

## 21. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

### **Actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* de hongo endófito aislado desde planta endémica de Chile**

Vidal, Araceli; Cotoras, Milena; Mendoza Leonora

araceli.vidal@usach.cl; milena.cotoras@usach.cl; leonora.mendoza@usach.cl

Facultad de Química y Biología

Universidad de Santiago de Chile

---

### **Resumen**

Los hongos endófitos son organismos capaces de vivir dentro de las plantas sin causar síntomas de enfermedad, otorgándoles beneficios adaptativos, incluyendo defensa contra patógenos. Se ha descrito que estos hongos son capaces de secretar diversos metabolitos antifúngicos. *Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno que afecta a más de 250 cultivos de importancia agrícola y ornamental, causando la enfermedad denominada “pudrición gris” provocando grandes pérdidas económicas alrededor del mundo. El método de control mayormente utilizado es el control por medio de aplicación de fungicidas, pero la selección de cepas resistentes y la preocupación por el cuidado del medio ambiente, han llevado al desarrollo de métodos alternativos para el control de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antifúngica del endófito *Alternaria sp.* aislado de la planta endémica *Lithraea caustica*. Para esto, se realizaron ensayos de confrontación y se comprobó el efecto biocontrolador del endófito sobre *B. cinerea*. Luego se obtuvo un extracto desde el endófito y se evaluó la actividad antifúngica *in-vitro* sobre el crecimiento de *B. cinerea*, mostrando que el extracto obtenido tiene actividad antifúngica con un IC<sub>50</sub> de 102,4 ppm. Los compuestos presentes en el extracto fueron separados por cromatografía, visualizándose doce compuestos, de los cuales cinco presentaron actividad antifúngica evaluada mediante bioautografía. Finalmente, se determinó que los metabolitos antifúngicos corresponden a compuestos fenólicos. La identificación de hongos endófitos capaces de secretar compuestos antifúngicos puede ayudar en el desarrollo de nuevas alternativas al uso de fungicidas convencionales para el control de la pudrición gris.

**Palabras clave:** Endófito, Metabolito, Antifúngico, *B. cinerea*.

### **Introducción**

Los hongos endófitos son organismos capaces de vivir dentro de las plantas sin causar

síntomas de enfermedad en su huésped (Schulz y Boyle, 2006). Estos hongos sintetizan variados metabolitos secundarios con distintas propiedades biológicas (Keller y

col., 2005; Strobel, 2003), siendo un reservorio de nuevos compuestos que le otorgan distintos beneficios a la planta como: promoción del crecimiento, resistencia a estrés causado por factores abióticos y resistencia a enfermedades causadas por patógenos, (Schulz y col., 2002; Schulz y Boyle, 2006; Zeilinger y col., 2016). Los metabolitos secundarios fúngicos son moléculas de bajo peso molecular y se dividen principalmente en alcaloides, terpenos, policétidos y péptidos no ribosomales, algunos de los cuales presentan capacidad fungicida contra distintos hongos fitopatógenos importantes en la agricultura (Keller y col., 2005; Macheleidt y col., 2016; Wang y col., 2013; Deshmukh y col., 2018). Un ejemplo de metabolito secundario es la trichodermina, un sesquiterpeno aislado del hongo endófito *Trichoderma* que presenta propiedades antifúngicas y biocontroladoras de diversos patógenos vegetales, tales como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum ampelinum* y *Botrytis cinerea* (Shentu y col., 2014; Zeilinger y col., 2016). Otro metabolito secundario que se aisló por primera vez desde el endófito *Biscogniauxia mediterranea* es la 5-metilmeleina, un compuesto fenólico que tiene actividad contra *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *Peltula obscurans* y *Plasmopara viticola* (Silva-Hughes y col., 2015).

*B. cinerea* es un hongo fitopatógeno que ataca a más de 250 especies de plantas en todo el mundo. Este hongo produce la enfermedad denominada pudrición gris, causando importantes pérdidas económicas en la producción de cultivos vegetales de gran interés agronómico debido a podredumbres y cambios bioquímicos que alteran la calidad de frutas y de subproductos de gran interés industrial, pérdidas que pueden exceder hasta un billón de euros al año (Fillinger, 2015; Williamson y col., 2007; Dean y col., 2012). El control tradicional de la enfermedad se realiza a través de manejos culturales, eliminación de restos de plantas infectadas, y a través del uso de fungicidas químicos de origen sintético, y en los últimos años, de origen biológico (Agrios, 2005; Fillinger, 2015). En la

actualidad, el manejo de la enfermedad se ve afectado por la selección de aislados de *B. cinerea* resistentes a los fungicidas (Hahn, 2014; Esterio y col., 2015), lo que produce un problema medioambiental debido a su uso desmedido (Couderchet, 2003). En Chile y en el mundo se han encontrado aislados de *B. cinerea* resistentes a los principales fungicidas utilizados para el control de la pudrición gris (Esterio, 2017; Rupp et al., 2017). Es por este motivo que es de suma importancia buscar alternativas en el desarrollo de fungicidas que controlen a este patógeno y que sean amigables con el medioambiente. Una alternativa, son los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos.

