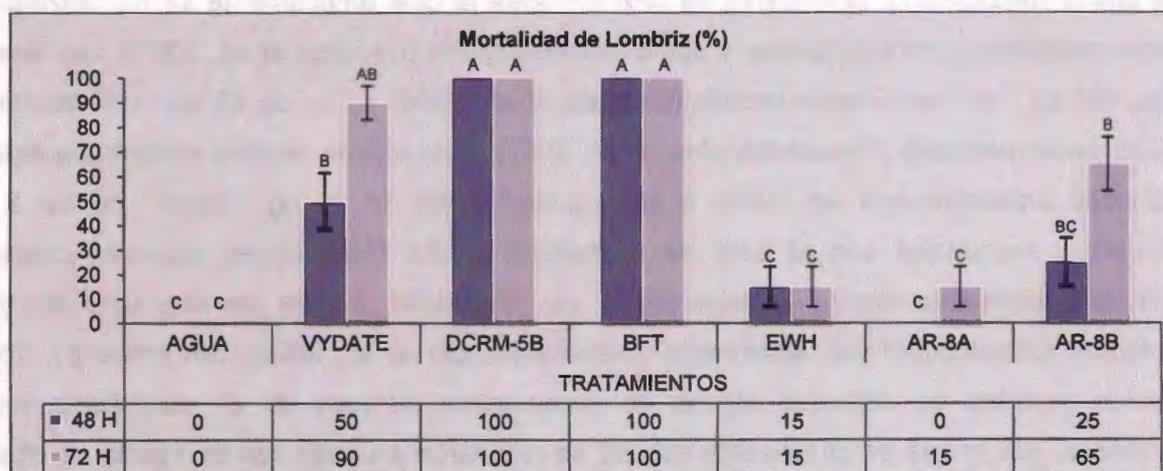


Figura 4.10. Efecto tóxico de extractos orgánicos en *Eisenia fetida*: **BFT:** *Bonellia flammea*; **EWH:** *E. winzerlingii*; **AR-8A:** *F. incarnatum* (AcOEt); **AR-8B:** *F. incarnatum* (MeOH); **DCRM-5B:** Bergapteno y Xantotoxina. Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey P=0.05).

