



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS**

**LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**SISTEMA DE DETECCIÓN Y SELECCIÓN DE HONGOS FITOTÓXICOS  
PRESENTES EN SUELOS**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE  
LINCENCIADA EN QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**

**p.Q.F.B. VALERIA MORENO GONZÁLEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**D.C. SERGIO R. TREJO ESTRADA**

**ASESOR INTERNO**

**D.C. LAURA MORALES LARA**

**ASESOR TÉCNICO**

**M.C NATHANIEL ZUÑIGA PEREZ**

**JUNIO 2023**



**“HUP, 50 años de enseñanza y salud”**

OFICIO C.Q./CT 044P/2022

**C. Valeria Moreno González**  
**PRESENTE**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Área de Bioquímica-Alimentos, le comunico que su anteproyecto de Tesis denominado:

**“Sistema de detección y selección de hongos fitotóxicos presentes en suelos”**

ha sido autorizado, siendo:

**D.C. Sergio R. Trejo Estrada, Director De Tesis**  
**D.C. Laura Morales Lara, Asesor Interno**  
**M.C. Nathaniel Zúñiga Pérez, Asesor Técnico**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales que tenga lugar.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., 29 de septiembre de 2022

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez  
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena digital: 2Vp.Cn\$Dp!Wv)V\$\*Vc\$Hk'Xo.Om,Dr,Vu'Vx'Pv%Ue(Xq!If%TI/Xd\$Op\$Ik"Oc!Eq\*Xm-Hm+Fa/Zo.Jc(Oj(Ru(Be+Sn&Co\*Qz"Uq"Ol+Uv,Am,Bk)Sp,Yj!Qb)Dh.Qf\$Vq'Gd!Iz#Jv%Xh"Br!Ba"Xw\$Ls+Cu!Wa&Fw%Ip\$Cz+Cq.Rl-Xw)Kr&Ug!Vw!Hl"Sn)Yp#Bu.Hs\$Bp)Yt,Sj#Ad\*Aa)Vy%Ef'Hk/Bh&Jr#Pd"Dr#Ut#Lw+ly-Wm#Vt"Oq.Yw!Ly&Op!Zh"Au/Yi"

Facultad  
de Ciencias  
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9  
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel  
Puebla, Pue. C.P. 72540  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 004CR/2023

**Dr. Armando Mena Contla**  
**Dra. Ivonne Pérez Xochipa**  
**Dra. Edith Chávez Bravo**

Con toda atención comunico a Ustedes que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora del trabajo de Tesis que presenta la pasante de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

**Valeria Moreno González**

cuyo título es:

**“SISTEMA DE DETECCIÓN Y SELECCIÓN DE HONGOS FITOTÓXICOS PRESENTES EN SUELOS”**

Asimismo, les solicitamos que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente  
“Pensar bien, para vivir mejor”  
H. Puebla de Z., 7 de febrero de 2023

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez  
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena Digital: 9Ph'Fd/Cp,Yg!Ae'Vk(Wr!Za,Nk-Oc'Qs&Fe!Pl+Pa\$Nw&Nt-Tk'Dc#Mz''Ry&Dw!Ia\*Fm+Ad/Yk)Qd'It'Zw+Bc+Ls#Mi/Io.So,Wk+Yi+Qc'Bb-Bq''Xm''Pu(Ap\*Qd%Gx+Qd'Xe'Aj+Nk,Yi,Jh(Te%Sn-Im/Vt-Va''Eu,Ji(Wo/Aw&Wn/Rg-Qv#Ls,Oq&Mr%Xi'Tm)Kc\*Th\$Uj#Me%Lh%Wg,St)Tg+Wj+Dv%Br\*Xz''Ig,Dt/Zo,Jr.Pr(Bi(Se\*Jw/Zh&Fb-Co!Ee,Fs#Xr,

Facultad  
de Ciencias  
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9  
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel  
Puebla, Pue. C.P. 72540  
01 (222) 229 5500 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 024A/2023

**Dr. Jorge R. Cerna Cortez**  
**Director Facultad de Ciencias Químicas**  
**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis de la alumna de la Licenciatura en Química Farmacobiólogo

**Valeria Moreno González**

comunican a Usted la autorización para la publicación del trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Sergio R. Trejo Estrada, D.C. Laura Morales Lara y del M.C. Nathaniel Zúñiga Pérez, con el siguiente título:

**"Sistema de detección y selección de hongos fitotóxicos presentes en suelos"**

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 22 de mayo de 2023.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 23 de mayo de 2023

**Dr. Armando Mena Contla, Presidente**

**Dra. Ivonne Pérez Xochipa, Secretario**

**Dra. Edith Chávez Bravo, Vocal**

c.c.p. Archivo

Cadena digital: Sle"Ty!Sr'He!Km{Kk\$Ra!Zo\$Af,Dk+Ti+Mt\$Bi/Xj"Si(We%Kd.Ty-Oh\*Pt%Mv!Re.St-Bh,Yp,Vj)/Lw-An%AA\*Bj#Qh#Sb,Dm&Bp'Ob)Jh'Jz{Wd"Ga,Rp{Mr,Sm.Ib"Ld"Wx&Ny!Wg\$Ad-Kb+Aq!Wi+Qc#Gx\*Pi'Bu"Jf#Gm#Xg-Pl+Sf\$Xg"Ew'Ji\*Eu/Fa/Cc)Ef\$Au&Rt\*Gb-Kz.Pf\*Fo(Kg)Zs#Jg.Uk\$Da.Sy,Lk/Vk+R),Ja!Kj.Xt/Vk"Gg-Zj&lp/Px,Pd!Hc-

Facultad  
de Ciencias  
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9  
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel  
Puebla, Pue. C.P. 72540  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390

OFICIO 4

## AGRADECIMIENTOS

## DEDICATORIAS

## INDICE

Resumen	10
Introducción	11
1. Antecedentes	12
1.1 Sistema de clasificación de los reinos	12
1.2 Especies de hongos y su impacto agrícola	12
1.2.1 <i>Aspergillus</i>	13
1.2.2 <i>Alternaria</i>	14
1.2.3 <i>Fusarium</i>	14
1.2.4 <i>Colletotrichum</i>	15
1.2.5 <i>Mucorales</i>	15
1.2.6 <i>Cladosporium</i>	15
1.3 Enfermedades causadas por hongos fitotóxicos	16
1.3.1 Pudrición peduncular	16
1.3.2 Síndrome de muerte súbita	17
1.3.3 Cáncer de ciprés	17
1.3.4 Cáncer de las yemas y nudos de las drupáceas	17
1.4 Conocimiento actual de fitotoxinas	18
1.5 Utilidad de bioensayos en la detección de la fitotoxicidad	20
1.5.1 Tipos de bioensayos comúnmente empleados para evaluar la fitotoxicidad	21
1.5.2 Bioensayos de fitotoxicidad en semillas de monocotiledóneas	22
1.6 Medios de cultivo para diferentes tipos de hongos	23
2. Justificación	25
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos particulares	26
4. Diagrama de trabajo	27
5. Material y métodos	28
5.1 Material	28
5.2 Material biológico	28
5.3 Equipos	28
5.4 Métodos	29
6. Metodología	29
6.1 Muestreo de suelos y técnica utilizada	29
6.1.1 Características de suelos	30
6.1.2 Acondicionamiento de suelos	30
6.2 Siembra de Material biológico	31
6.3 Detección de hongos fitotóxicos	31
6.3.1 Preparación del inoculo	32
6.3.2 Purificación de cepas de hongos	32
6.4 Evaluación de cultivo líquido estático	32
6.5 Desarrollo de cultivo aerobio en matraz agitado y estático	33

6.6 Detección de fitotóxicos difusibles	33
7. Resultados	33
7.1 Desarrollo y evaluación de un nuevo sistema de detección <i>in vitro</i> de suelos que promueven fitotoxicidad	33
7.2 Aislamiento de cepas de hongos a partir de suelos promotores de fitotoxicidad	39
7.3 Evaluación y selección de cultivos capaces de producir fitotoxinas difusibles	41
8. Conclusión	48

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio es desarrollar un sistema *in vitro* que permita la detección, aislamiento y selección de hongos filamentosos productores de fitotoxinas, mediante el desarrollo de una metodología que permita y facilite la detección, caracterización y funcionalidad *in vitro* e *in situ* de productos naturales que presentan actividad fitotóxica con potencial aplicación en el control de arvenses o malezas de impacto económico en cultivos de maíz, cítricos, caña de azúcar, trigo, avena y cebada, lo que contribuirá a la producción sustentable de bienes agrícolas o agroalimentarios, contribuyendo a la disminución del impacto que puede generar el empleo de herbicidas sintéticos comerciales, por su baja biodegradabilidad y alta residualidad en granos, hortalizas y frutos.

Se realizó un estudio de suelos a partir de 8 muestras de zonas agrícolas diferentes; con técnicas para la detección, purificación y evaluación de hongos fitopatógenos. Los resultados mostraron que las diferentes muestras presentaron una diversidad de hongos aislados, los cuales fueron puestos en diferentes medios de cultivo obteniendo nueve hongos capaces de producir efectos fitotóxicos principalmente dos de estos al exponerlos a diferentes temperaturas, en medios en agitación y en medios estáticos presentaron mayor efecto de restricción de crecimiento.

## **INTRODUCCION**

El estudio y manejo de microorganismos toma cada día más relevancia en el mundo de la investigación y desarrollo de procesos y productos, ya que juegan un papel muy importante en diferentes áreas, tales como, industria de alimentos, procesos clínicos, desarrollos ambientales, industria farmacológica, innovación agrícola, entre otras; esta última se ha visto forzada a desarrollar innovación biotecnológica debido a las malezas que son plantas que se encuentran en cultivos agrícolas de interés, parasitando la zona radicular dedicada a estos cultivos y los desprovee de nutrientes destinados a estos mismos, cómo consecuencia su crecimiento, fructificación, y/o desarrollo no se lleva a cabo de manera adecuada e incluso se llegan a ver afectadas por plagas que atraen este tipo de plantas. Por estas razones es que se prefiere aplicar herbicidas sintéticos que son de rápida respuesta pero de alta toxicidad para la misma planta y para el ser humano, debido a que estos productos contienen componentes químicos los cuales son dañinos para la salud humana y animal ya que tienen baja biodegradabilidad y alta residualidad en granos, hortalizas y frutos; es por ello que en este estudio se presenta el desarrollo de un sistema capaz de detectar, aislar y seleccionar hongos con capacidad de producir fitotoxinas, que pueden lograr suprimir el crecimiento y desarrollo de estas malezas, permitiendo un óptimo desarrollo de los cultivos de interés. La metodología que se propone puede servir para la obtención tanto de cepas productoras de fitotoxinas, como para la obtención de estas fitotoxinas y su efecto sobre las malezas.

## **1 ANTECEDENTES**

### **1.1 Sistema de clasificación de los reinos**

El filósofo griego Aristóteles (384-322 a.C.) es considerado por muchos autores como el 'padre de las clasificaciones'. A partir del reconocimiento de la necesidad de agrupar y nombrar a plantas y animales para facilitar su estudio, dividió al mundo natural en dos grandes reinos: el reino animal y el vegetal. Otro actor fundamental en la historia de las clasificaciones científicas es el científico y naturalista sueco Carl Lineo (1707-1778) quien, sin duda alguna, marca un importante paso en el trabajo sistemático de clasificación de los organismos. El biólogo y filósofo alemán Ernst Haeckel (1834-1919) introdujo, en 1866, un tercer reino que desafiaba la antigua forma de clasificación de lo vivo en animales y plantas. Protistas, tal como fue denominado, estaba constituido por formas unicelulares que no podían ser categorizadas en los reinos conocidos hasta ese momento. El naturalista francés Édouard Chatton (1883-1947) descubre que las células pueden ser divididas en dos grandes grupos en base a sus características morfológicas: aquellas que poseen núcleo y organelas internas y aquellas que no. Por fin, en 1959, el botánico y ecólogo vegetal norteamericano Robert Whittaker (1920-1980) propuso un quinto reino, el de los hongos. Tenemos así dos sistemas clasificatorios – la dicotomía eucariotas-procariotas y el esquema de cinco reinos: animal, vegetal, protista, monera y hongos a pesar de que nuevos sistemas han sido propuestos para reemplazar al sistema dicotómico, este no ha desaparecido como sistema de clasificaciones y continúa siendo utilizado ampliamente dentro de la comunidad científica (Fernández, 2012).

### **1.2 Especies de hongos y su impacto agrícola**

En la biosfera, los hongos ocupan un papel fundamental como degradadores de la materia orgánica, lo que permite la liberación y reutilización de elementos y nutrientes de organismos muertos. Esta capacidad de degradar la materia orgánica, y en particular los restos vegetales, requiere conjuntos enzimáticos complejos que también son relevantes para su papel como patógenos porque muchas de esas mismas proteasas, fosfolipasas, celulasas, hemicelulasas, pectinasas, ligninas y nucleasas pueden desempeñar un papel importante en la

virulencia. Un número relativamente pequeño de especies fúngicas son fitopatógenas, causan enfermedades en el humano como infecciones, alergias, estos organismos producen toxinas que afectan a plantas, animales y humanos. Entre los hongos patógenos están los miembros de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* junto con otros géneros (por ejemplo, *Alternaria*, *Mucor*) que son denominados patógenos fúngicos emergentes. Estos hongos representan una amenaza común tanto para la producción agrícola como para la salud de las personas sanas o inmunodeficientes. En conjunto, estos hongos pueden causar enormes pérdidas económicas en la agricultura, pérdidas alimenticias por deterioro, y enfermedades en humanos y animales graves, a menudo fatales (De Lucca, 2007).