En Chile se han realizado algunos estudios en los que se ha verificado la presencia de hongos endófitos en plantas nativas. En uno de estos trabajos, se evaluó la cantidad de endófitos presentes en *Embothrium coccineum* que es una planta que crece en los bosques templados de Chile, en la provincia de Osorno y se encontró: *Alternaria* sp., *Annulohyphoxylon* sp., *Arthrinium* sp., *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Cryptosporiopsis* spp., *Diaporthe* sp., *Drechslera* spp., *Fusicladium* sp., *Glomerella miyabeana*, *Hypoxylon* sp., *Mollisia cinerea*, *Mycosphaerella* sp. *Penicillium* spp., *Phacidiopycnis* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Pseudocercospora basitruncata*, *Stachybotrys* sp., *Stemphylium solanise*. En otro trabajo se realizó una búsqueda de hongos endófitos en plantas de quinoa (*Chenopodium quinoa*) presentes en desierto de Atacama. En ese trabajo se encontró: *Alternaria* spp., *Bartalinia robillardoides*, *Cadophora malorum*, *Coniochaetales Coniochaeta* sp., *Embellisia* sp., *Fusarium* spp., *Neonectria macrodidyma*, *Penicillium* spp. En ambos estudios se plantea que los endófitos encontrados estarían involucrados en la tolerancia a condiciones de estrés en la planta, y que existe una relación positiva entre la frecuencia de los hongos endófitos encontrados en las hojas y la protección del huésped, además se observó que algunos de los endófitos encontrados en mayor proporción en las plantas (*Xylaria* sp., *Penicillium* sp., *Diaporthe* sp., *Mycosphaerella*

sp.) tenían un bajo efecto biocontrolador sobre los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Ceratocystis pilifera* y *B. cinerea*. (González-Teuber y col., 2016; González-Teuber y col., 2017).

En trabajos previos realizados en el laboratorio de Micología se aislaron hongos endófitos desde plantas endémicas de la zona precordillerana del área Metropolitana de Chile, los que mostraron propiedades biocontroladoras sobre *B. cinerea*, inhibiendo el crecimiento micelial del patógeno. Uno de estos hongos endófitos fue el aislado Lc1 purificado desde Litre (*Lithraea caustica*). El género de este aislado es desconocido y tampoco se cuenta con antecedentes del potencial efecto antifúngico de los compuestos secretados por este hongo.

Por lo tanto, se plantea que un extracto obtenido desde el hongo endófito Lc1 presentaría actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*

## Objetivos

### General

Evaluar el potencial antifúngico sobre el hongo fitopatógeno *B. cinerea* de un extracto obtenido desde el medio de cultivo de Lc1 e identificar a nivel de género al hongo endófito Lc1

### Específicos

- Identificar a nivel de género al hongo endófito Lc1 aislado desde *L. caustica* mediante marcadores moleculares
- Determinar la actividad antifúngica de un extracto obtenido desde Lc1 sobre *B. cinerea*
- Caracterizar los compuestos antifúngicos presentes en el extracto obtenido desde el endófito Lc1

## Materiales y Métodos

**Identificación de hongo endófito.** Para la identificación a nivel de género del hongo endófito, se utilizó la comparación de las regiones ITS del rDNA. Para ello, se inoculó micelio obtenido a partir de un cultivo axénico de Lc1 en placas Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) sobre una capa de papel celofán. Este cultivo fue incubado por 3 días a 22°C. Posteriormente, se realizó una extracción de DNA genómico desde Lc1 crecido sobre el celofán, utilizando el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1990). Las secuencias ITS fueron amplificadas utilizando los partidores ITS- 1 e ITS- 4 (White et al., 1990). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µl que contenían; 2 µL de DNA genómico, 1 µL de partidador ITS- 1 (10 µM), 1 µL de partidador ITS- 4 (10 µM), 25 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega) y 21 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. El programa de PCR consistió en una denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, posteriormente 38 ciclos consistentes en: 94°C por 40 segundos, seguido de 57°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos, finalmente se realizó una elongación final a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR se enviaron a Macrogen, Korea para la secuenciación de los fragmentos amplificados.

Para conocer el género del aislado Lc1, se realizó un análisis y alineamiento de la secuencia obtenida mediante el programa Geneious® versión 11.1.5. La comparación de la secuencia de Lc1 se realizó utilizando una búsqueda en la base de datos de la plataforma BLASTn de NCBI. Posteriormente, se descargaron las secuencias de la región ITS del rDNA de las especies con alto porcentaje de identidad respecto a la secuencia analizada y se construyó un árbol filogenético utilizando el mismo programa bioinformático (Kearse y col., 2012).

**Producción de compuestos.** Para la obtención de compuestos producidos por el hongo endófito, se inoculó micelio obtenido a partir de un cultivo axénico de Lc1 en medio PDA y se incubó por 14 días a 22°C.