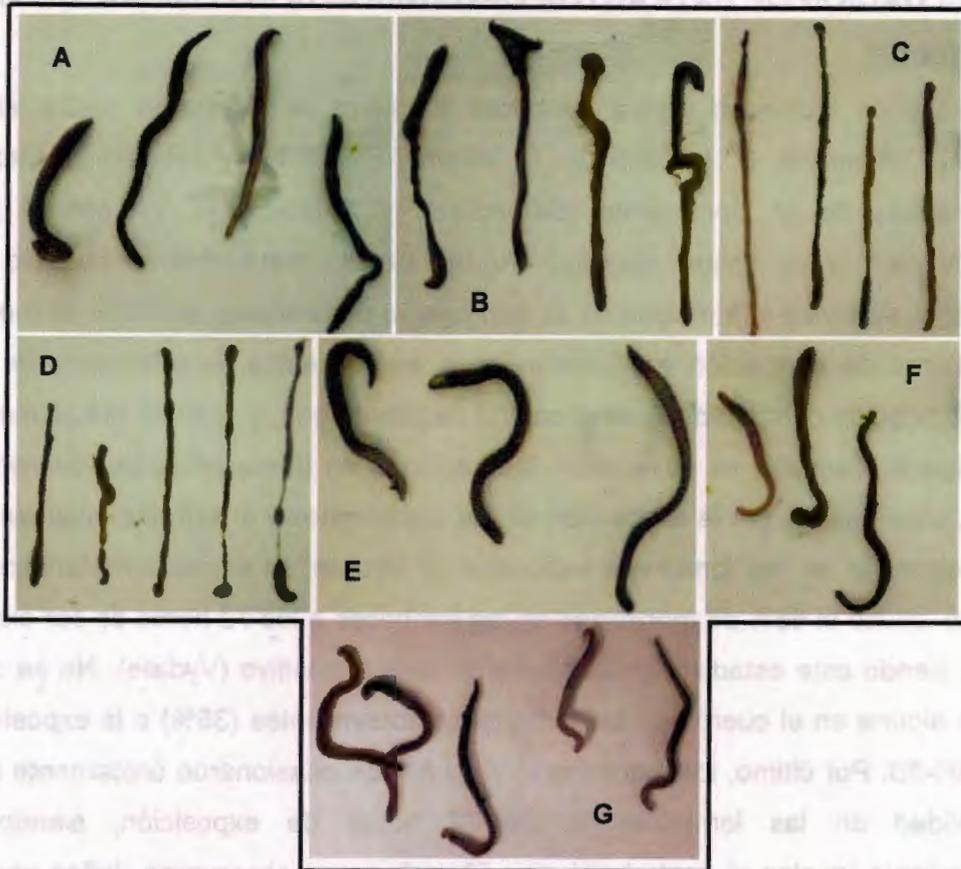


Figura 4.11. Pruebas de inocuidad de extractos orgánicos contra *Eisenia fetida*: **A)** Control negativo (Agua); **B)** Control positivo (Vydate); **C)** DCRM-5B (bergapteno y xantotoxina); **D)** BFT; **E)** AR-8A; **F)** AR-8B; **G)** EWH.

La planta medicinal *D. contrajerva* es una Moracea la cual ampliamente se ha utilizado como antipirético, para la diarrea y como antiprotozoario (Caceres *et al.*, 2001); con una $CI_{50} < 38 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ en *Giardia lamblia* (Calzada *et al.*, 2006) y CI_{50} de $23 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ contra *Leishmania mexicana* (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007). Esta misma especie mostró una alta actividad antialimentaria del 100% a una concentración de $10 \mu\text{g} \cdot \text{disco}^{-1}$ contra *S. littoralis* y nematicida con el 53% de mortalidad contra *Meloidogyne javanica*; fuerte actividad alelopática contra *Lactuca sativa* var. Valladolid, *Lolium perenne* var. Nui y *Solanum lycopersicum* var. Marmande (Gamboa-Angulo *et al.*, 2009). Sin embargo, no existen reportes de actividad alguna de compuestos aislados de *D. contrajerva* en lombrices, por lo que en el presente estudio se realizaron pruebas con la mezcla de dos compuestos (Bergapteno y Xantotoxina) aislados de la planta, los cuales exhibieron una clara actividad tóxica ocasionando el 100% de mortalidad a las 72 horas en *Eisenia fetida*.

En estudios previos se ha reportado que el género *Dorstenia* es particularmente rico en furanocumarinas como el Bergapteno, Bergaptol y un derivado glucosilado del Bergaptol, aislado de *D. contrajerva* (Figura 4.12).

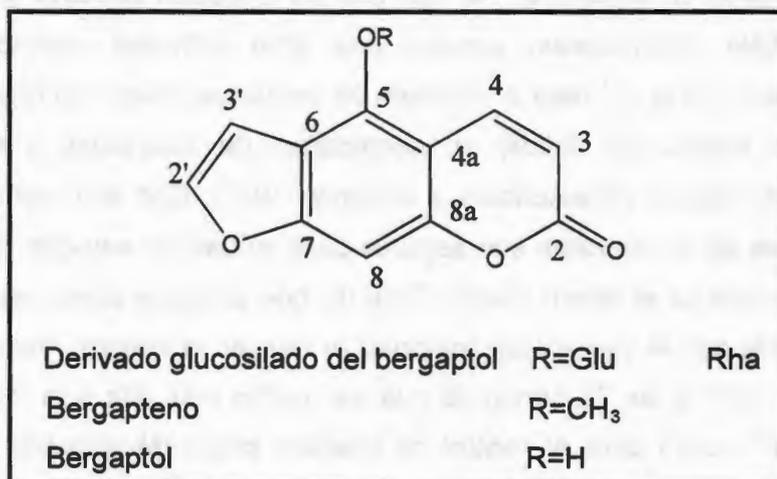


Figura 4.12. Estructura molecular del Bergapteno, Bergaptol y derivado glucosilado de Bergaptol.