### **1.2.1 *Aspergillus***

Las plantas tienen varios niveles de resistencia (estructural, innata, inducida) a la infección por hongos. Sin embargo, ciertos factores, como el estrés por calor, el daño por insectos y la sequía, debilitan la resistencia de los cultivos a estos hongos y, por lo tanto, juegan un papel importante en la invasión fúngica de estos cultivos y la posterior producción de toxinas (Abbas *et al.*, 2002, Cotty *et al.*, 1994, McMillian *et al.*, 1977, Pitt JI *et al.*, 2000). La humedad y el contenido de nutrientes de la semilla en el rango medio del desarrollo de la semilla proporcionan condiciones óptimas para el desarrollo de hongos y la producción de toxinas (Lillehaj *et al.*, 1987).

El género *Aspergillus* son saprofitos que se encuentran en todo el mundo en el suelo, productos forrajeros, productos alimenticios, polvo, desechos orgánicos y materia en descomposición. Aunque se consideran patógenos vegetales débiles (Gugnani *et al.*, 2003), hay dos especies, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que producen toxinas potentes (aflatoxinas) en ciertos cultivos. Las semillas oleaginosas y los frutos secos, como el maní, el maíz y la semilla de algodón, son especialmente susceptibles a estas especies. *A. flavus* es el dominante de los dos en el maíz y la semilla de algodón (Hill *et al.*, 1985, Klich *et al.*, 1986). Por el contrario, *A. parasiticus* prevalece más en los cacahuets que en otros cultivos (Diener *et al.*, 1987) y, por lo general, constituye aproximadamente del 10 al 30 % de los hongos productores de aflatoxinas en los cacahuets (Hill *et al.*, 1985). Los híbridos de maíz que tienen un alto contenido de aceite tienen un

mayor riesgo de contaminación por aflatoxinas que los híbridos normales durante algunas temporadas de crecimiento (Severns *et al.*, 2003).

### **1.2.2 *Alternaria***

Las especies de *Alternaria* producen micotoxinas que pertenecen a tres grupos estructurales diferentes: (Abano *et al.*, 2004) derivados de dibenzopirona de alternariol, alternariol metil éter y alternueno; (Abbas *et al.*, 1998) las alteroxinas derivadas del perileno (ATX-I y II); y (Abbas *et al.*, 2002) el derivado del ácido tetrámico, ácido tenuazónico (Li *et al.*, 2001). Las toxinas de *Alternaria* son citotóxicas, in vitro, para células bacterianas y de mamíferos, y son fetotóxicas y teratogénicas en ratones y hámsters (Visconti *et al.*, 1994). Se sabe que estas toxinas bloquean la síntesis de esfingolípidos al inhibir la enzima limitante de la velocidad, la ceramida sintasa, aunque no son tan activas como la fumonisina B1 en este sentido (Van *et al.*, 1998).

*Alternaria alternata* es un patógeno de las semillas de cereales, como el sorgo y el trigo, donde el crecimiento de hongos causa inicialmente una decoloración de la superficie, seguida de la descomposición de los componentes de la semilla (Hasan *et al.*, 1999, Waniska *et al.*, 2001).

### **1.2.3 *Fusarium***

Algunos son saprofitos del suelo, mientras que otros son verdaderos patógenos de plantas. Los fitopatógenos de este género son los hongos toxigénicos más importantes en los cultivos de las regiones templadas del norte. Son responsables de varias enfermedades importantes de las plantas, como el marchitamiento vascular y el tizón previo y posterior a la emergencia, así como la pudrición de raíces y tallos. *Fusarium avenaceum*, *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae* y *Fusarium oxysporum* son los agentes causantes de FHB en la cebada y, a menudo, conducen a una pérdida significativa de grano en todo el mundo; La infección del grano da como resultado pérdidas económicas debido a la reducción de la cabeza del grano, con pérdida de calidad de molienda y malteado. Los granos infectados también están contaminados por potentes metabolitos secundarios tóxicos (descritos más adelante) producidos por estos hongos (Choo *et al.*, 2004, Salas *et al.*, 1999, Steffenson *et al.*, 1998).

#### **1.2.4 Colletotrichum**

Colletotrichum se distribuye en todo el mundo y se considera uno de los géneros fúngicos fitopatógenos más graves (Cano *et al.*, 2004). Los miembros del género causan antracnosis de campo, lo que provoca importantes pérdidas económicas en muchos cultivos, como cereales, legumbres, café y caucho (Latunde-Dada *et al.*, 2001). Dos de las especies fitopatógenas son también patógenos humanos. Uno de ellos, Colletotrichum gloeosporioides, afecta a muchos cultivos de importancia agrícola en todo el mundo.

El otro fitopatógeno de este grupo que afecta la salud humana es Colletotrichum coccodes, un patógeno de la papa cada vez más importante. Este hongo causa manchas en los tubérculos (enfermedad del punto negro) y enfermedades foliares (Lees *et al.*, 2003).

#### **1.2.5 Mucorales**

Mucor y Rhizopus son miembros del grupo Mucorales que contienen patógenos tanto de plantas como de humanos. Se encuentran en todo el mundo y en muchos tipos de climas y terrenos. Estos hongos causan pudriciones en frutos tanto en campo como en postcosecha. Las lesiones mecánicas durante la cosecha y el manejo posterior a la cosecha proporcionan un sitio de infección por estos hongos (Bruton *et al.*, 1994). Rhizopus arrhizus causa una pudrición húmeda y jugosa de las uvas en climas cálidos y húmedos (Compendium *et al.*, 1998). En climas húmedos, el hongo puede extenderse a otras bayas en el racimo de uva causando la pudrición del racimo.

#### **1.2.6 Cladosporium**

Las especies de Cladosporium causan el deterioro de las verduras recién cosechadas, lo que genera grandes pérdidas económicas. Entran en el tejido de la planta después de lesiones mecánicas o por frío o después de que la barrera de la piel de la planta se haya visto comprometida por otros organismos (Tournas *et al.*, 2005). Cladosporium cladosporioides causa descomposición en frutas, verduras y otros productos agrícolas, especialmente después de la cosecha. Además de la infección posterior a la cosecha, C. cladosporioides puede causar pudrición de la uva en el viñedo (Compendium *et al.*, 1998).

### 1.3 Enfermedades causadas por hongos fitotóxicos

Los hongos fitopatógenos causan enfermedades en las plantas, definir cuáles de ellos son de mayor relevancia, varía según las prioridades científicas y económicas de una región geográfica; algunos representan altos riesgos para la seguridad alimentaria o son modelos de estudio en temas relacionados con factores epidemiológicos y genética vegetal. La mayoría posee mecanismos exitosos de diseminación, variabilidad genética y amplia gama de hospedantes (Quispe, 2017).

#### 1.3.1 Pudrición peduncular

Estas enfermedades se manifiestan después de largos periodos de almacenaje, siendo las pudriciones pedunculares las que muestran mayor prevalencia, alcanzando importantes niveles en algunos huertos que llegan hasta 40 % de los frutos afectados. Las pudriciones pedunculares están asociadas, primordialmente, a hongos fitopatógenos pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae* que afectan la zona peduncular del fruto, por lo cual recibe su nombre esta enfermedad. Se caracteriza por una pudrición que se inicia en la zona de unión del pedúnculo con el fruto, la que va avanzando por los haces vasculares a medida que la fruta madura. (Figura.1) (Soto *et al.*, 2020).



Figura 1. Síntomas internos de pudrición peduncular en paltas variedad Hass. Imagen recuperada de

<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67190/NR42381.pdf?sequence=28>

### **1.3.2 Síndrome de muerte súbita**

La soja (*Glycine max* (L.) puede ser susceptible a una enfermedad conocida como síndrome de muerte súbita, la cual es una de las enfermedades fúngicas más importantes de la soja en los Estados Unidos (Hartman *et al.*, 2015) y es causada por el patógeno que infecta las raíces *Fusarium virguliforme* (Aoki *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2015). En el campo, el patógeno infecta las raíces, pero no se sabe que invada las partes aéreas de las plantas de soja. Además de la pudrición de la raíz, *F. virguliforme* puede provocar distintos síntomas foliares que aparecen “repentinamente” después del inicio de la floración. Estos síntomas foliares incluyen clorosis intervenal y necrosis, enrollamiento marginal de los folíolos y defoliación prematura, y se atribuyen a las Fitotoxinas fúngicas que se translocan a las hojas desde las raíces colonizadas (Hartman *et al.*, 2015).

### **1.3.3 Cáncer de ciprés**

El Cáncer de ciprés es una enfermedad presente en América y Europa, causa graves daños en especies forestales y ornamentales de *Cupressus* y otros géneros de *Cupresáceas*. La mayoría han demostrado escasa resistencia a la enfermedad.

El hongo penetra por heridas debidas a insectos o agentes climáticos. También puede penetrar a través de la epidermis de plantas jóvenes (Wagener, 1928; Grasso, 1951). Las ramas infectadas presentan inicialmente alrededor del punto de infección una mancha indefinida castaño-rojiza y posteriormente oscurecimientos y necrosis corticales con producción de resina (Magnani, 1956; Intini y Panconesi, 1976).

### **1.3.4 Cáncer de las yemas y nudos de las drupáceas**

El género *Fusicoccum.*, pertenece al orden *Sphaeropsidales*, estando incluido en la familia *Sphaeropsidáceae* (picnidios globosos). Características del género: picnidio de estroma voluminoso, primero subepidérmico, luego saliente, de una o más cavidades prolíferas irregulares, tapizadas de elementos conidiógenos simples. Conidios unicelulares, hialinos, fusiformes, grandes. La especie *F*

*amygdali*, presente en Europa y América, afecta especialmente al peral y al almendro, originando manchas marrones sobre los nuevos brotes en correspondencia con las yemas. Da lugar a un rápido decaimiento. Sobre las ramas viejas ocasiona a veces cánceres corticales, en cuya correspondencia el cilindro leñoso presenta iguales oscurecimientos. Las manchas necrotizadas de las ramas presentan prominencias puntiformes, consistentes en picnidios pluriloculares de largo cuello que atraviesa la epidermis del huésped. Los conidios son irregulares, hialinos. El control químico es eficaz si es oportuno y continuado, especialmente con ditiocarbamatos y en segundo lugar con productos cúpricos y azufrados. En la actualidad se ensayan compuestos como el DDB (1-2,dibromo,2,4,dicianobutano). El hongo produce metabolitos fitotóxicos implicados en el mecanismo patogénico, uno es la «fusicoquina a» de gran actividad toxicológica y fitopatológica, incluso en soluciones de 0,1 y 0,2 ppm origina necrosis y marchitez en las plantas de ensayo. Purificado se presenta como polvo blanco soluble en algunos solventes orgánicos (alcoholes, éter etílico, cloroformo, benzol). Se trata de un glucósido de fórmula empírica: C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>OS; Pm=722. La toxina produce sobre las ramas de almendro, síntomas foliares similares a los que desarrollan las infecciones del hongo en igual especie (Graniti, 1964) (Verdú, 1986).

#### **1.4 Conocimiento actual de fitotoxinas**

Las micotoxinas son metabolitos comúnmente producidos por hongos filamentosos, que afectan negativamente el crecimiento de las plantas. Pueden causar numerosos síntomas en las plantas, como manchas foliares, marchitez, clorosis y necrosis (Akpaninyang & Opara, 2017; Amusa, 2006; Evidente *et al.*, 2019). Con base en la actividad fitotóxica de los hongos, las micotoxinas pueden clasificarse como toxinas selectivas del huésped y toxinas no selectivas del huésped. En el primero, las toxinas causan patogenicidad sólo en aquellas plantas que son huéspedes habituales del hongo. En estos últimos, las toxinas no siempre son necesarias para la patogenicidad y no son específicas para sus huéspedes (Moebius & Hertweck, 2009; Varejao *et al.*, 2013). Algunos ejemplos de fitotoxinas fúngicas son el ácido fusárico, la solanapirona, la fumonisina, el

ácido b-nitropropiónico, el ácido tenuazónico y la cercosporina (Frisvad *et al.*, 2006). En la siguiente tabla se muestra una lista de fitotoxinas microbianas comunes y su origen.

Tabla 1. Origen y familia de algunas fitotoxinas comunes

<b>Nombre de fitotoxinas/categoría</b>	<b>Origen</b>	<b>Familia de fitotoxinas</b>
<b>Proteína del cuerpo fructífero</b>	<i>Lentino edodes</i>	Proteína inactivadora de ribosoma
<b>Flammin, flammulina, velin, velutin</b>	<i>Flammulina velutipes</i>	Proteína inactivadora de ribosoma
<b>Liofilina</b>	<i>Lyophyllum shimeji</i>	Proteína inactivadora de ribosoma
<b>Volvarin</b>	<i>Volvariella volvacea</i>	Proteína inactivadora de ribosoma
<b>Aflatoxina</b>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	-
<b>Ocratoxina A</b>	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>A. Ocraceus</i> , <i>A. Carbonarius</i> , <i>A. Niger</i>	-
<b>Alternariolida, tentoxina</b>	<i>Alternaria alternata</i>	Peptido
<b>Rincosporósido</b>	<i>Rincosporósido secalis</i>	Alcaloides
<b>fomentrioloxina</b>	<i>Phomopsis spp.</i>	Monoterpenos
<b>Foeniculoxina</b>	<i>Phomopsis phoeniculi</i>	Monoterpenos
<b>sericardinas A, B, C</b>	<i>Seridio spp.</i>	Sesquiterpenos
<b>Fusicoccin</b>	<i>Fusicoccum amygdali</i>	Diterpenos
<b>esferopsidinas</b>	<i>Esferopsis sapinea</i>	Diterpenos
<b>Helmintosporósido</b>	<i>Helminthosporium sacchari</i>	Tritepenoide
<b>Toxina de helmintosporósido maydis</b>	<i>H. maydis</i>	Tritepenoide

Tabla modificada recuperada de Chen *et al.*, 2020

## **1.5 Utilidad de bioensayos en la detección de la fitotoxicidad**

La ecotoxicología es una rama de la ciencia que integra conceptos de ecología y toxicología (Zakrzewski,1991; Newman & Jagoe,1996). Estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos vertidos en diferentes compartimentos ambientales sobre los organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos.