**Extracción de compuestos.** Para determinar el perfil químico de los compuestos secretados por Lc1, se realizó una extracción sólido-líquido desde el medio de cultivo como ha sido descrito anteriormente utilizando acetato de etilo (EtOAc) como solvente de extracción (Selim y col., 2014). Para esto, trozos de 0,5 x 0,5 cm del medio de cultivo sólido donde fue crecido Lc1 fueron depositados en tubos falcon de 50 mL, posteriormente se adicionó EtOAc hasta completar un volumen de 35 mL. Este sistema se dejó durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el extracto se filtró al vacío y se llevó a sequedad en un rotavapor a 40°C. Como control se realizó una extracción con EtOAc desde medio de cultivo PDA sin inocular con el hongo.

**Ensayos antifúngicos.** Para verificar la capacidad antifúngica del extracto obtenido desde el medio de cultivo con el hongo endófito Lc1, se midió el crecimiento radial del micelio del patógeno *B. cinerea* durante 4 días en placas de Petri que contenían medio de cultivo PDA en presencia del extracto obtenido. Las concentraciones evaluadas fueron de 50 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L. Para esto, el extracto disuelto en EtOAc se añadió al medio de cultivo en las concentraciones señaladas anteriormente. Finalmente, se inoculó un trozo de agar de 0,5 cm de diámetro de 3 días de crecimiento de un cultivo de *B. cinerea* en el centro de la placa de Petri. Como control de crecimiento, se utilizó un cultivo de *B. cinerea* inoculado en medio PDA que contenía EtOAc. El porcentaje de inhibición se calculó como:  $[1 - (\text{crecimiento micelial en tratamiento (cm)} / \text{crecimiento micelial en control (cm)})] * 100$ . El cálculo de IC<sub>50</sub> se realizó según lo descrito en Finney, 1952.

Para reconocer los compuestos del extracto que podrían inhibir el crecimiento del patógeno, se realizó una bioautografía (Choma y Grzelak, 2011). Para esto, se hizo una cromatografía en capa fina (CCF) en la que cual se sembró 3,5 mg de extracto de Lc1 disuelto en EtOAc. Como fase estacionaria, se utilizó una placa de sílica gel (TLC Silicagel 60, Merk) y como fase móvil CHCl<sub>3</sub>-MeOH 95:5. Esta placa cromatográfica se depositó sobre una placa de Petri que contenía una delgada capa de medio PDA suplementado con

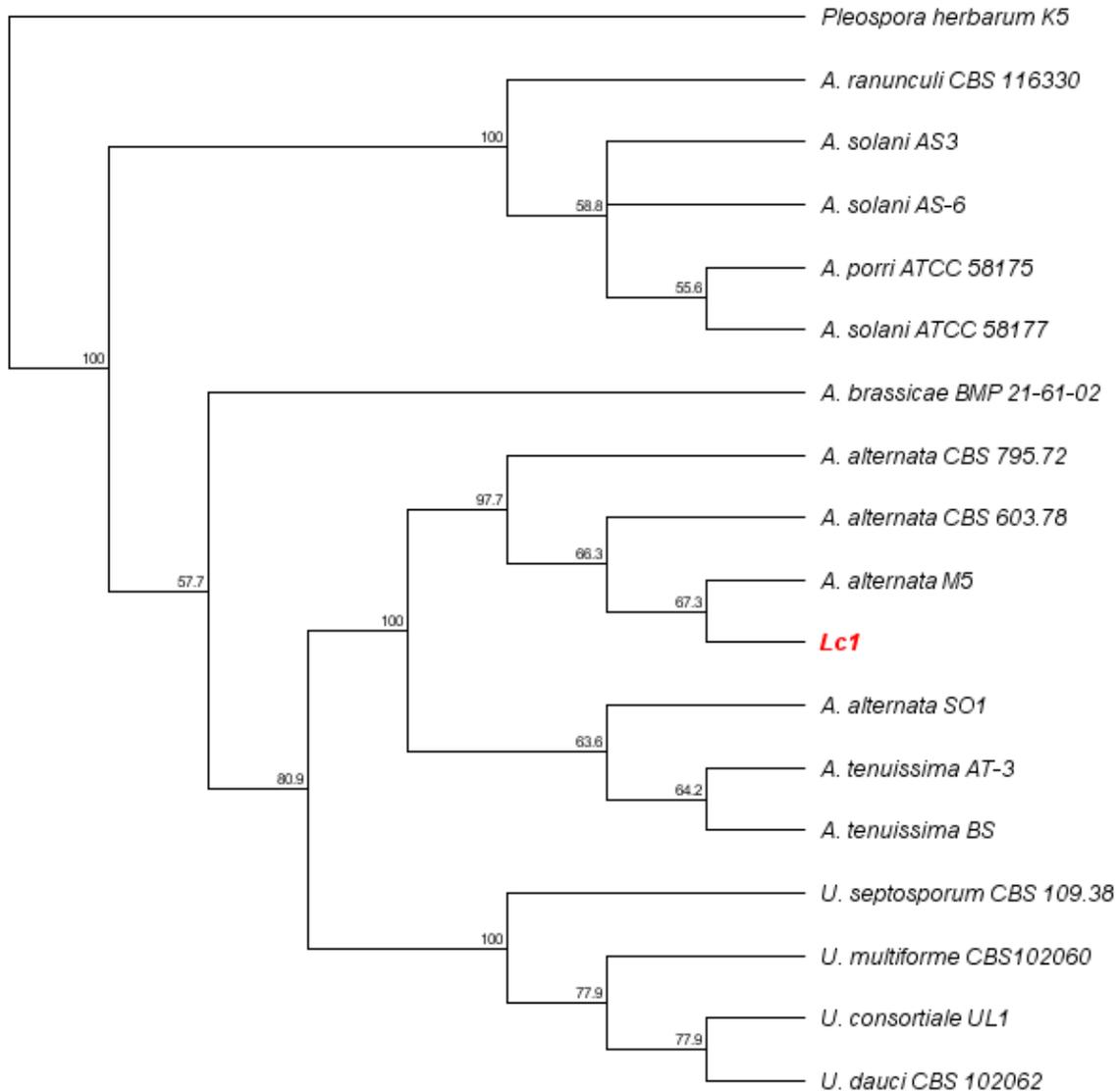
Kanamicina a 50 µg/mL. A continuación, sobre la placa cromatográfica se adicionó 3 mL de una suspensión de esporas a una concentración de 10<sup>6</sup> esporas/mL en medio PDA suplementado con Kanamicina 50 µg/mL. Los resultados de la bioautografía fueron visualizados hasta la completa colonización de *B. cinerea* en la placa de Petri. Los compuestos con actividad antifúngica fueron reconocidos la presencia de un halo inhibitorio sobre el compuesto con dicha actividad.