Se sabe, que los extractos etanólicos de raíz de *B. flammea* poseen propiedades citotóxicas en células HeLa de cáncer cervical, causando el 94% de mortalidad a una concentración de 33 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a las 48 horas (Sánchez-Medina *et al.*, 2009) y actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* a una concentración de 50 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (García-Sosa *et al.*, 2011). La sakurasosaponina se aisló de la raíz de *B. flammea* y es catalogada como uno de los principales principios activos de esta planta y probablemente ésta sea la responsable de la alta mortalidad en *E. fetida*.

Por otra parte, se han realizado numerosas pruebas de toxicidad *in vitro* y a nivel campo con lombrices, para evaluar el riesgo ambiental que ocasiona el uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura para el control de plagas y enfermedades. Las lombrices de tierra han sido seleccionadas como modelo en ensayos de inocuidad debido a que juegan un papel importante en la homeostasis del suelo, por lo que se les ha denominado biomarcadores de contaminantes. Además, los plaguicidas aplicados en cualquier forma en los cultivos, al final se incorporan al suelo por efecto de los riegos y lluvias, llegando a la macro y microflora benéfica. A pesar de ello, existen pocos reportes sobre el riesgo ambiental que podrían ocasionar el uso de productos naturales en la agricultura sobre las lombrices, ya que en los últimos años se ha fomentado el uso de los mismos y han

pasado a formar parte del sistema de manejo integrado de plagas y enfermedades en la agricultura (Cuadro 4.5). El que los productos sean inocuos a los organismos benéficos son indicadores de una excelente oportunidad para continuar siendo estudiados y a corto plazo ser empleados en el campo. Por ejemplo los extractos acuosos de las hojas de *Apodytes dimidiata* (*Icacinaceae*) poseen una gran actividad molusquicida a una concentración de $0.225 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ para el combate de esquistosomiasis en África, misma que fue probada en lombriz (*E. fetida*) en condiciones de laboratorio y de la cual no observaron efecto alguno (Brackenbury y Appleton 1997). Con esto concluyen que los extractos acuosos de *A. dimidiata* son seguros para su uso en estudios preliminares en campo. Otro ejemplo es el Neem (Sadao Thai III) que contiene como ingrediente activo Azadiractina (0.1% p/v) el cual exhibe toxicidad *in vitro* en la lombriz *Pheretima peguana* ($\text{CL}_{50} = 3.33 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^2$ a las 72 horas), la cual es mucho más alta a la recomendada en campo ($0.09 \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$) para el control de insectos plaga (Muangphra y Gooneratne, 2011). Con esto demostrarán que las dosis recomendadas del extracto comercial de Neem como un insecticida en prácticas agrícolas es seguro para las lombrices de tierra. Sin embargo, las altas concentraciones de Neem en el suelo, pueden causar toxicidad crónica a organismos no plaga, tales como los crustáceos (*Daphnia magna* y *Hyalella azteca*) a través de las lixiviaciones del suelo (Scott y Kaushik, 1998).

En los estudios sistemáticos de bioprospección agroquímica, generalmente a muchos de los extractos y metabolitos que han resultado con altas posibilidades para continuar siendo estudiados no se les determina su inocuidad hacia organismos benéficos, en las primeras etapas de investigación.

Este trabajo aporta el establecimiento en el laboratorio de Biofármacos y Bioplaguicidas de la UBT dos ensayos reportados y aprobados por la OECD (lombriz) como un complemento en la búsqueda de productos naturales eficientes e inocuos con aplicaciones en la agricultura.

Cuadro 4.5. Productos naturales y sintéticos evaluados en lombrices de tierra mediante pruebas de toxicidad para medir riesgo ambiental.