Entre los objetivos de la ecotoxicología aplicada está el desarrollo de protocolos de ensayos biológicos estandarizados (bioensayos de toxicidad) que puedan ser utilizados como herramientas de diagnóstico y predicción temprana que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladores para la toma de decisiones, además de su aplicación en la evaluación de riesgo ecológico de los efectos adversos de las actividades antrópicas en ambientes naturales (Suter, 1993; Environment Canada 1999a, Castillo, 2004).

Los ensayos biológicos permiten determinar la fitotoxicidad de agentes físicos y químicos sobre los organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas. La fitotoxicidad o capacidad de una sustancia de generar un efecto nocivo en un organismo vivo, estará condicionada a sus características fisicoquímicas, así como a la concentración, frecuencia y tiempo de exposición (exposición aguda, subcrónica, crónica). Los efectos adversos en un individuo pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, generando desde la muerte del individuo (efecto letal) o produciendo una gran diversidad de respuestas a distintos niveles de la organización biológica (efectos subletales), que van desde alteraciones bioquímicas y celulares, incluyendo genotoxicidad y disrupciones endocrinas, alteraciones a nivel morfológico y fisiológico, efectos en el crecimiento y desarrollo, además de alteraciones en parámetros poblacionales. En cada bioensayo de fitotoxicidad se cuantifica uno o varios de estos efectos nocivos, denominándose a cada uno de estos parámetros seleccionados como punto final de evaluación de la fitotoxicidad (Dutka ,1989; Boutin et al., 1993; Environment Canada, 1999a) (Sobrero, 2010).

### **1.5.1 Tipos de bioensayos comúnmente empleados para evaluar la fitotoxicidad**

La evaluación de la bioactividad (fitotóxica, antifúngica, antibacteriana, etc.) de compuestos utilizando sistemas biológicos puede proporcionar datos tanto cualitativos como cuantitativos. Se deben considerar algunos factores para la elección del bioensayo. Debe ser relativamente rápido, simple, económico, reproducible y al menos semicuantitativo (Hoagland y Williams, 2003).

Generalmente, las concentraciones de fitotoxinas fúngicas en los medios de cultivo son muy bajas. Por lo tanto, el bioensayo debe ser lo suficientemente sensible para detectar la actividad de las fitotoxinas, incluso cuando se diluyen en los filtrados de cultivo. Se recomienda realizar una serie de diferentes pruebas biológicas, utilizando hojas, semillas y plántulas de diferentes especies de plantas, y seleccionar las más sensibles para guiar los procedimientos de fraccionamiento. Cuando se buscan fitotoxinas producidas por patógenos de plantas, los bioensayos generalmente se realizan utilizando la planta hospedera fúngica, siendo los más utilizados el ensayo de punción de hoja, el ensayo de punción de hoja desprendida y el ensayo de punción de disco de hoja (Vurro *et al.*, 1998. Pedras y Ahiahonu, 2004. Yuzikhin *et al.*, 2007. Cimmino *et al.*, 2008; Cruz-Cruz *et al.*, 2009).

Se han utilizado una variedad de bioensayos que usan hojas o partes de hojas, semillas, plántulas o plantas maduras para guiar el aislamiento de metabolitos fitotóxicos fúngicos, y algunos de estos se presentan brevemente a continuación.

**Ensayos realizados en hojas:** Las hojas o partes de hojas son ampliamente utilizadas en el aislamiento guiado por bioensayos y son particularmente útiles cuando la enfermedad causada por el hongo en estudio involucra síntomas foliares. En un ensayo de absorción de hojas, las hojas se cortan en la base de su pecíolo y se dejan absorber un pequeño volumen de las soluciones de ensayo. En el ensayo de inyección en hojas, se inyectan alícuotas de las soluciones de prueba en los tejidos de las hojas y las plantas se mantienen en un invernadero. En todas estas pruebas, las hojas o plantas se mantienen bajo condiciones controladas y se revisan diariamente para detectar la aparición de síntomas. Los resultados obtenidos son solo cualitativos, basados en la inspección visual de los síntomas causados (por ejemplo, marchitamiento, oscurecimiento, amarillamiento y necrosis). Por lo tanto, es más probable que estas pruebas

detecten la actividad fitotóxica de las soluciones de prueba, pero no brindan resultados cuantitativos adecuados para monitorear el proceso de aislamiento (Evidente *et al.*, 2008a).

**Ensayo de germinación de semillas y crecimiento de raíces:** En los estudios de germinación y crecimiento de raíces, las semillas de plantas específicas se colocan en placas Petri sobre papel de germinación, papel de filtro o agar, y se tratan con soluciones de prueba. Las cajas Petri se sellan y se mantienen en una cámara de germinación con temperatura e iluminación controladas (Macías *et al.*, 2008). Las semillas pueden ser previamente tratadas con hipoclorito de sodio acuoso y lavadas con agua destilada para esterilizarlas superficialmente (Cruz-Cruz *et al.*, 2009). Para evaluar la inhibición del crecimiento de raíces, las semillas pregerminadas se transfieren a tubos de ensayo que contienen una solución de ensayo o a cajas Petri que contienen papel filtro humedecido con la solución de prueba (Evidente *et al.*, 2003). La supresión de la germinación se calcula como el porcentaje de semillas germinadas, usando semillas no tratadas como control. Para evaluar la inhibición del crecimiento de raíces, se mide la longitud de las radículas después de la exposición al compuesto de prueba durante varios tiempos (Abdelgaleil *et al.*, 2009).

### **1.5.2 Bioensayos de fitotoxicidad en semillas de monocotiledóneas**

Rara vez se han identificado los mecanismos de acción de las fitotoxinas fúngicas; muchos casos han demostrado que estos mecanismos de acción no se superponen a los de los herbicidas. Sin embargo, se han desarrollado y profundizado esquemas para descubrir los modos de acción de las fitotoxinas, algunos de los cuales han llevado a descubrimientos prometedores. Si bien, se ha logrado descubrir nuevos modos de acción, esta investigación presenta ventajas y limitaciones, a saber, la rentabilidad de tales estudios. Partiendo de esta idea, una observación de necrosis en las hojas de plantas de hiedra inglesa (*Hedera helix*) en el campus de la Universidad de Mississippi condujo a una investigación sobre el aislamiento e identificación del hongo que causa daños a las plantas. Se aisló un hongo de hojas de *Hedera helix* (hiedra inglesa) que experimentaban necrosis y se identificó como *Diaporthe eres* mediante técnicas moleculares. El hongo se cultivó en medio de caldo papa dextrosa y el medio de

cultivo se extrajo con acetato de etilo. El fraccionamiento guiado por bioensayo del extracto de acetato de etilo del filtrado de cultivo de este hongo condujo al aislamiento de dos compuestos fitotóxicos que son activos contra la germinación de semillas de la monocotiledónea *Agrostis stolonifera* a 1 mg mL<sup>-1</sup>. Las estructuras de estos compuestos activos se determinaron por métodos espectroscópicos identificándose al 8-hidroxi-3,7-dimetilisocroman-1-ona y 2-(4-hidroxifenil)-etanol. Este es el primer hallazgo presentado sobre los efectos fitotóxicos de la as 8-hidroxi-3.7-dimetilisocroman-1-ona.

Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de gel de sílice del extracto de acetato de etilo del medio de cultivo fúngico se evaluaron mediante bioensayo de germinación de semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Agrostis stolonifera* (pasto curvado) para determinar la actividad fitotóxica de cada una de las fracciones. Se colocó un papel de filtro (Whatman N.º 1, diámetro 1.5 cm) 5 mg de semillas de *L. sativa* o 10 mg de semillas de *A. stolonifera* en cada pocillo de una placa multipocillo de 24 pocillos. Las fracciones de prueba se disolvieron en acetona y se mezclaron con agua desionizada esterilizada, de manera que la concentración final de acetona fue del 10%. Solo se añadieron acetona y agua desionizada esterilizada a cada placa de control. La actividad fitotóxica se evaluó visualmente, comparando la cantidad de germinación de las semillas en cada pozo con la de los controles sin tratar después de siete días. La estimación cualitativa de la actividad fitotóxica se evaluó utilizando una escala de calificación de 0 a 5, donde 0 = sin efecto o 100 % de germinación y 5 = sin crecimiento o sin germinación de las semillas (Briscoe, 2014).

### **1.6 Medios de cultivo para diferentes tipos de hongos**

Los medios que contienen una fuente alta de carbohidratos y una fuente de nitrógeno son necesarios para el crecimiento de hongos en un rango de pH de 5 a 6 y un rango de temperatura de 15 a 37 °C. Hay dos tipos generales de medios de cultivo de hongos: naturales y sintéticos. Los medios naturales se componen de sustratos naturales, como tallos herbáceos o leñosos, semillas, hojas, harina de maíz, germen de trigo y avena, etc. Los medios naturales suelen ser fáciles de preparar, pero tienen la desventaja de que se desconoce su composición. Algunos ejemplos incluyen agar de harina de maíz, agar de dextrosa de papa, agar de jugo V-8 y agar de estiércol. Los medios sintéticos, por otro lado,

contienen ingredientes de composición conocida. Estos tipos de medios se pueden duplicar con precisión cada vez que se fabrican y contienen cantidades definidas de carbohidratos, nitrógeno y fuentes de vitaminas. El medio Czapek-Dox, la glucosa-asparagina y el medio mínimo *Neurosporacrassa* entran en esta categoría. Los medios de uso general, que se utilizan comúnmente para el cultivo de hongos, son el agar dextrosa Sabouraud (SDA), que es nutricionalmente pobre con un pH ácido (Tsudome *et al.*, 2009. Rath, 2001). Los medios selectivos, como el agar inhibidor de moho y los medios de prueba de dermatofitos, son importantes en el aislamiento de patógenos fúngicos como *Cryptococcus neoformans* y dermatofitos (Collins *et al.*, 2005). El agar suplementado con arroz, caseína y otros nutrientes como el agar de harina de maíz con Tween 80 se ha utilizado para diferenciar especies de *Candida* y especies de *Trichophyton*. Agar patata dextrosa utilizado para mejorar el desarrollo de conidios y pigmentos de *Trichophyton rubrum*. La mayoría de los medios utilizados en laboratorio no son rentables a gran escala, por lo que los industriales han comenzado a utilizar varias fuentes de carbono comunes y baratas (Basu *et al.*, 2015).

## 2 JUSTIFICACIÓN

La gran mayoría de hongos productores de micotoxinas no son necesariamente fitopatógenos vegetales, sino únicamente saprofitos que han desarrollado mecanismos para acceder a fuentes de nutrición heterotrófica, mediante la muerte de tejidos vegetales. Así, hongos filamentosos de suelos y rizosferas pueden interactuar con las plantas en varias formas, algunos de ellos producen fitotoxinas que tienen actividad en tejidos como raíces o tallos, o bien actividad sistémica que provoca la muerte de plantas establecidas, germinados o plántulas.

La variedad de hongos filamentosos y macromicetos de suelos y rizosfera que existen en nuestro país deriva de su extensa diversidad agroecológica y botánica, sin embargo, sus capacidades naturales para la producción de fitotoxinas fungales se han explorado escasamente, así como su potencial aplicación biotecnológica. Por lo que es importante contar con metodologías que permitan y faciliten la detección, caracterización y funcionalidad *in situ* e *in vitro* de productos naturales con actividad fitotóxica para el control de arvenses o malezas de impacto económico como maíz, cítricos, caña de azúcar, trigo, avena y cebada, lo que contribuirá a la producción sustentable de bienes agrícolas o agroalimentarios, contribuyendo a la disminución del impacto que puede generar el empleo de herbicidas sintéticos comerciales, por su baja biodegradabilidad, alta residualidad en granos, hortalizas y frutos; persistencia, potencial tóxico de sus productos de degradación y resistencia genética, además de los daños importantes en la salud animal y humana.

Siendo tan diversa y compleja la microbiota de suelos y rizosferas, es requerido explorar el potencial fitotóxico de sus productos naturales, en el presente estudio se plantea el desarrollo de un sistema de detección y selección de hongos filamentosos productores de fitotoxinas, que facilite la identificación de productos biosintéticos con potencial herbicida.