**Caracterización de compuestos antifúngicos.** Para analizar cualitativamente y caracterizar los compuestos que presentaron capacidad antifúngica, se realizó una CCF del extracto completo utilizando como fase estacionaria una placa de sílica gel (TLC Silicagel 60, Merk) y como fase móvil cloroformo/ metanol (CHCl<sub>3</sub>-MeOH) 95:5. El resultado de la separación cromatográfica se visualizó bajo luz UV a 254 nm. Posteriormente, la CCF del extracto de Lc1 se reveló utilizando tinciones específicas para cada familia de compuestos. Los reactivos usados fueron: Dragendorff reagent spray solution (Merk) para alcaloides, solución de cloruro férrico (2% p/v de cloruro férrico III, 50% v/v de metanol, 50% v/v H<sub>2</sub>O) para compuestos fenólicos y vainillina-ácido sulfúrico (3,5% p/v de vainillina en metanol, 0,625% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para terpenoides. Como revelador universal de compuestos orgánicos se utilizó ácido sulfúrico al 25% y posterior calentamiento. Como control positivo para el revelado de cloruro férrico, se utilizaron cuatro patrones de compuestos fenólicos: quercetina, ácido p- cumárico, ácido gálico e 5-hidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona.

## Resultados y Discusión

### Identificación molecular de hongo endófito Lc1 aislado desde *L. caustica*

La secuencia de la región ITS del rDNA amplificada con los partidores ITS 1- ITS 4 obtenida por secuenciación, fue editada en sus extremos con el programa Geneious (Kearse et al., 2012). Posteriormente, se realizó un



**Figura 1.** Relaciones filogenéticas entre Lc1 y especies de la familia *Pleosporaceae*. El dendrograma fue generado por el método de *Neighbor-Joining* utilizando secuencias de especies de *Alternaria* y *Ulocladium* basadas la región ITS del rDNA. El árbol está enraizado con la especie *Pleospora herbarum*. El aislado Lc1 está relacionado filogenéticamente con la especie *Alternaria*. En rojo se muestra la ubicación del aislado Lc1. El dendrograma se construyó con el programa Geneious® versión 11.1.5. En los nodos se muestran los valores de soporte de *Bootstrap* (1000 replicados).

alineamiento local utilizando la secuencia en la plataforma BLASTn de NCBI, obteniéndose un 100% de identidad con diferentes especies de *Alternaria*. Para establecer relaciones filogenéticas con especies de *Alternaria*, se buscaron organismos pertenecientes a la familia *Pleosporaceae* en la base de datos Mycobank (<http://www.mycobank.org>) y se descargaron desde la base de datos de NCBI doce secuencias de aislados pertenecientes a especies al género *Alternaria*: *A. solani* AS-6 (KY412985.1), *A. solani* AS3 (AF314576.1), *A. solani* ATCC 58177 (AF229475.1), *A. ranunculi*

CBS 116339 (NR\_136101.1), *A. porri* ATCC 58175 (AF229470), *A. tenuissima* BS (MH155277.1), *A. tenuissima* AT-3 (MH594735.1), *A. alternata* CBS 795.72 (KP124309.1), *A. alternata* CBS 603.78 (KP124312.1), *A. alternata* SO1 (KY367499.2), *A. alternata* M5 (MG282916.1), *A. brassicae* BMP 21-61-02 (AF229463.1), cuatro pertenecientes al género *Ulocladium*: *U. multiforme* CBS 1020160 (FJ266486.1), *U. septosporum* CBS 109.38 (FJ266489.1), *U. consortiale* UL1 (KC577270.1), *U. dauci* CBS 102062 (FJ266484.1) y una secuencia de

*Pleospora herbarum* aislado K5 (AB026164) como grupo externo (outgroup).