ORGANISMO/ FAMILIA	EXTRACTO/ COMPUESTO NATURAL (Concentración)	COMPUESTO SINTÉTICO (Concentración)	MORTALIDAD (%)	AUTOR(ES)
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Sadao Thai III (Neem- 0.1% p/v)/Azadiractina (5.48 µg/cm ²)	-	>85 (<i>Pheretima peguana</i>)	Muangphra y Gooneratne. 2011.
<i>Streptomyces</i> <i>avermililis</i> (Streptomycetaceae)	Ivermectina (22,23- dihidroavermectina B1) (94% ivermectina B1 _a y 28% Ivermectina B1 _b) (10mg/kg de suelo)	-	90 (<i>Eisenia andrei</i>)	Römbket <i>et al.</i> , 2010.
-	-	Carbofuran (9 mg/kg de suelo)	50 (<i>Perionyx excavatus</i>)	De Silva <i>et al.</i> , 2010.
-	-	Chlorpyrifos (122 mg/kg de suelo)	50	
-	-	Mancozeb (541 mg/kg de suelo)	50	
<i>S. avermitilis</i> (Streptomycetaceae)	Abamectina (80% Avermectina B1 _a y 20% Avermectina B1 _b) (1.03 mg/kg de suelo)	-	50 (en capullos) (<i>Eisenia fetida</i>)	Jensen <i>et al.</i> , 2007.
-	-	Chlorpyrifos (8.3 µg/cm ²)	50 (<i>Eisenia fetida</i>)	Lydy y Linck. 2003.
-	-	Atrazine (2.9 µg/cm ²) Cyanazine (4.9 µg/cm ²)	50 50	

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anaya, A.L., M. Macías-Rubalcava, R. Cruz-Ortega, C. García-Santana, P.N. Sánchez-Monterrubio, B.E. Hernández-Bautista y R. Mata (2005). Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry* 66, 487-494.
- Anaya, A.L., R. Mata, J.L. Sims, A. González-Coloma, R. Cruz-Ortega, A. Guadaño, B.E. Hernández-Bautista, S.I. Midland, G. Ríos y A. Gómez-Pompa (2003). Allelochemical potential of *Callicarpa acuminata*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(12), 2761-2776.
- Booth, L.H., V.J. Heppelthwaite y K. O'Halloran (2005). Effects-based assays in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* their utilisation for evaluation of contaminated sites before and after remediation. *Journal of Soils and Sediments* 5(2), 87-94.
- Brackenbury, T.D. y C.C. Appleton (1997). Acute toxicity evaluation of the plant molluscicide, *Apodytes dimidiata* (Icacinaceae), to *Eisenia fetida* (Oligochaeta) and *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) in South Africa. *Acta Tropica*, 63, 1-14.
- Burgueño-Tapia, E., L. Castillo, A. González-Coloma y P. Joseph-Nathan (2008). Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene *p*-benzoquinone perezone and some of its derivatives. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 766-771.
- Caceres, A., L. Rastrelli, F. De Simone, G. De Martino, C. Saturnino, P. Saturnino y R. Aquino (2001). Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*, 72, 376-381.
- Calzada, F., L. Yépez-Mulia y A. Aguilar (2006). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 367-370.
- Chon, S.U., H.G. Jang, D.K. Kim, Y.M. Kim, H.O. Boo y Y.J. Kim (2005). Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Scientia Horticulturae*, 106, 309-317.
- Cristóbal-Alejo, J., J.M. Tun-Suárez, S. Moguel-Catzín, N. Marbán-Mendoza, L. Medina-Baizabal, P. Simá-Polanco, S.R. Peraza-Sánchez y M.M. Gamboa-Angulo (2006). Sensibilidad *in vitro* de *Meloidogyne incognita* a extractos de plantas nativas de Yucatán. *Nematropica*, 36, 89-97.