### **3 OBJETIVOS**

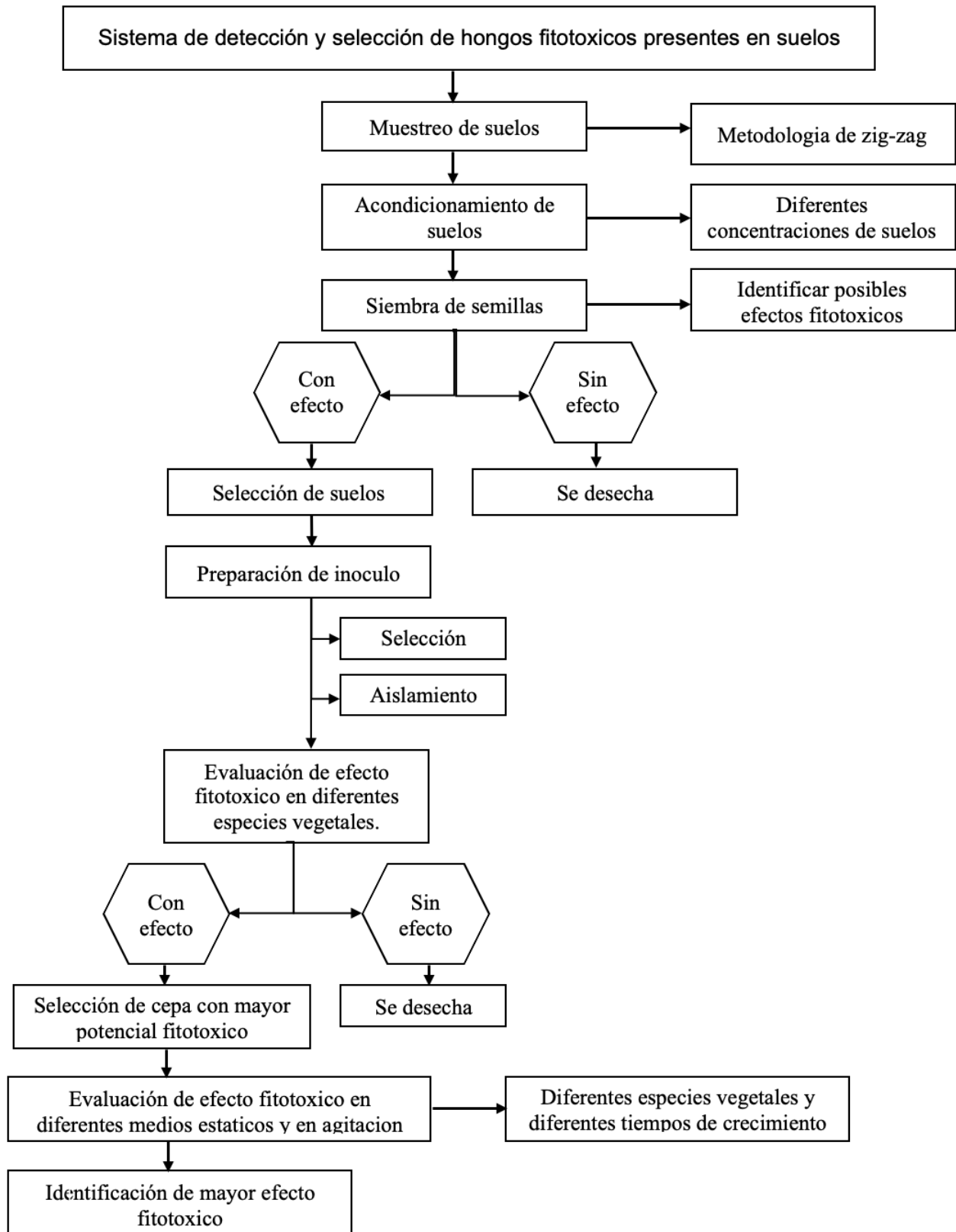
#### **3.1 Objetivo general**

- Desarrollar un sistema *in vitro* que permita la detección, aislamiento y selección de hongos filamentosos productores de fitotoxinas.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- Generar un sistema de detección *in vitro* de suelos promotores de fitotoxicidad.
- Aislar cepas de hongos a partir de suelos promotores de fitotoxicidad.
- Seleccionar, a partir de suelos promotores de fitotoxicidad, cultivos capaces de producir fitotoxinas difusibles.

#### 4 DIAGRAMA DE TRABAJO



## 5 MATERIAL Y METODOS

### 5.1 Material

Material de vidrio, frascos de plástico, reactivos, suelos, sustrato, antibióticos, jeringas, pirinolas con filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ , material de polipropileno, micropipetas.

### 5.2 Material biológico

Semillas de diferentes especies, cepas que se aislarán.

### 5.3 Equipos

**Tabla 2. Características de los equipos**

<b>EQUIPO</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>
Centrífuga	Eppendorf	5810R
Agitador orbital	Sev prendo	AGO 60-90
Balanza analítica	Velab balances	VE-500
Autoclave vertical	Aesa	CU250
Campana de flujo laminar horizontal	Prendo	CFL102NW
Micropipetas	Eppendorf	BP1000
Refrigerador	Mabe	GLM25WGT

## 5.4 Métodos

Tabla 3. Referencia de los métodos

DETERMINACIÓN	MÉTODO	REFERENCIA
Colecta de suelos	Muestreo selectivo de suelos	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2006
Detección de hongos fitotóxicos	Trampeo basado en detección de hongos fitopatógenos	Verdú, 1986
Purificación de cepas de hongos por subcultivo	Medios selectivos	Basu <i>et al.</i> , 2015. Papvizas y Davey, 1959
Evaluación de cultivo líquido estático	Medios estáticos	Chang <i>et al.</i> , 2016
Desarrollo de cultivo aerobio en matraz agitado y estático	Sistemas de cultivo en matraz agitado	Chang <i>et al.</i> , 2016
Detección de fitotóxicos difusibles	Sistema de inhibición de germinación de semillas <i>in vitro</i>	Verdú, 1986

## 6 METODOLOGÍA

### 6.1 Muestreo de suelos y técnica utilizada

El muestreo de suelo requerirá: bolsas de polipapel nuevas, un balde, una pala recta y guantes. Antes de tomar la muestra se debe realizar lo siguiente (Gutiérrez *et al.*, 2006):

- 1.- Recorrer el terreno en forma de zigzag.
- 2.- Cada 15-20 pasos tomar una submuestra de 20-30 cm de profundidad, limpiando la superficie del terreno y depositándola en el balde, como se observa en la figura 1 inciso a y b.

3.-Después de tener las submuestras (15-20 por ha), se mezclan homogéneamente y se toma 1 Kg. aproximadamente y se coloca en la bolsa de plástico, como se observa en la figura 2 inciso c y d.

Al tener la muestra de suelo deseado, se debe pesar la cantidad que se obtiene y medir la humedad.

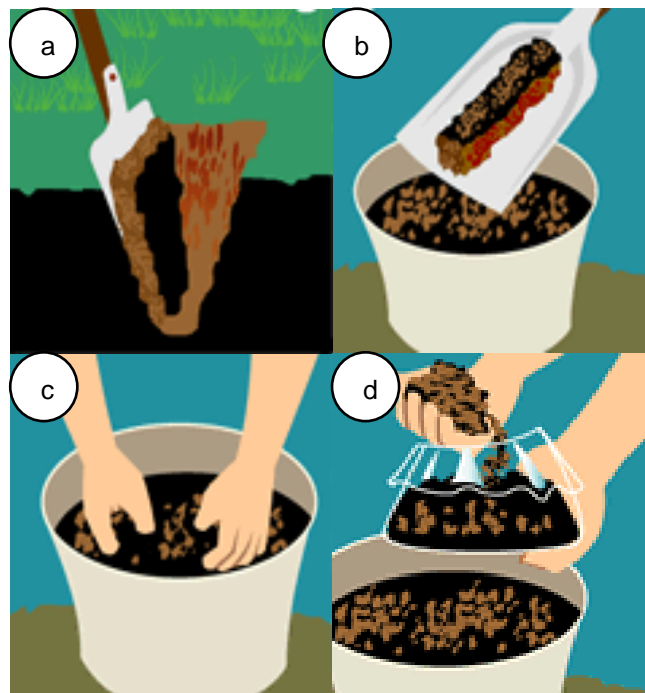


Figura 2.-Técnica de muestreo de suelos. Imágenes recuperadas de

[http://www.laai.com.uy/htm\\_empresa/muestra\\_de\\_suelo.htm](http://www.laai.com.uy/htm_empresa/muestra_de_suelo.htm)

### 6.1.1 Características de suelo

Es importante conocer las diferentes características de los suelos por ello se tomará en cuenta de donde son originarios, su humedad, porosidad, textura, color, etc.

### 6.1.2 Acondicionamiento de suelos

Se realizarán mezclas que contengan diferentes proporciones de material inerte (peat moss) y muestra de suelo que se obtendrá a partir de cultivos de interés, con el objetivo de que los microorganismos presentes del suelo se puedan desarrollar de manera óptima.

Las concentraciones de estas mezclas serán las siguientes:

- 75 % suelo con 25 % material inerte
- 50 % suelo con 50 % material inerte
- 25 % suelo con 75 % material inerte

La mezcla se colocará en botes sanitizados de 250 mL, y se hidratará hasta obtener una mezcla de forma que no se exceda de agua ni le haga falta, asemejándolo al lodo.

Cada frasco se tapaná sin cerrar completamente para evitar desecación y un ambiente anóxico y se colocarán a temperatura ambiente durante 2 días para la adaptación de los microorganismos.

## **6.2 Siembra de material biológico**

Después de 2 días, se colocarán 20 semillas de 6 diferentes especies (pasto, jitomate, chile, cebolla, brócoli, trigo) en frascos diferentes para cada concentración, así como también un control por cada semilla solo con material inerte. Nuevamente se colocará la tapa sin cerrar y se dejará a la misma temperatura.

El comportamiento de la germinación de las semillas, así como también la hidratación o deshidratación en cada frasco se observará diariamente. Se tomará nota de la germinación día con día para verificar la presencia de microorganismos.

## **6.3 Detección de hongos fitotóxicos**

Al término de 2 semanas aproximadamente y de acuerdo con las observaciones del comportamiento de la germinación en cada frasco se seleccionarán aquellos que presenten baja germinación, contaminación, pudrición o cualquier otro síntoma que nos indique patogenicidad. El material de cada frasco seleccionado se mezclará de tal manera que obtengamos una mezcla compuesta de la cual se tomará una submuestra, así como también tomaremos una muestra de suelo nativo para el aislamiento de microorganismos.

### **6.3.2 Preparación del inóculo**

Una vez obtenidas las dos muestras (Mezcla compuesta y suelo nativo) se tomarán 10 g, de cada una y se colocara en dos matraces respectivamente, cada matraz de 500 mL con 90 mL de agua destilada y estéril. Después de agregar las muestras, se agitarán los matraces en agitador orbital durante una hora a 120 rpm.

Pasado el tiempo se llevará a campanas para tomar 1 mL de cada suspensión para realizar diluciones de la -1 a la -8. Se plaquearán 200 µl de las diluciones -2, -4, -6, -8 por duplicado en diferentes medios: YCED, M4, SABOURAUD, PDA, SNYDER, y se incubarán a diferentes temperaturas de acuerdo con el origen de los suelos.

### **6.3.3 Purificación de cepas de hongos**

De acuerdo con la morfología de los hongos que se observen, se resembrarán para lo cual se tomará la colonia de interés, evitando que se toque cualquier otro microorganismo presente en la placa para evitar contaminación, de esta manera se aislarán por duplicado en medio nutritivo para hongos. En caso de que no se obtenga una cepa pura se tiene que repetir el proceso.

### **6.4 Evaluación de cultivo líquido estático**

Después de la purificación de hongos, se prepararán medios líquidos para inocular con cada hongo y más adelante evaluar su actividad. Los medios serán: YCED, M4, SABOURAUD. Cada cepa se inoculará por duplicado en cada medio y se colocará a diferentes temperaturas según la cepa. Se dejará pasar 6 días aproximadamente de tal manera que se note la diferenciación de colonias, así como también producción de toxinas y de más. Una vez diferenciados los hongos, se decantará y centrifugará a 5000 rpm durante 10 min y se microfiltrará. El micro filtrado se colocará en pozos realizados en placas con agar YCED y se sembraran semillas de las especies más afectadas y menos afectadas (de acuerdo con la observación de los tiempos en las que germinaron) en cada placa, posteriormente, se incubarán a temperatura ambiente registrando su germinación diariamente y/o el crecimiento de cada plántula. Después de observar y evaluar el efecto fitotóxico de los hongos en

cada placa, se seleccionarán las cepas que presenten mayor y mejor efecto (Varejao *et al.*, 2013).

### **6.5 Desarrollo de cultivo aerobio en matraz agitado y estático**

Las cepas que serán seleccionadas se resembrarán para recuperación de esporas para lo cual el hongo se recuperará en 10 mL de agua destilada y estéril para cada placa. Las muestras recolectadas se microfiltrarán con filtros de 0.2  $\mu\text{m}$ , los filtrados obtenidos se someterán a evaluación de su capacidad fitoquímica, para lo cual 150  $\mu\text{l}$  se colocarán en cada pocito por duplicado en placas con medio YCED, se procederá a colocar 24 semillas previamente tratadas y lavadas, y se incubará a temperatura ambiente (Chang *et al.*, 2016).

### **6.6 Detección de fitotóxicos difusibles**

La presencia de fitotoxinas se evaluará mediante el efecto de los metabolitos de cada cepa que se haya seleccionado, porcentaje de germinación y crecimiento del cultivo, comparando esta actividad contra el cultivo control que contendrá únicamente las semillas (sin presencia de alguna cepa) (Varejao *et al.*, 2013).

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Desarrollo y evaluación de un nuevo sistema de detección *in vitro* de suelos que promueven fitotoxicidad**

Un sistema de detección se conforma de diferentes metodologías, en este trabajo el sistema es innovador ya que involucra crecimiento mayormente de hongos desde el trampeo, minimiza la cantidad de microorganismos no deseados y evidencia efectos fitotóxicos que ayudan a la preselección de suelos con presencia de fitopatógenos para las evaluaciones posteriores. El sistema propuesto inicia con la selección de los suelos, ya que estos fueron tomados de lugares donde los cultivos llevan tiempo en monocultivo y que tienen problemas de contaminación continua, para así poder trampear la mayor cantidad de microorganismos posibles y que llevan tiempo atacando cultivos; El método de trampeo de hongos requirió inicialmente acondicionar los suelos a evaluar los cuales se mezclaron considerando su similitud agrícola en proporción 1:1 peso

a peso (tabla 4), después los suelos fueron acondicionados adicionando peatmoos que es un material inerte libre de microorganismos (tabla 5), que favoreció la reactivación de las esporas de los hongos, así como su adaptación a un ambiente más favorable para su desarrollo y crecimiento al mismo tiempo genera que una carga menor de estos interactúen y logren colonizar la rizosfera para mostrar el efecto fitotóxico de interés en las semillas que se colocaron. Lo que permito identificar y seleccionar hongos con capacidades fitotóxicas, para favorecer el crecimiento de estos microorganismos.