Las secuencias de estas especies fueron usadas para la construcción de un árbol filogenético con el programa Geneious® versión 11.1.5. Para esto, se realizó un alineamiento múltiple utilizando ClustalW. La elaboración del árbol filogenético se realizó mediante el método de *neighbour-joining*, con un *Bootstrap* de 1000 utilizando el modelo Tamura-Nei para el cálculo de distancia genética (Tamura K. y Nei M., 1993). El dendrograma resultante mostró que la secuencia de Lc1 se encuentra dentro del mismo clado que *Alternaria alternata* y *Alternaria tenuissima*, como se muestra en la figura 1.

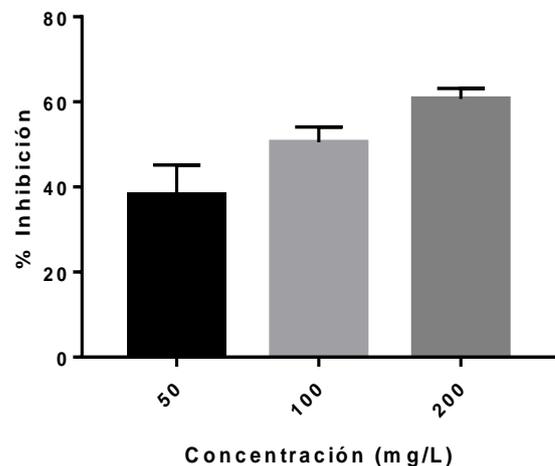
De acuerdo con el análisis filogenético basado en las secuencias de consenso de la región ITS del rDNA de distintas especies de la familia *Pleosporaceae*, Lc1 se encontraría dentro del complejo *alternata*, por estar ubicado dentro del mismo clado con especies que forman parte de este complejo, como *A. alternata* y *A. tenuissima* (Hoog y Horre, 2002; Zhu y col., 2015), como se puede observar en el dendrograma mostrado en la figura 1. Para la confección del árbol, también se utilizaron secuencias de especies de *Ulocladium*, ya que esta especie es muy semejante a *Alternaria* debido a sus similitudes moleculares y morfológicas, y en muchas ocasiones, existen confusiones en la identificación de especies de estos dos géneros debido a su cercanía (Woudenberg y col., 2013), sin embargo, Lc1 mostró formar parte del complejo *alternata* del género *Alternaria*.

Hasta el momento, no existen reportes sobre especies endófitas en *L. caustica*, este es el primer trabajo al respecto. No obstante, recientemente se realizaron dos estudios en donde se hallaron especies endófitas de *Alternaria* en plantas de *Chenopodium quinoa* y *Embothrium coccineum* presentes en Chile (González-Teuber y col., 2016; González-Teuber y col., 2017). Además, especies de *Alternaria* se han encontrado ampliamente como endófitos en plantas de distintos lugares del mundo (Tiwari, 2013; Wang y col., 2014; Chowdhary y col., 2015; Silva-Hughes y col.,

2015; Meena y col., 2017a; González-Menéndez y col., 2018).

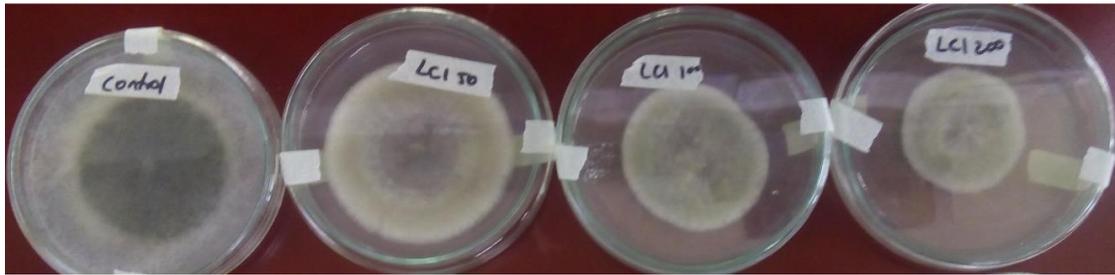
### Evaluación de la actividad antifúngica de extracto obtenido desde Lc1.

Para evaluar la actividad antifúngica del extracto sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*, se probaron tres concentraciones de extracto: 50 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L. Como se puede observar, se obtuvo una inhibición de 38,2% utilizando 50 mg/L, de 50,4% con 100 mg/L y del 60,6% con 200 mg/L a los 3 días posterior a la inoculación con el patógeno (Figura 2).



**Figura 2.** Efecto del extracto obtenido del hongo endófito sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*. El porcentaje de inhibición se calculó al tercer día de desarrollo respecto al crecimiento micelial de *B. cinerea* inoculado en control de solvente EtOAc. n=6.