- Cruz Estrada, A. (2009). Efecto de extractos vegetales en el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 93 p.
- D'Abrosca, B., M. Dellagrecia, A Fiorentino, P. Monaco y A. Zarrelli (2004). Low molecular weight phenols from the bioactive aqueous fraction of *Cestrum parqui*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 4101-4108.
- De Almeida L.C, M.L. Ferreira y A.J. Demuner (2001). Preparation and phytotoxicity of sorgoleone analogues. Química Nova, 24(6), 751-755.
- De Silva, P.M.C.S., A. Pathiratne y C.A.M. van Gestel (2010). Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavates*. Applied Soil Ecology, 44, 56-60.
- Ding, L., L. Qi, H. Jing, J. Li, W. Wang y T. Wang (2008). Phytotoxic effects of leukamenin E (an *ent*-kaurene diterpenoid) on root growth and root hair development in *Lactuca sativa* L. seedlings. Journal Chemical Ecology, 34, 1492-1500.
- Gamboa-Angulo, M.M., J. Cristóbal-Aleje, I.L. Medina-Baizabal, F. Chí-Romero, R. Méndez-González, P. Simá-Polanco y F. May-Pat (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 1955-1959.
- Gamboa-Angulo, M.M., S.R. Peraza-Sánchez, M.F. Andrés-Yeves y A. González-Coloma (2009). Pesticide and Allelopathy properties of *Dorstenia contrajerva* L. collected in Yucatán. 8 th PSE Meeting on Biopesticides and 2nd RSEQ-GPQNP, La Palma, Islas Canarias, España 21-26 de Septiembre.
- García-Sosa, K., A. Sánchez-Medina, S.L. Álvarez, S. Zacchino, N.C. Veitch, P. Simá-Polanco y L.M. Peña-Rodríguez (2011). Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. Natural Product Research, 25(12), 1185-1189.
- Gilani, S.A., Y. Fujii, Z.K. Shinwari, M. Adnan, A. Kikuchi y K.N. Watanabe (2010). Phitotoxic studies of medicinal plant species of Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 42(2), 987-996.
- Harborne, J.B. (1980). Plant phenolics. In: Secondary plant products, Bell, E.A. y B.V. Charlwood (Eds). Encyclopedia of plant physiology. Springer Verlag, New York. pp. 329-402.

- Henson-Ramsey, H., S. Kennedy-Stoskopf, J. Levine, D. Shea, S.K. Taylor y M.K. Stoskopf (2007). A Comparison of two exposure systems to apply malathion to *Lumbricus terrestris* L. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 78, 427-431.
- Jensen, J., X. Diao y J.J. Scott-fordsmand (2007). Sub-lethal toxicity of the antiparasitic abamectin on earthworms and the application of neutral red retention time as a biomarker. Chemosphere, 68, 744-750.
- Ley Federal de Sanidad Vegetal (2007). Última reforma publicada DOF 26-07-2007. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. pp 1-35.
- Li, G., K. Zhang, J. Xu, J. Dong y Y. Liu (2007). Nematicidal substances from fungi. Recent Patents on Biotechnology 1, 1-22.
- Lors, C., J.F. Ponge, M. Martínez y D. Damidot (2010). Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils. Environmental Pollution, 158(8), 2640-2647.
- Lungu, L., C.V., Popa, J. Morris y M. Savoiu (2011). Evaluation of phytotoxic activity of *Melia azedarach* L. extracts on *Lactuca sativa* L. Romanian Biotechnological Letters, 16(2), 6089-6095.
- Lydy, M.J. y S.L. Linck (2003). Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 45, 343-349.
- Marques, C., R. Pereira y F. Goncalves (2009). Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. Journal of Soils and Sediments, 9, 137-147.
- Mayer, A., H. Anke y O. Sterner (1997). Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematicidal activity from *Omphalotus olearius* I. Fermentation and biological activity. Natural Product Letters, 10, 25-32.
- Mazoir, N., A. Benharref, M. Bailén, M. Reina y A. González-Coloma (2008). Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. Phytochemistry 69, 1328-1338.
- Muangphra, P. y R. Gooneratne (2011). Toxicity of commercial neem extract to earthworms (*Pheretima peguana*). Applied and Environmental Soil Science, vol. 2011, Article ID 925950, 8 pages. doi:10.1155/2011/925950