Una vez listas las formulaciones (figura 3), en frascos de aproximadamente 250 mL se pesaron 19 g de cada formulación, se hidrataron con 40 mL de agua destilada asemejando al lodo, cada frasco se tapó sin cerrar herméticamente y se colocó a temperatura ambiente (25-27°C) durante 2 días (Figura 4). Después de los 2 días, se colocaron 20 semillas de 6 diferentes especies en cada frasco (Figura 5 y 6), se incubaron nuevamente a temperatura ambiente (25-27°C).

Posterior al crecimiento se seleccionaron aquellos que lograron permanecer en el suelo agrícola de los cultivos.

<b>Mezcla</b>	<b>Nomenclatura</b>
Maíz-Cebada 1:1	M-C
Pino-Madroño 1:1	Pn-Md
Brócoli-Chícharo 1:1	B-Ch
Cilantro-Cebolla 1:1	C-C

Tabla 4. Descripción de las mezclas realizadas y la nomenclatura utilizada.

<b>Suelo 250 g.</b>	<b>Peatmoss 250 g.</b>	<b>Nomenclatura</b>
25% (83.33)	75% (250)	2.7
50% (166.66)	50% (166.66)	5.5
75% (250)	25% (83.33)	7.2

Tabla 5. Formulaciones de las mezclas de Peatmoss y suelo, para todas las muestras y nomenclatura utilizada.



Figura 3. Bolsas con formulaciones homogenizadas.



Figura 4. Frascos con formulaciones de suelo y peatmoss.

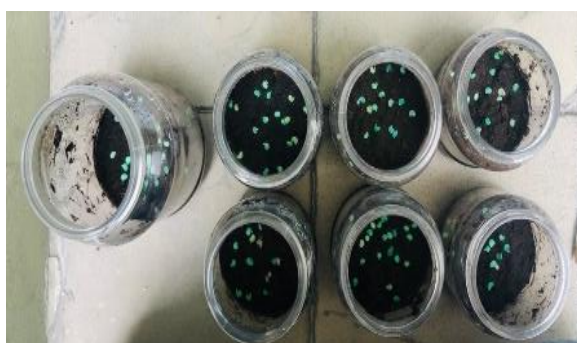


Figura 5. Frascos de formulaciones con semillas de chile.



Figura 6. Frascos de formulaciones con semillas de pasto.

El efecto fitotóxico evaluado en las diferentes semillas de especies vegetales sembradas de acuerdo con las diferentes mezclas de suelos se basó en la restricción de crecimiento, no germinación y pudrición. Las semillas más afectadas fueron brócoli, jitomate y cebolla, principalmente en la mezcla de suelos BCh, CC y MC.

El efecto se observó mayormente en suelos con proporciones 50:50 suelo:peatmoss, la semilla más susceptible a este tipo de efectos fitotóxicos fue la semilla de brócoli, por el contrario, la semilla menos susceptible fue la semilla de pasto; sin embargo, se seleccionaron suelos donde se observó efecto en la mayoría de las semillas evaluadas.

Por otra parte, en la mezcla de suelo Pn-Md no hubo ningún efecto fitotóxico en semillas ya que crecieron igual que en el control sin daño alguno.

Se presentan algunas figuras (5-9) de los frascos con mezcla de suelos en los que fueron evidentes los efectos fitotóxicos.



Figura 7. **Mezcla de suelos B-Ch.** (A) control de semilla de Chile. (B) se observó baja germinación y crecimiento de hongos represores en semilla de Chile en suelo a concentración 5.5.



Figura 8. **Mezcla de suelos B-Ch.** (A) control de semilla de Trigo. (B) se observó casi nula germinación, restricción de crecimiento, crecimiento de hongo represor en semilla de Trigo en suelo a concentración 5.5.

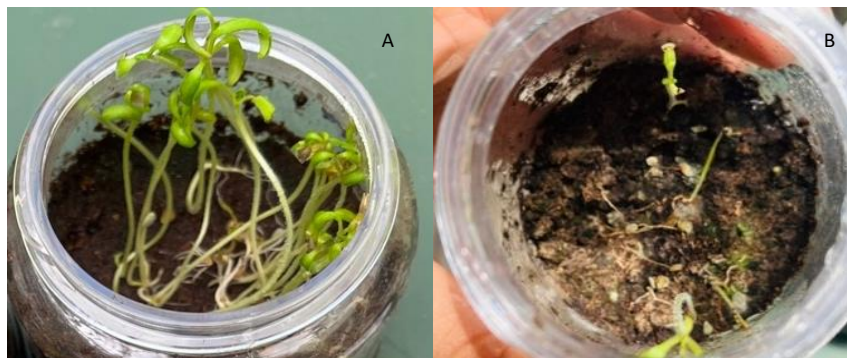


Figura 9. **Mezcla de suelos M-C.** (A) control de semilla de Jitomate. (B) se observó poca germinación, pudrición de plántula germinada y restricción de crecimiento en semilla de Jitomate en suelo a concentración 5.5.

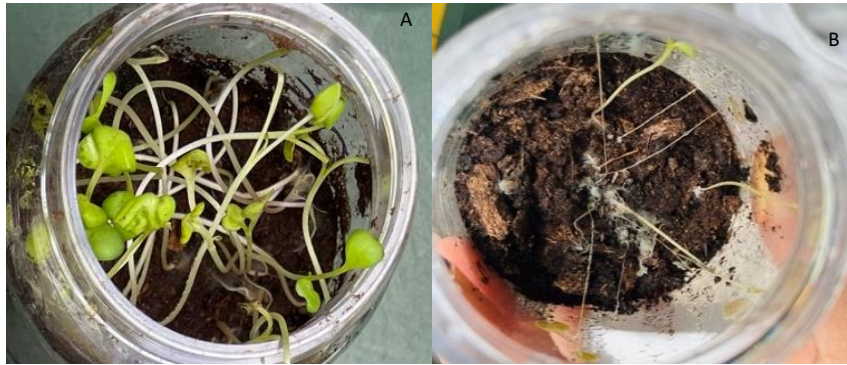


Figura 10. **Mezcla de suelos M-C.** (A) control de semilla de Brócoli. (B) se observó poca germinación, pudrición de plántula germinada y crecimiento de hongo represor en semilla de Brócoli en suelo a concentración 5.5.

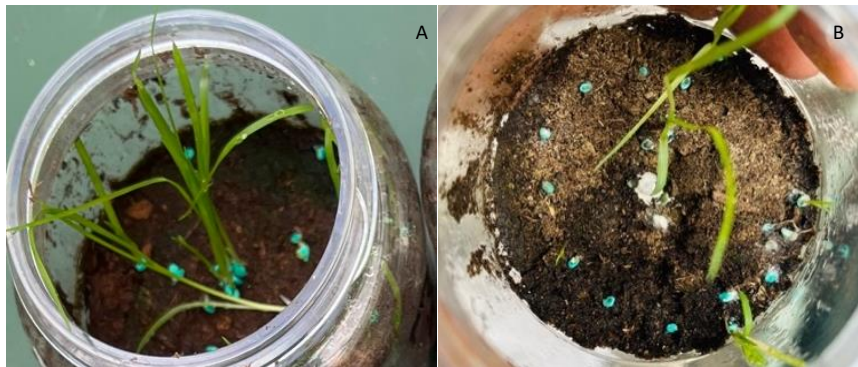


Figura 11. **Mezcla de suelos C-C.** (A) control de semilla de Pasto. (B) se observó muy poca germinación y restricción de crecimiento en semilla de Pasto en suelo a concentración 7.2.

Cada mezcla mostró distintos efectos fitotóxicos, se cree que es debido a la presencia de microorganismos diferentes ya que como se puede observar en la figura 10, las plántulas terminaron muriendo porque las raíces y la base del tallo se pudrieron a diferencia de la figura 8 que el hongo es evidente y no permitió germinar a la semilla de trigo, de todos los frascos con suelos que resultaron mostrar algún efecto, cabe mencionar que la semilla de brócoli fue la más dañada y por el contrario la semilla de pasto fue la más resistente a estos efectos, sin embargo, en todos los casos, los efectos eran notorios al compararlos con el control.

Esta metodología no ha sido reportada previamente, permite mejorar la eficacia en la detección de fitotoxicidad, así como también mejora el tiempo de detección

ya que permite identificar directamente el efecto en material vegetal (semillas) y dar un panorama previo sobre un potencial fitotóxico, para que posteriormente y con precisión se evalúe su eficacia, a diferencia de métodos comunes de evaluación como Patiño y Rodríguez, 2001, donde se procesaron 10 gr de la muestra de suelo con 90 ml de solución salina al 0.85% y se realizaron diluciones en serie hasta  $10^{-7}$ , fueron sembradas en PDA y posteriormente evaluadas. Por lo tanto, la metodología propuesta sirve como herramienta para determinar de manera rápida la presencia de microorganismos que se encuentran en suelos que promueven fitotoxicidad.

## **7.2 Aislamiento de cepas de hongos a partir de suelos promotores de fitotoxicidad**

De acuerdo con Basu *et al.*, 2015 los medios de cultivo que contienen una fuente rica en carbohidratos y nitrógeno promueven el crecimiento de hongos en un rango de pH de 5 a 6 y temperatura de 15 a 37 °C. Los medios de cultivo de selección de hongos fitopatógenos juegan un papel muy importante para la determinación de matrices de suelo con potencial fitotóxico. El crecimiento de los microorganismos fue mejor en presencia de M4, Sabouraud y YCED, que son medios para el crecimiento selectivo de hongos y/o donde estos crecen de manera acelerada (Tsudome *et al.*, 2009. Rath, 2001), por lo que se utilizaron en evaluaciones posteriores.

Se aislaron diferentes hongos (Figura 12-14) a partir de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  de los suelos seleccionados, gracias al sistema de detección *in vitro* de suelos que promueven fitotoxicidad.

A partir de los aislamientos realizados de suelos que mostraron un efecto fitotóxico se logró aislar 24 cepas de hongos diferentes nombrados del 1-24 (Figura 15-17), la mayoría son provenientes de mezcla de suelos MC y BCh.

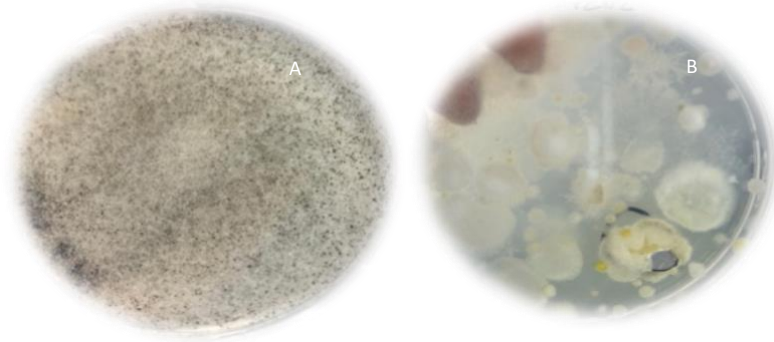


Figura 12. Suelo M-C (A) microorganismos obtenidos de dilución  $10^{-6}$  en medio M4. (B) microorganismos obtenidos dilución  $10^{-2}$  en medio M4.

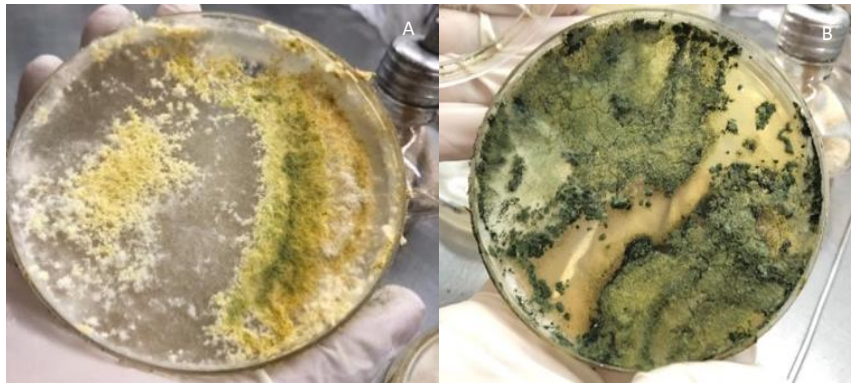


Figura 13. Suelo B-Ch (A) microorganismos obtenidos de dilución  $10^{-4}$  en medio PDA. (B) microorganismos obtenidos dilución  $10^{-2}$  en medio PDA.

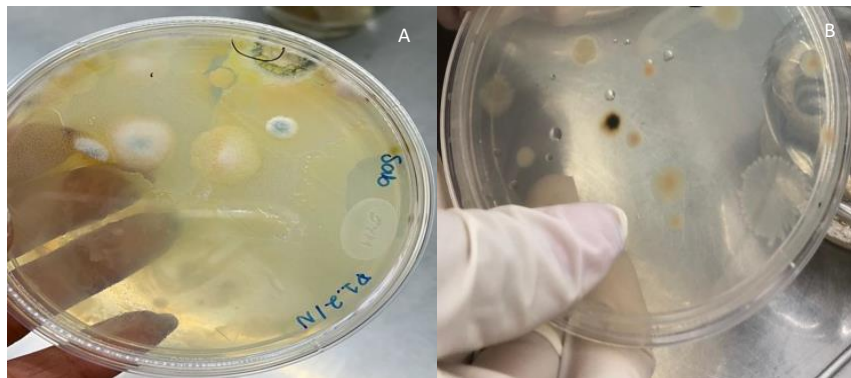


Figura 14. Suelo C-C (A) microorganismos obtenidos de dilución  $10^{-4}$  en medio Sabouraud. (B) microorganismos obtenidos dilución  $10^{-8}$  en medio Sabouraud.