Se realizó el cálculo de IC<sub>50</sub> (concentración de extracto que genera la mitad de la inhibición en el crecimiento del patógeno) y para esto se utilizó el método de Finney, 1952, obteniéndose un IC<sub>50</sub> de 102,4 mg/L. En la figura 3 se puede observar el crecimiento radial del micelio de *B. cinerea* después de 5 días posterior a la inoculación con el extracto.

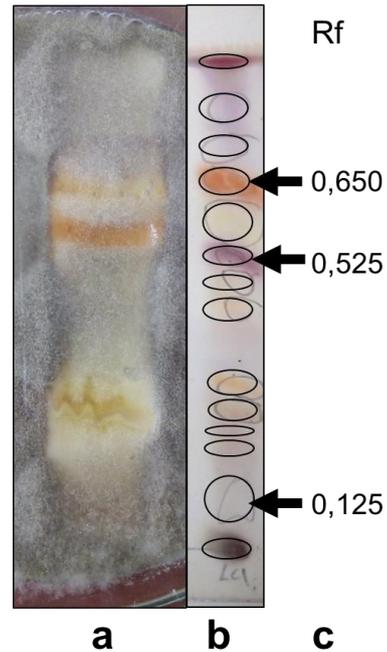


**Figura 3.** Inhibición en el crecimiento micelial de *B. cinerea* tratado con el extracto obtenido desde Lc1 luego de 5 días posterior a la inoculación. Se observa el crecimiento radial de patógeno inoculado en medio PDA tratado con tres concentraciones de extracto, de izquierda a derecha: 50 mg/L, 100, mg/L y 200 mg/L. A la izquierda se muestra el control no tratado, en el cual se observa completa colonización de *B. cinerea* en la placa de Petri

Para determinar qué compuestos presentes en el extracto inhibían el crecimiento del patógeno, se realizó una bioautografía. El extracto obtenido desde Lc1 contenía alrededor de 14 compuestos o manchas (Figura 2 b), y 5 de estos compuestos fueron capaces de inhibir el crecimiento del patógeno, como se observa en la figura 4 a. Estos metabolitos antifúngicos fueron detectados por la presencia de un halo inhibitorio sobre el compuesto, y presentan un Rf de 0,125 (conjunto de tres compuestos visualizados en la parte inferior de la cromatografía), un Rf de 0,525 y el último con un Rf de 0,650, como se ve en la figura 4. b y 3. c. El efecto antifúngico de los compuestos se determinó después de 27 horas posterior a la inoculación con *B. cinerea* y se registró hasta los 14 días desde la inoculación. En la figura 4 se muestra la inhibición en el crecimiento de *B. cinerea* en el día 10 posterior a la inoculación.

El género *Alternaria* es una fuente prometedora de metabolitos bioactivos (Lou y col., 2013), y en diversos estudios se han encontrado compuestos obtenidos desde especies endófitas (Fang y col., 2012; Wang y col., 2014; Silva-Hughes y col., 2015; Zhang y col., 2016). Hasta el momento se han caracterizado más de 70 metabolitos en *Alternaria*, dentro de estos, los más conocidos son: alternariol (AOH), alternarueno (ALT), ziniol, ácido tenuazónico (TeA), alternariol monometil éter (AME), brefeldina A, tentoxina (TEN), curvularina, y alterotoxina (ATX) I, II y III (Meena y col., 2017b). En el año 2017, se estudió el perfil de metabolitos secretados por una especie de *Alternaria* endófito y se encontraron 21 metabolitos. Entre estos se identificó un metabolito nuevo; el ácido 7 - metoxi-ftalida-3-acético, además de 20 compuestos ya conocidos que incluyen 19 policétidos y un alcaloide, correspondientes a los compuestos: AOH, AME, altenueno, TeA (alcaloide), estempitriol, ATX II, altenueno, 4'-epialtenueno, ácido isocracínico, talaroflavona, ácido alterico, alterolactona, 2,5-dimetil-7-hidroxicromona, altécromona B, ácido ferúlico, citreoisocumarinol, 6-metil-citreoisocumarina,

citreisocumarina, ortosporina, y diaportinol (Orfali y col., 2017). No obstante, los metabolitos más frecuentemente encontrados en distintas especies de *Alternaria* corresponden a los compuestos fenólicos TeA, AOH y AME (Benavides y coll., 2013; Orfali y col., 2017; Meena y col., 2017b).