- OECD, Organization of Economic Cooperative Development (1984). Earthworm Acute Toxicity Tests #207.
- Peraza-Sánchez, S.R., F. Cen-Pacheco, A. Noh-Chimal, F. May-Pat, P. Simá-Polanco, E. Dumonteil, M.R. García-Miss y M. Mut-Martín (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Ramírez, W.A., X. Domene, P. Andrés y J.M. Alcañiz (2008). Phytotoxic effects of sewage sludge extracts on the germination of three plant species. *Ecotoxicology*, 17, 834-844.
- Robidoux, P.Y., C. Dubois, J. Hawari y G.I. Sunahara (2004). Assessment of soil toxicity from an antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia andrei* in mesocosms and laboratory studies. *Ecotoxicology*, 13, 603-614.
- Römbke, J., K.A. Krogh, T. Moser, A. Scheffczyk y M. Liebig (2010). Effects of the veterinary pharmaceutical ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 332-340.
- Ruiz Jiménez, A. (2011). Evaluación de extractos fúngicos en modelos insecticidas y antifúngicos. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 133 p.
- Sánchez-Medina, A., L.M. Peña-Rodríguez, F. May-Pat, Gloria Karagianis, P.G. Waterman, A.I. Mallet y S. Habtemariam (2009). Identification of sakurasosaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. *Natural Product Communications*, 4(0), 1-6.
- Savard, K., Y. Berthelot, A. Auroy, P.A. Spear, B. Trottier y P.Y. Robidoux (2007). Effects of HMX-Lead mixtures on reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 351-358.
- Scott, I.M. y N.K. Kaushik (1998). The toxicity of margosan-O, a product of neem seeds, to selected target and nontarget aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 426-431.
- Shao, H., S. Peng, X. Wei, D. Zhang y C. Zhang (2005). Potential allelochemicals from an invasive weed *Mikania micrantha* H.B.K. *Journal of Chemical Ecology*, 31(7), 1657-1668.
- Shaukat, S.S., I.A. Siddiqui, G.H. Khan y M.J. Zaki (2002). Nematicidal and allelopathic potential of *Argemone mexicana*, a tropical weed. *Plant and Soil* 245, 239-247.

- Sterner, O., W. Etzel, A. Mayer y H. Anke (1997). Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematicidal activity from *Omphalotus olearius* II. Isolation and structure determination. *Natural Product Letters*, 10, 33-38.
- Vargas Díaz, A. (2009). Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 107 p.
- Zamorano, C. y C.L. Fuentes (2005). Potencial alelopático de *Brassica campestris* subsp. *rapa* y *Lolium temulentum* sobre la germinación de semillas de tomate. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 256-260.
- Zasada, I.A., W. Klassen, S.L.F Meyer, M. Codallo y A.A. Abdul-Baki (2006). Velvetbean (*Mucuna pruriens*) extracts: impact on *Meloidogyne incognita* survival and on *Lycopersicon esculentum* and *Lactuca sativa* germination and growth. *Pest Management Science*, 62, 1122-1127.

CAPITULO V.

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

La obtención de extractos orgánicos con actividad biológica de diferentes tipos de organismos ha sido objeto de estudio por diversos autores quienes han aislado compuestos con utilidad promisoria en la agricultura (Dayan *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2004; Nitao *et al.*, 2002). A pesar de que los extractos fúngicos evaluados en este estudio no mostraron actividad nematocida alguna, es importante continuar con la búsqueda de los mismos, ya que en la actualidad las industrias de productos agrícolas se están enfocando en la obtención de productos naturales por presentar muy bajo o nulo impacto al ambiente y que a su vez sean potentes y posean una mayor especificidad hacia plagas y enfermedades. También, es importante mencionar que los productos candidatos para ser catalogados como posibles plaguicidas alternativos deben ser evaluados en pruebas de inocuidad, con el objetivo de comprobar que son inocuos al ambiente, a los organismos benéficos y a los mamíferos (Burgueño-Tapia *et al.*, 2008; Zasada *et al.*, 2006; Brackenbury y Appleton 1997). Por lo que en este estudio, tanto a los extractos fúngicos como vegetales con actividad bioplaguicida se les evaluó con semillas de lechuga y tomate y con lombrices de tierra, observando como se esperaba, que la mezcla de furanocumarinas de *D. contrajerva* (DCRM-5B) fue altamente tóxica en los tres modelos evaluados en un porcentaje del 50 al 100%. Sin embargo, este producto puede evaluarse contra especies vegetales plaga en cultivos como pastizales. A pesar de que algunos de los extractos orgánicos fueron tóxicos a los modelos de inocuidad, es recomendable realizarles pruebas a nivel invernadero y campo para tener un panorama más amplio de los efectos de los mismos, así como variar las concentraciones a utilizar y por ultimo también es recomendable evaluarlos con otros modelos blanco para observar la especificidad de los mismos.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