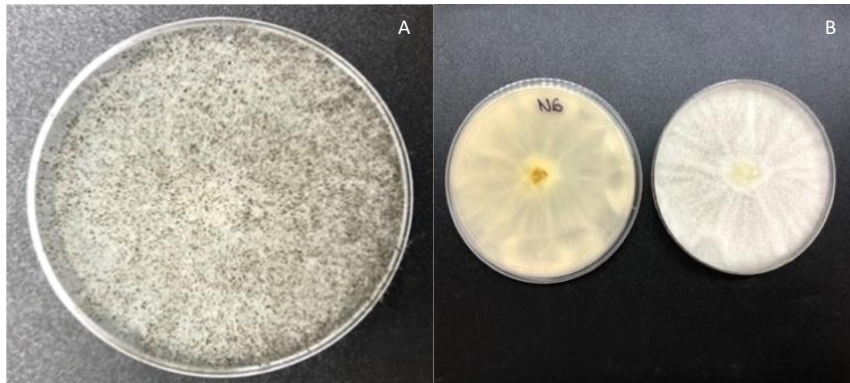


Figura 15. Suelo B-Ch (A) purificación de cepa 18 en medio PDA obtenidos de dilución  $10^{-4}$  en medio PDA. (B) purificación de cepa 20 en medio PDA obtenidos dilución  $10^{-2}$  en medio PDA.

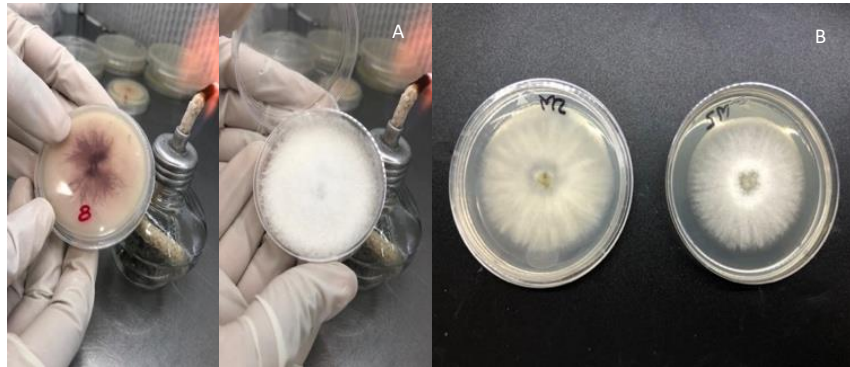


Figura 16. Suelo M-C (A) purificación de cepa 21 en medio PDA obtenidos de dilución  $10^{-6}$  en medio M4. (B) purificación de cepa 23 en medio PDA obtenidos dilución  $10^{-2}$  en medio M4.

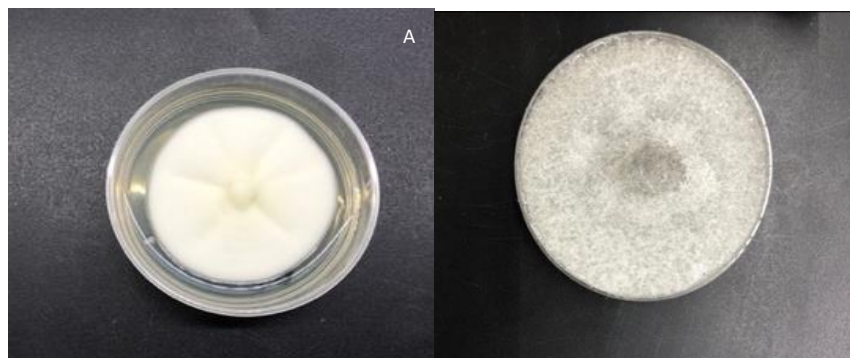


Figura 17. Suelo C-C (A) purificación de cepa 23 en medio PDA obtenidos de dilución  $10^{-4}$  en medio Sabouraud. (B) purificación de cepa 24 en medio PDA obtenidos dilución  $10^{-8}$  en medio Sabouraud.

De acuerdo con las diluciones después de plaqurear, se identificó que había más crecimiento de microorganismos en los medios que contenían muestras de la dilución  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  esto debido a la carga microbiológica que es mayor a diferencia de las otras diluciones. Además de la carga, se identificó que en medio Sabouraud crecen mejor, respecto a cantidad y tamaño, además la velocidad de crecimiento aumentó en comparación con los otros medios que si bien son específicos para el crecimiento de hongos, son menos enriquecidos, tal es el caso de M4, este medio mostró hongos totalmente separados de cualquier otro microorganismo y las colonias eran perfectamente delimitadas aunque en placas con este medio se tardaron un poco más en crecer. Todos los hongos se aislaron y se les asignó un número conforme se iban obteniendo, al realizar este aislamiento se notó que la mayoría eran provenientes de suelos de brócoli con chícharo (B-Ch) y de maíz con cebada (M-C). Las muestras de estos suelos fueron obtenidas de zonas frías, pero al colocar a los microorganismos en diferentes temperaturas las cuales fueron ambiente ( $23-25^{\circ}\text{C}$ ) y ligeramente frío ( $17-18^{\circ}\text{C}$ ), se observó que crecían de manera más rápida en temperatura ambiente lo que sugiere que este tipo de cambio estresa al organismo, lo que podría promover la producción de posibles fitotoxinas.

### **7.3 Evaluación y selección de cultivos capaces de producir fitotoxinas difusibles**

De acuerdo con Varejao *et al.*, 2013 la evaluación de la bioactividad (fitotóxica, antifúngica, antibacteriana, etc.) de compuestos utilizando sistemas biológicos puede proporcionar datos tanto cualitativos como cuantitativos. Se deben considerar algunos factores para la elección del bioensayo, debe ser relativamente rápido, simple, económico, reproducible y al menos semicuantitativo. Se recomienda realizar una serie de diferentes pruebas biológicas, utilizando hojas, semillas y plántulas de diferentes especies de plantas, y seleccionar las más sensibles para guiar los procedimientos de fraccionamiento.

La selección de los cultivos, se realizó evaluando semillas de especies diferentes, las cuales se colocaron en placas con agar YCED que es selectivo para la germinación de semillas, en cada placa se realizaron pocillos para colocar el microfiltrado obtenido de todas las cepas que anteriormente se inocularon en medios seleccionados. Las semillas se colocaron de tal forma que no tocaran el medio directamente para verificar si había efecto difusible, se taparon y se colocaron a diferentes temperaturas según de donde provenía el suelo.

Día con día se revisó la germinación de la semilla y en su caso el crecimiento de la plántula para observar si se presentaba algún efecto fitotóxico (Tabla 1, ver anexos)

Con los datos obtenidos se realizaron los siguientes gráficos (gráfico 1 y 2).

A continuación, se muestran los gráficos representativos de la evaluación de la fitotoxicidad de las diferentes cepas con las semillas de brócoli y pasto.

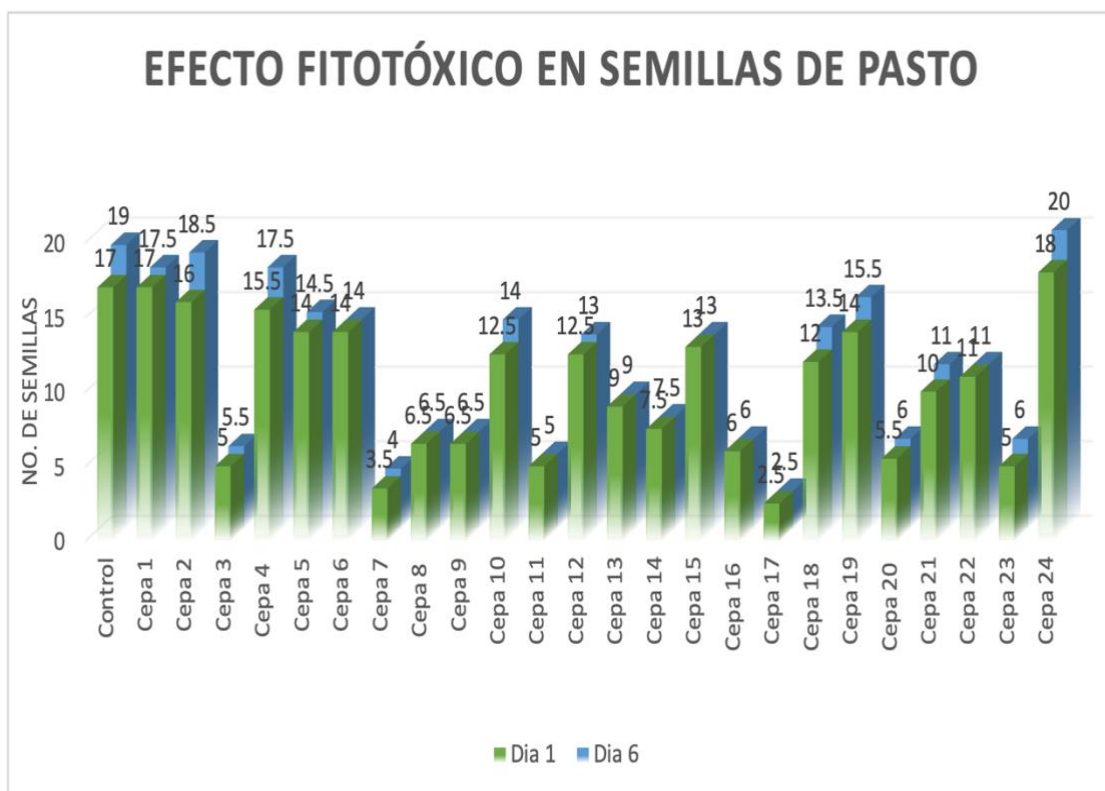


Gráfico 1. Promedio de semillas de pasto germinadas a diferentes días de observación.

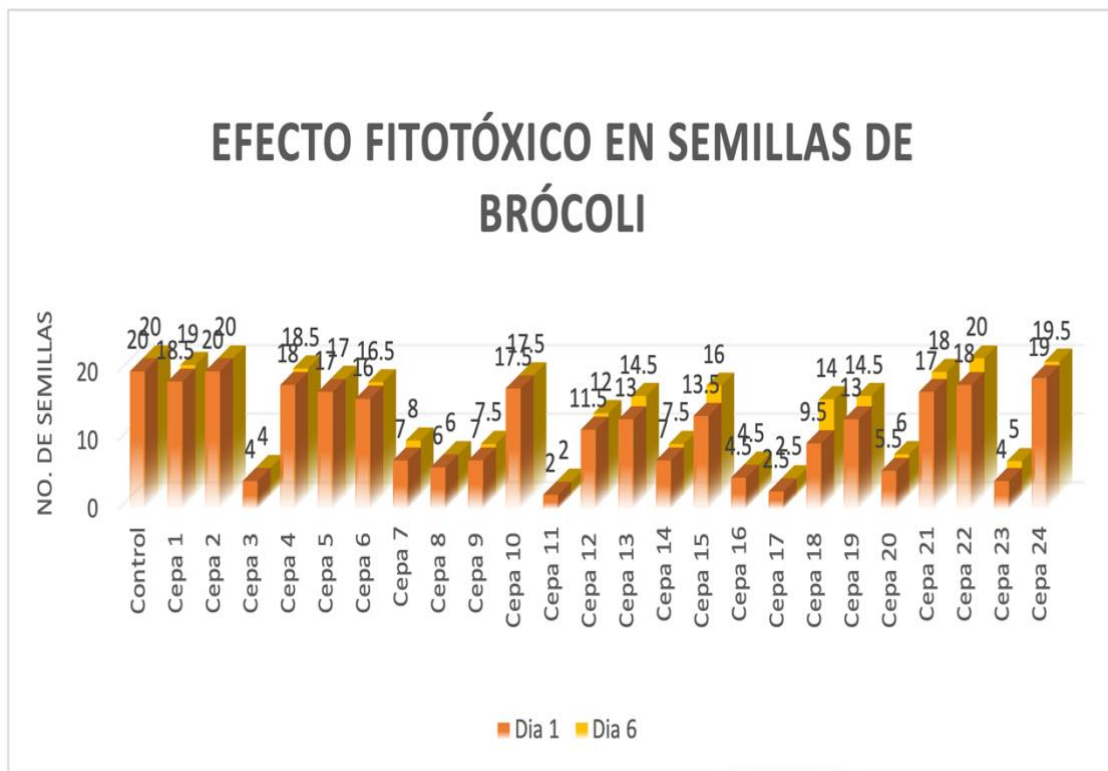


Gráfico 2. Promedio de semillas de brócoli germinadas a diferentes días de observación.

Con el fin de identificar cepas con mayor potencial fitopatógeno se realizó un escrutinio a través de la difusión del metabolito en contacto con semillas de interés, observando efectos fitotóxicos en nueve cepas.

En el gráfico 1 podemos observar que las cepas identificadas como 3, 7, 8, 9, 11, 16, 17, 20 y 23 mostraron efectos fitotóxicos de gran interés tanto en semillas de brócoli como en semillas de pasto, cabe mencionar que dos (11 y 17) de estas cepas se diferencian por tener un mayor efecto que las otras siete por lo tanto se seleccionaron para la siguiente evaluación.