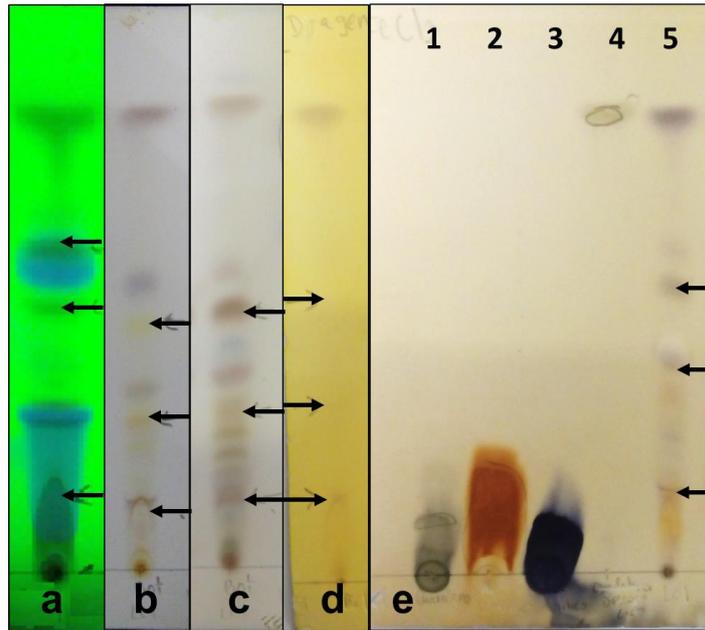


**Figura 4.**

a) Bioautografía del extracto obtenido desde Lc1 sobre el crecimiento de *B. cinerea* 10 días posterior a la inoculación.

b) Cromatograma de los compuestos del extracto obtenido desde endófito Lc1. Se utilizó una fase móvil de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 95:5 y se reveló con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 25%.

c) Rf de los compuestos observados en la bioautografía. Las flechas indican los compuestos antifúngicos observados y su ubicación dentro del cromatograma.



**Figura 5.** Cromatograma de los compuestos revelados pertenecientes al extracto obtenido desde Lc1. a) Placa cromatográfica visualizada mediante luz UV a 254 nm. b) Placa cromatográfica antes de ser revelada. c) Revelado utilizando reactivo de Dragendorff para identificar alcaloides. d) Revelado utilizando vanilina- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para identificar terpenoides. e) Revelado con cloruro férrico para identificar compuestos fenólicos. Se usaron estándares sólo para compuestos fenólicos: **1.** quercetina, **2.** ácido p- cumárico, **3.** ácido gálico, **4.** 5-hidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona, **5.** Extracto obtenido desde Lc1. Las flechas señalan los compuestos antifúngicos detectados mediante bioautografía. Los revelados con Dragendorff y vanilina dieron negativos. En la CCF se utilizó una fase móvil de CHCl<sub>3</sub>-MeOH 95:5.

gura Se han descrito extractos y metabolitos obtenidos desde especies endófitas de *Alternaria* que muestran actividad antibacteriana y antifúngica contra patógenos como: *Escherichia coli*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, entre otros (Hellwig y col., 2002; Feng y col., 2010; Wang y col., 2014; Silva-Hughes y col., 2015; Chowdhary y col. 2015; Elgorban y col., 2018; González-Menéndez y col., 2018). Muchos de los metabolitos de estas especies de *Alternaria* endófitas, son nuevos y podrían ser una alternativa a los compuestos antifúngicos utilizados en la actualidad, ya que se han descubierto potentes antifúngicos a partir de diversas fuentes naturales (Vengurlekar y col. 2012). No obstante, existe poca información sobre metabolitos antifúngicos obtenidos desde especies endófitas de *Alternaria* que tengan efecto sobre *B. cinerea*. En un estudio se utilizaron dos extractos desde dos cepas de

*Alternaria* endófitas aisladas de *Ocimum sanctum* para evaluar su capacidad antifúngica contra el patógeno. En sus resultados se mostró que los IC<sub>50</sub> obtenidos fueron de 1,422 mg/mL y de 0,965 mg/mL, respectivamente (Chowdhary y col. 2015). En otro trabajo se evaluó la capacidad antifúngica de un extracto obtenido desde *Alternaria* aislada desde *Panax ginseng* y se obtuvo una inhibición en el crecimiento micelial en *B. cinerea* de cerca del 50% utilizando una concentración de extracto de 10 mg/mL (Park y col., 2017). Esos resultados superan entre 10 y 100 veces la concentración de extracto utilizado desde Lc1 para conseguir el mismo efecto en *B. cinerea*. Esto muestra que el extracto obtenido desde Lc1 presenta una mayor capacidad antifúngica contra el patógeno que los extractos obtenidos desde *Alternaria* en otros trabajos.

## Caracterización de compuestos antifúngicos

Para conocer el tipo de compuestos antifúngicos identificados en la bioautografía, se realizó un revelado con soluciones de Dragendorff para identificar alcaloides, los cuales deberían visualizarse como una mancha de color amarillo sobre un fondo de color anaranjado (figura 5. b) vainillina-ácido sulfúrico para terpenoides, los cuales deberían ser vistos como manchas de color verde azulado sobre un fondo de color levemente celeste (figura 5. c) y para compuestos fenólicos se utilizó cloruro férrico, los cuales deberían visualizarse como una coloración negra o naranja sobre un fondo levemente anaranjado. Los cinco compuestos antifúngicos reaccionaron sólo para el revelado de cloruro férrico (figura 5. e). El grupo de tres compuestos con  $R_f = 0,125$  tuvo una reacción positiva, observándose una mancha de coloración naranja. Los compuestos con  $R_f = 0,525$  y  $R_f = 0,650$  también tuvieron una reacción positiva, formándose un cromóforo de color gris. Estos resultados indican que los compuestos antifúngicos encontrados en el extracto obtenido desde la especie de *Alternaria* endófito Lc1, corresponderían a compuestos fenólicos. Como controles positivos para la detección de compuestos fenólicos mediante este revelador, se utilizaron los patrones: quercetina, ácido p- cumárico, ácido gálico e 5-hidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona, observándose en los compuestos pertenecientes al extracto, colores muy similares a los obtenidos con los patrones (figura 5. e).