- El cultivo de los hongos en medios sólidos (FES) como el arroz fermentado mostraron mayores rendimientos en sus extractos orgánicos, con respecto a los cultivos en medio líquido.
- Los extractos fúngicos de *C. rosea* y de otras cepas selectas evaluados contra juveniles J₂ de *M. incognita* a una concentración de 300 µg · ml⁻¹, no mostraron actividad nematocida a las 48 horas de exposición *in vitro*.
- Los bioensayos de inhibición contra semillas de lechuga y tomate, así como el de inocuidad de la lombriz de tierra se establecieron exitosamente en el laboratorio.
- Los resultados obtenidos de las evaluaciones de inocuidad arrojaron que el extracto de *B. flammea* y la mezcla de *D. contrajerva* no son recomendados para el combate de plagas y enfermedades en campos agrícolas ya que mostraron una fuerte toxicidad en organismos benéficos como la lombriz.
- Con el presente trabajo se enriquece el conocimiento de las propiedades biológicas en general de los extractos orgánicos obtenidos de distintas fuentes de las regiones tropicales del sureste de México, como posibles nuevos candidatos de productos biotecnológicos ecoamigables para el control de plagas y enfermedades en cultivos agrícolas.

CONCLUSIONES GENERALES

- El cultivo de los hongos en medios sólidos (ES) como el arroz fermentado mostraron mayores rendimientos en sus extractos orgánicos con respecto a los cultivos en medio líquido.
- Los extractos fúngicos de *C. rosea* y de otras cepas seleccionadas contra el agente *A. niger* a una concentración de 300 µg/ml, no mostraron actividad antimicrobiana a las 48 horas de exposición in vitro.
- Los hongos de inhibición contra semillas de lechuga y tomate, así como el de la actividad de la tomata de tierra se establecieron exitosamente en el laboratorio.
- Los resultados obtenidos de las evaluaciones de inocuidad muestran que el extracto de *B. firmus* y la mezcla de *C. conglutinans* no son recomendables para el control de plagas y enfermedades en campos agrícolas ya que mostraron una fuerte actividad en organismos benéficos como la tomata.
- Con el presente trabajo se enfatiza el conocimiento de las propiedades biológicas en general de los extractos orgánicos obtenidos de distintas fuentes de las regiones tropicales del sureste de México, como posibles nuevas candidatas de productos fitoquímicos recomendables para el control de plagas y enfermedades en cultivos agrícolas.

5.3 PERSPECTIVAS

- Continuar el monitoreo de extractos fúngicos con actividad nematocida para el combate de nematodos fitoparásitos.
- Optimizar la producción de extractos y/o compuestos activos a través de la modificación de medios y sustratos de cultivo y a las condiciones bióticas y abióticas a las que se lleva su crecimiento.
- Aislar los compuestos que les confieren actividad a los extractos orgánicos contra algún organismo plaga, evaluados en pruebas de inocuidad en el presente trabajo.
- Continuar con las evaluaciones de inocuidad de los extractos orgánicos en otros organismos modelo para tener un panorama más amplio con respecto al riesgo ambiental.
- Llevar las evaluaciones a nivel invernadero y campo, con el fin de determinar la efectividad de los extractos candidatos mismos.

5.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brackenbury, T.D. y C.C. Appleton (1997). Acute toxicity evaluation of the plant molluscicide, *Apodytes dimidiata* (Icacinaceae), to *Eisenia fetida* (Oligochaeta) and *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) in South Africa. *Acta Tropica*, 63, 1-14.
- Burgueño-Tapia, E., L. Castillo, A. González-Coloma y P. Joseph-Nathan (2008). Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene *p*-benzoquinone perezone and some of its derivatives. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 766-771.
- Dayan, F.E., C.L. Cantrell y S.O. Duke (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 4022-4034.
- Nitao, J.K., S.L.F. Meyer, J.E. Oliver, W.F. Schmidt y D.J. Chitwood (2002). Isolation of flavipin, a fungus compound antagonistic to plant-parasitic nematodes. *Nematology* 4(1), 55-63.
- Schwarz, M., B. Köpcke, R.W.S. Weber, O. Sterner y H. Anke (2004). 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry*, 65, 2239-2245.
- Zasada, I.A., W. Klassen, S.L.F Meyer, M. Codallo y A.A. Abdul-Baki (2006). Velvetbean (*Mucuna pruriens*) extracts: impact on *Meloidogyne incognita* survival and on *Lycopersicon esculentum* and *Lactuca sativa* germination and growth. *Pest Management Science*, 62, 1122-1127.