La siguiente evaluación fue similar a la anterior y tomando en cuenta los antecedentes reportados por Hartman y colaboradores en 2015 respecto a la metodología, en este trabajo se realizaron algunas modificaciones a las condiciones de crecimiento. Se realizó inoculación en diferentes medios estáticos y en agitación de los cuales se tomó muestra cada 5 días durante 15 días y se repitió el procedimiento de decantar, centrifugar, microfiltrar y colocar 2 µL en pocitos realizados en placas Petri con agar YCED, después se colocaron semillas previamente lavadas y desinfectadas, se incubaron a temperatura de

23-25°C y 17-18°C para revisar día con día y verificar en que momento se presentaba un mayor efecto.

De acuerdo con las etapas de vida común de los hongos (fase de crecimiento, estacionaria y de muerte) podemos observar que el efecto es diferente dependiendo los días de incubación, sin embargo, en su mayoría se aprecia el mismo resultado a los 15 días ya que se piensa que podría estar en la fase donde produce más metabolitos que causan efectos fitotóxicos lo cual se puede observar en las siguientes figuras (Figura 18-25).

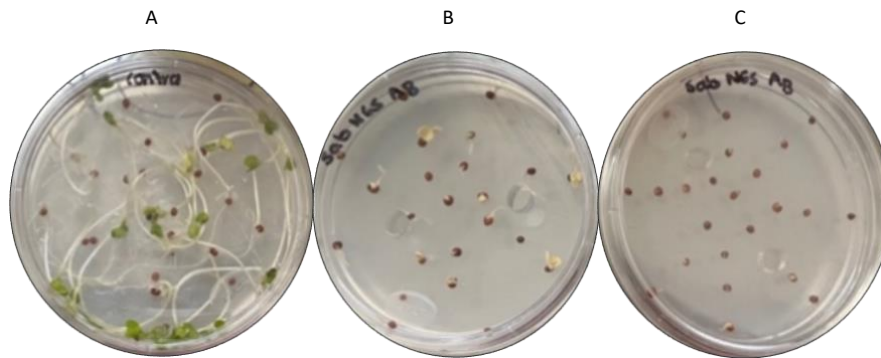


Figura 18. (A) Control de semillas de Brócoli, (B) Placa con agar YCED. Semilla de Brócoli y pocitos con microfiltrado de cepa 11 en medio sabouraud con 15 días en agitacion, (C) duplicado de la placa B.

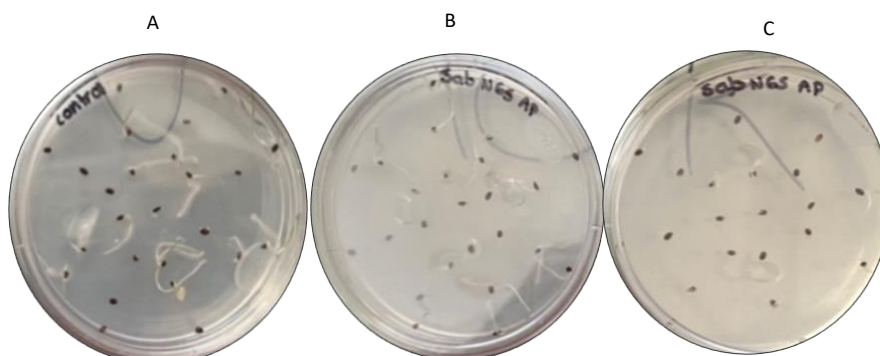


Figura 19. (A) Control de semillas de Pasto, (B) Placa con agar YCED. Semilla de Pasto y pocitos con microfiltrado de cepa 11 en medio sabouraud con 15 días en agitacion, (C) duplicado de la placa B.

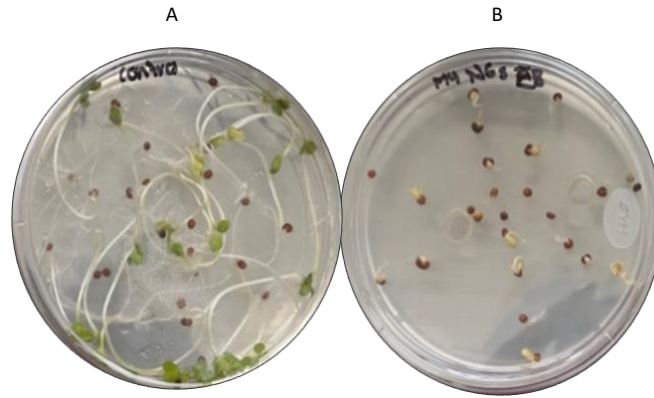


Figura 20. (A) Control de semillas de Brócoli, (B) Placa con agar YCED. Semilla de Brócoli y pocitos con microfiltrado de cepa 11 en medio M4 con 15 días en estatico.

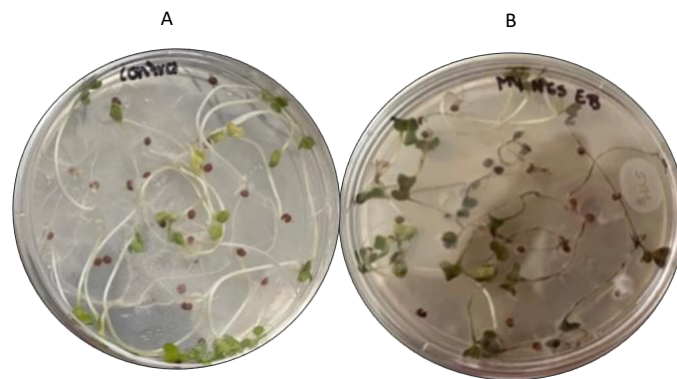


Figura 21. (A) Control de semillas de Brócoli, (B) Placa con agar YCED. Semilla de Brócoli y pocitos con microfiltrado de cepa 11 en medio M4 con 10 días en agitado.

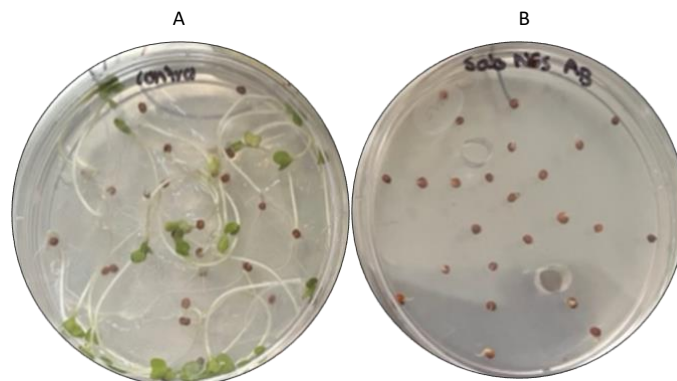


Figura 22. (A) Control de semillas de Brócoli, (B) Placa con agar YCED. Semilla de Brócoli y pocitos con microfiltrado de cepa 11 en medio Sabouraud con 10 días en agitación.

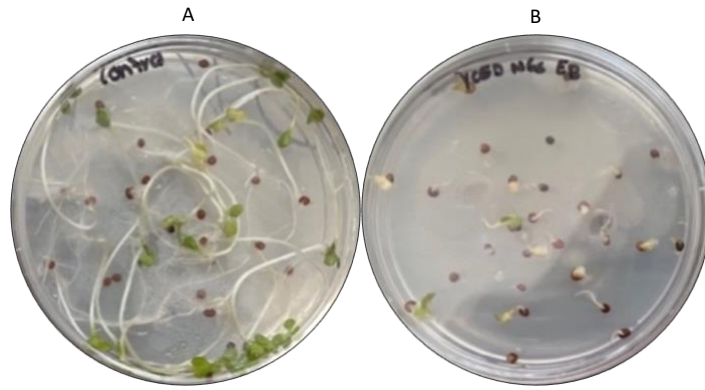


Figura 23. (A) Control de semillas de Brócoli, (B) Placa con agar YCED. Semilla de Brócoli y pocitos con microfiltrado de cepa 11 en medio YCED con 10 días en agitación.

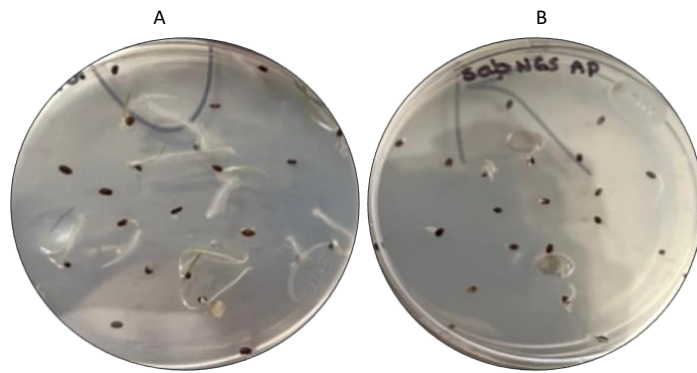


Figura 24. (A) Control de semillas de Pasto, (B) Placa con agar YCED. Semilla de Pasto y pocitos con microfiltrado de cepa 11 en medio Sabouraud con 15 días en agitación.

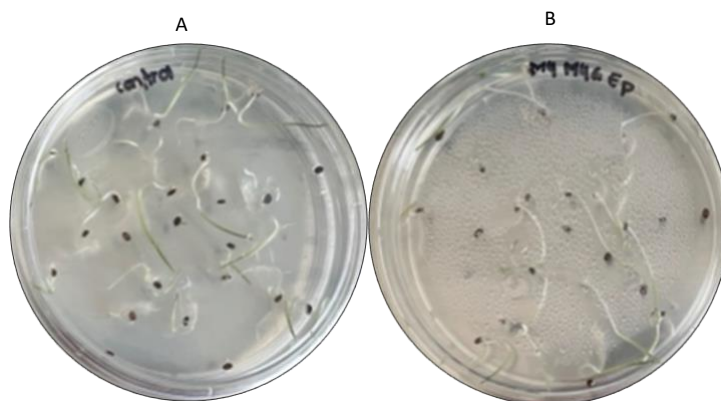


Figura 25. (A) Control de semillas de Pasto, (B) Placa con agar YCED. Semilla de Pasto y pocitos con microfiltrado de cepa 17 en medio M4 con 15 días en agitación.

Con la finalidad de conocer el efecto por difusión de el o los metabolitos segregados por las cepas ya seleccionadas, en las 2 diferentes semillas donde se observó previamente un efecto notorio. Al colocar los metabolitos con diferentes edades de segregación se identificó que la agitación y la presencia del medio Sabouraud favorecieron el crecimiento de la cepa N6s (17), a los 5 y 15 días de crecimiento, posiblemente debido a que este medio es más nutritivo que los otros medios utilizados, tal como lo menciona Bode *et al.*, [2002](#); Miao *et al.*, 2006 quienes han demostrado que las condiciones de los medios tienen efectos variables en la producción de metabolitos secundarios fúngicos; sin embargo, en medio M4 se notó principalmente un efecto fitotóxico de pudrición. Por otro lado, en medio YCED se observó mayor efecto a los 15 días en agitación mostrando una restricción de crecimiento en ambas semillas, esto de acuerdo con Xu *et al.*, 2008, menciona que menudo, la variación de las condiciones de cultivo se utiliza para optimizar los rendimientos de un compuesto específico, como el metabolito activo en un hongo.

Por último en este trabajo se observó el mayor efecto fitotóxico de la cepa M4G (No.11) se identificó a los 10 días de crecimiento en los tres diferentes medios en agitación.

## **8. CONCLUSIÓN**

La metodología descrita en este trabajo es innovadora ya que permite optimizar el proceso de selección de hongos gracias a que se promueve el crecimiento de la biota fungal, favoreciendo que se analice un mayor número de fitopatógenos en un corto periodo de evaluación, del mismo modo se potencia el aislamiento específico de hongos ya que se simula un ambiente para el crecimiento de estos microorganismos. Con el sistema de trampeo se acelera la evaluación de suelos al incluir la preselección de organismos fitotóxicos y de este modo acelerar el proceso de aislamiento. La metodología propuesta puede usarse con el objetivo de encontrar nuevas fitotoxinas naturales, con potenciales aplicaciones para los metabolitos identificados, y determinar las mejores condiciones de su aplicación, así como productos de interés para el campo agrícola.

## 9 REFERENCIAS

- Abano MM, Hoffmann P, Winter S, Green KR, Wolf GA. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *J Phytopathol* 2004; 152: 21-37.
- Abbas HK, Shier WT, Seo J-A, Lee Y-W, Musser SM. Phytotoxicity and cytotoxicity of the fumonosin C and P series of mycotoxins from *Fusarium* spp. fungi. *Toxicon* 1998; 36: 2033-2037.
- Abbas HK, Williams WP, Windham GL, Pringle HC 3, Xie W, Shier WT. Aflatoxin and fumonisin contamination of commercial corn (*Zea mays*) hybrids in Mississippi. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 5246-5254.
- Abdelgaleil, S.A.M., Abdel-Razeek, N., Soliman, S.A., 2009. Herbicidal activity of three sesquiterpene lactones on wild oat (*Avena fatua*) and their possible mode of action. *Weed Science* 57, 6e9.
- Akpaninyang, F., & Opara, E. (2017). The influence of toxins in disease symptom initiation in plants: A review. *Journal of Agriculture and Sustainability*, 10(1), 29–52.
- Amusa, N. (2006). Microbially produced phytotoxins and plant disease management. *African Journal of Biotechnology*, 5(5), 405–414.
- Aoki, I., O Donnell, K., Homma, Y., and Lattanzi, A. R. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solan* species complex- *A. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* 95:660-684.
- Basu, S., Bose, C., Ojha, N., Das, N., Das, J., Pal, M., & Khurana, S. (2015). Evolución de los medios de crecimiento bacterianos y fúngicos. *Bioinformación*, 11(4), 182-184.
- Boutin C, Freemark KE & Keddy CJ, 1993. Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: nontarget plant testing and evaluation. Technical Report Series N° 145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environmental Canada, Ottawa.
- Bode HB, Bethe B, Hofs R, Zeeck A: Grandes efectos de pequeños cambios: Posibles formas de explorar la diversidad química de la naturaleza. *ChemBioChem* 2002
- Briscoe W. E. 2014. Identification of a Phytotoxic Fungus and an Investigation into the Isolation of its Phytotoxic Constituents. University of Mississippi. Thesis.
- Bruton BD. Mechanical injury and latent infections leading to postharvest decay. *Hort Sci* 1994; 29: 747-749.
- Cano J, Guarro J, Gené J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2450-2454.
- Castillo G (ed.), 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Edición conjunta IDRC, SEMARNAT, IMTA, México. 188 pp.

- Chang, H. X., Domier, L. L., Radwan, O., Yendrek, C. R., Hudson, M. E., & Hartman, G. L. (2016). Identification of multiple phytotoxins produced by *Fusarium virguliforme* including a phytotoxic effector (FvNIS1) associated with sudden death syndrome foliar symptoms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(2), 96-108.
- Chen, H., Singh, H., Bhardwaj, N., Bhardwaj, S. K., Khatri, M., Kim, K. H., & Peng, W. (2020). An exploration on the toxicity mechanisms of phytotoxins and their potential utilities. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(3), 395-435.
- Choo TM, Martin RA, Ho KM, Shen Q, Fedak G, Savard M, Voldeng H, Falk DE, Etienne M, Sparry E. *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation of barley in Eastern Canada: cultivar response and correlation analysis. *Plant Dis* 2004; 88: 837-844.
- Cimmino, A., Andolfi, A., Beretetskiy, A., Evidente, A., 2008. Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, a potential mycoherbicide against perennial thistles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6304e6309.
- Collins, M. M., Nair, S. B., Der-Haroutian, V., Close, D., Rees, G. L., Grove, D. I., & Wormald, P. J. (2005). Effect of using multiple culture media for the diagnosis of noninvasive fungal sinusitis. *American journal of rhinology*, 19(1), 41-45.
- Compendium of Grape Disease. Pearson RC, Goheen AC (Eds.) 4th printing. St. Paul, American Phytopathological Press, 1998.
- Cotty PJ, Bayman P, Egel DS, Elias KE. Agriculture, aflatoxin and *Aspergillus*. In: Powell KA, Reenwick A, Peberdy JF (Eds.) *The Genus Aspergillus*. New York, Plenum Press, 1994: 1-28.
- Cruz-Cruz, C.A., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., Peña-Rodríguez, L.M., 2009. Production of hydrophilic phytotoxins by *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of General Plant Pathology* 75, 191e195.
- De Lucca, A. J. (2007). Harmful fungi in both agriculture and medicine. *R. iberoamericana de micología*, 24, 3-13.
- Diener UL, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee LS, Klich MA. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annu Rev Phytopathol* 1987; 25: 249-270.
- Dutka B, 1989. Short-term root elongation toxicity bioassay. *Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*. National Water Research Institute (NWRI). .
- Environment Canada, 1999a. Guidance document on application and interpretation of single-species tests in environmental toxicology. EPS1/RM/34, Environmental Protection Service, Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Evidente, A., Cimmino, A., & Masi, M. (2019). Phytotoxins produced by pathogenic fungi of agrarian plants. *Phytochemistry Reviews*, 18(3), 843–870. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09624-0>.
- Evidente, A., Maddau, L., Spanu, E., Franceschini, A., Lazzaroni, S., Motta, A., 2003. Diplopyrone, a new phytotoxic tetrahydropyranpyran-2-one produced by *Diploia mutila*, a fungus pathogen of cork oak. *Journal of Natural Products* 66, 313e315.

Evidente, A., Cimmino, A., Berestetskiy, A., Mitina, G., Andolfi, A., Motta, A., 2008a. Stagonolides B-F, nonenolides produced by *Stagonospora cirsi*, a potential mycoherbicide of *Cirsium arvense*. *Journal of Natural Products* 71, 31e34.

Fernández, Rita Daniela. Algunas reflexiones sobre la clasificación de los organismos vivos. *Historia, Ciências, Saude-Manguinhos*, Rio de Janeiro, v.19, n.3, ju.-set.2012, P. 883-898.

Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., & Pitt, J. I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. In *Advances in foodmycology* (pp. 3–31). Springer.

GRANITI, A., 1964: Qualche dato sulla fitotossicità della «fusicoccina A », u n a tossina prodotta *in vitro* da *Fusicoccum amygdali* Del. *Phytopath. medit.*, 3: 75-86.

Grasso, V, 1951: Un nouvo agente patógeno d e l *Cupressus macrocarpa*Hartw. in Italia. *Italia for. most.*, 6: 62-65.

Gugnani HC. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front Biosci* 2003; 8: S346-S357.

Gutiérrez S. R. (2006). Introducción al Método Científico. Decimoctava edición, Esfinge, México.

Hartman, GL, Chang, H.-X. y Leandro, LF 2015. Research advances and management of soybean sudden death syndrome. *Protección de cultivos* 73:60-66.

Hasan HAH. Phytotoxicity of pathogenic fungi and their mycotoxins to cereal seedling viability. *Mycopathologia*. 1999; 148: 149-155

Hill RA, Wilson DM, McMillian WW, Widstrom NW, Cole RJ, Sanders TH, Blankenship PD. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. In: Lacey J (Ed.) *Trichothecenes and Other Mycotoxins*. Chichester, John Wiley and Sons, 1985: 79-95.

Hoagland, R.E., Williams, R.D., 2003. Bioassays e useful tools for the study of allelopathy. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Culter, H.G. (Eds.), *Allelopathy e Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*. CRC Press, Boca Raton, pp. 315e351.

INTINI, M. y A. PANCONESI, 1976: Alcuni aspetti della biología del *Coryneumcardinale*, in Toscana. *Ann. Accad. Ital. Sci. For.*, 25: 17-41.

Klich MA. Mycoflora of cottonseed from the southern United States: a three-year study of distribution and frequency. *Mycologia* 1986; 78: 706-712

Latunde-Dada AO. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Mol Plant Pathol* 2001; 2: 187-198

Lees AK, Hilton AJ. Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. *Plant Pathol* 2003; 52: 3-12.

Li FQ, Yoshizawa T. *Alternaria* mycotoxins in weathered wheat from China. *J Agric Food Chem* 2001; 48: 2920-2924.

Lillehoj EB, Wall JH, Bowers EJ. Preharvest aflatoxin contamination: Effect of moisture and substrate variation in developing cottonseed and corn kernels. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 584-586

Macías, F.A., Lacret, R., Varela, R.M., Nogueiras, C., Molinillo, J.M.G., 2008. Bioactive apocarotenoids from *Tectona grandis*. *Phytochemistry* 69, 2708e2715.

Magnani, g ., 1956: Disseccamento di piante adulte di *Cupressus macrocarpa*. *Monti e Boschi*, 4: 184-185.

McMillian WA, Wilson DM, Widstrom NW. Insect damage, *Aspergillus* ear mold, and aflatoxin contamination in south Georgia corn field in 1977. *J Environ Qual* 1978; 7: 565.

Mobius, N., & Hertweck, C. (2009). Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.004>

Miao L, Kwong TFN, Qian P-Y: Efecto de las condiciones de cultivo en el crecimiento miceliario, la actividad antibacteriana y los perfiles de metabolitos del hongo derivado marino *Arthrinium c.f. saccharicola*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 72: 1033-1073

Newman MC & Jagoe CH (Edts.), 1996. *Ecotoxicology: a Hierarchical Treatment*. Lewis Publishers, Boca Raton, 411 pp.

Patiño, L. y Rodríguez M. 2001. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y evaluación de fungicidas frente a los hongos más prevalentes en Vid (*Vitis vinifera*) L, variedad chardonnay en el viñedo San Martín en el Municipio de Sogamoso, departamento de Boyacá. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología industrial.

Pedras, M.S.C., Ahiahonu, P.W.K., 2004. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Chemical Ecology* 30, 2163e2179.

Pitt JI. Toxigenic fungi: which are important? *Med Mycol* 2000; 38(Suppl1): 17-22.

Quispe, F. (2017). Los 10 hongos más relevantes en fitopatología. Recuperado el 03 de julio de 2019 de <https://www.zamorano.edu/2017/07/07/los-10-hongos-mas-relevantes-fitopatologia/>.

Rath, P. M. (2001). Gellan gum as a suitable gelling agent in microbial media for PCR applications. *J. Med. Microbiol.*, 50, 108-109.

Salas B, Steffenson BJ, Caspar HH, Tacke B, Prom LK, Schwarz PB. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Dis* 1999; 83: 667-674

Severns DE, Clements MJ, Lambert RJ, White DG. Comparison of *Aspergillus* ear rot and aflatoxin contamination in grain of high oil and normal oil corn hybrids. *J Food Protect* 2003; 66: 637-643.

Sobrero, M. C. (2010). Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Soto A., Sylvana, Rabufel A., Patricia y Barcos M., Javiera. 2020. Hongos fitopatógenos causantes de pudrición peduncular en tres zonas productoras de paltos var. Hass [en línea]. Tierra Adentro. no. 113. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67190/NR42381.pdf?sequence=28&isAllowed=y>

Steffenson BJ. *Fusarium* head blight of barley: Epidemics, impact, and breeding for resistance. Tech Quart MBAA 1998; 35: 177-184.

Suter GW, 1993. Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers, Boca Raton.

Tournas VH. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. Crit Rev Microbiol 2005; 31: 33-44.

Tsudome, M., Deguchi, S., Tsujii, K., Ito, S., & Horikoshi, K. (2009). Versatile solidified nanofibrous cellulose-containing media for growth of extremophiles. *Applied and environmental microbiology*, 75(13), 4616-4619.

Van der Westhuizen L, Shephard GS, Snyman SD, Abel S, Swanevelder S, Gelderblom WC. Inhibition of sphingolipid biosynthesis in rat primary hepatocyte cultures by fumonisin B1 and other structurally related compounds. Food Chem Toxicol 1998; 36: 497-503.

Varejão, E. V., Demuner, A. J., Barbosa, L. C., & Barreto, R. W. (2013). The search for new natural herbicides—Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Protection*, 48, 41-50.

Verdú, I. G. (1986). Enfermedades producidas por hongos fitopatógenos que constituyen formas imperfectas (Deuteromicetos) de Ascomicetos. Boletín de sanidad vegetal. Plagas, 12(2), 237-272.

Visconti A, Sibia A. *Alternaria* toxins. In: Miller JD, Trenholm HL (Eds.) *Mycotoxins in Grains, Compounds Other Than Aflatoxins*. St. Paul, Eagan Press, 1994: 315-336.

Vurro, M., Evidente, A., Andolfi, A., Zonno, M.C., Giordano, F., Motta, A., 1998. Brefeldin A and a,b-dehydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium occidentale*. *Plant Science* 138, 67e79.

Wagener, w. w., 1928: *Coryneum* canker of Cypress. *Science*, 67: 584

Waniska RD, Venkatesha RT, Chandrashekar A, Krishnaveni S, Bejosano FP, Jeoung J, Jayaraj J, Muthukrishnan S, Liang GH. Antifungal proteins and other mechanisms in the control of sorghum stalk rot and grain mold. J Agric Food Chem 2001; 49: 4732-4742.

Xu P, Ding Z-Y, Qian Z, Zhao C-X, Zhang K-C: **Mejora de la producción de biomasa micelial y ácido ganoderico mediante el cultivo sumergido de *Ganoderma lucidum* SB97 utilizando medios complejos.** *Enzyme Microb Technol* 2008, 42: 325-331.

Yuzikhin, O., Mitina, G., Berestetskiy, A., 2007. Herbicidal potential of stagonolide, a new phytotoxic nonenolide from *Stagonospora cirsi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7707e7711.

Zakrzewski SF, 1991. Principles of Environmental Toxicology. American Chemical Society, Washington DC. 270 pp.

## 10 ANEXOS

En la tabla 6 podemos observar los resultados registrados de la germinación de semillas tanto brócoli cómo pasto.

Semilla	Brócoli		Pasto	
	Día 1	Día 6	Día 1	Día 6
Control	20	20	17	19
1	18.5	19	17	17.5
2	20	20	16	18.5
3	4	4	5	5.5
4	18	18.5	15.5	17.5
5	17	17	14	14.5
6	16	16.5	14	14
7	7	8	3.5	4
8	6	6	6.5	6.5
9	7	7.5	6.5	6.5
10	17.5	17.5	12.5	14
11	2	2	5	5
12	11.5	12	12.5	13
13	13	14.5	9	9
14	7	7.5	7.5	7.5
15	13.5	16	13	13
16	4.5	4.5	6	6
17	2.5	2.5	2.5	2.5
18	9.5	14	12	13.5
19	13	14.5	14	15.5
20	5.5	6	5.5	6
21	17	18	10	11
22	18	20	11	11
23	4	5	5	6
24	19	19.5	18	20

Tabla 1. Efecto fitotóxico de cepas de hongos cultivados en fermentación líquida estática en semillas de pasto y brócoli.

En la primera columna se encuentra el número de cada cepa del 1-24, en las siguientes columnas se encuentran los resultados del conteo de germinación. El día 1 es el primer día en que germinaron las semillas tanto de brócoli como de pasto, de acuerdo con los resultados se obtuvo el promedio ya que cada placa con semillas se hizo por duplicado, el día 6 fue el último día de revisión, en algunos casos como la cepa 24 germinaron casi todas las semillas en brócoli y pasto por lo contrario en cepas como la 11 y 17 germinaron menos de la mitad y con el paso de los días no hubo mayor germinación además de que el tamaño comparado con las control fue mucho menor