La mayoría de los compuestos secretados por las especies de *Alternaria* corresponden a compuestos fenólicos (Meena y col., 2017a; Meena y col 2017b; Orfali y col., 2017), y en este trabajo, los compuestos antifúngicos detectados, corresponderían a este tipo de metabolitos, observándose una reacción positiva con el revelador de cloruro férrico para los cinco compuestos o manchas encontradas. Estos cromóforos formados presentan una coloración muy similar a los que se forman cuando se utilizan patrones como controles

positivos para la detección de este tipo de compuestos (Sharma y col., 1998). Aún debe analizarse a qué clase de compuestos corresponden los metabolitos antifúngicos que están presentes dentro del extracto obtenido desde el endófito Lc1. Además, es fundamental evaluar la toxicidad del extracto para poder sugerir su utilización como fungicida, ya que se ha descrito que algunos compuestos prevalentes entre las distintas especies de *Alternaria* (*Alternariol* con un 81%, AME con 96% y AOH con 81%) son fitotóxicos (Meena y col., 2017b; Wang 2014) y están involucrados en el proceso infectivo del estado patogénico de muchas especies de *Alternaria* (Meena y col., 2017a). No obstante, los fungicidas utilizados en la actualidad también resultan ser tóxicos para las plantas si se usan en concentraciones elevadas (Couderechet, 2003; Rouabhi, 2010). Al comparar productos naturales con fungicidas, se ha reportado que los productos de origen sintético tienen un período de degradación prolongado generando problemas de contaminación ambiental, en contraste, los productos naturales no tienen grandes efectos en el ecosistema ya que se degradan con mayor facilidad, y pueden ser una buena alternativa a los fungicidas sintéticos, pues en extractos naturales se pueden encontrar nuevas moléculas o mezclas de compuestos que son menos susceptibles a los mecanismos de resistencia por parte de los patógenos (Lou y col., 2013; Stefani y col., 2012; Soković y col., 2013; Fuentefría y col., 2017).

## Conclusiones

Este trabajo corresponde a una primera aproximación en la identificación de extractos y compuestos antifúngicos provenientes desde hongos endófitos aislados desde plantas endémicas de Chile específicamente contra *B. cinerea*, en donde se ha reportado muy poco hasta la fecha, identificándose por primera vez un endófito aislado desde Litre con actividad antifúngica contra el patógeno. Además, es uno de los pocos trabajos que existen en la determinación de la capacidad antifúngica contra *B. cinerea* de extractos obtenidos desde *Alternaria spp*, siendo el primer trabajo realizado en Chile. Es de suma importancia

buscar alternativas en el desarrollo de fungicidas que controlen a este patógeno, ya que el manejo de la enfermedad se ve afectado por la selección de aislados de *B. cinerea* resistentes a los fungicidas, y en Chile y en el mundo se han encontrado aislados de *B. cinerea* resistentes a los principales fungicidas utilizados para su control. Es por este motivo que el uso de extractos provenientes desde hongos endófitos puede ser una alternativa al control de la pudrición gris.

## Bibliografía

1. Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier academic Press.
2. Choma I., Grzelak E. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218 (19): 2684-2691.
3. Chowdhary, K., & Kaushik, N. (2015). Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. *PLoS ONE*, 10 (11).
4. Couderchet M. (2003) Benefits and problems of fungicide control of *Botrytis cinerea* in vineyards of Champagne. *Vitis*, 42 (4): 165–171.
5. Dean, R., Kan, Janalvan, Pretorius, Z. A., Hammond-kosack, Kim E., Pietro, A. D. I., Spanu, P. D, Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, (13), 414–430.
6. Deshmukh, S.K.; Gupta, M.K.; Prakash, V.; Saxena, S. (2018). Endophytic Fungi: A Source of Potential Antifungal Compounds. *Journal of Fungi*, 4 (77).
8. Elgorban A.M., Bahkali A.H., Abdel-Wahab M.A. (2018). Natural products of *Alternaria* sp., an endophytic fungus isolated from *Salvadora persica* from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. *Accepted manuscript*
9. Esterio M., Copier C., Román A., Araneda M., Rubilar M., Pérez I., Auger J. (2017). Frequency of fungicide-resistant *Botrytis cinerea* populations isolated from 'Thompson Seedless' table grapes in the Central Valley of Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44 (3): 295-306.
10. Esterio, M., Araneda, M. J., Román, A., Pizarro, L., Copier, C., and Auger, J. (2015) First report of boscalid resistant *Botrytis cinerea* isolates carrying the mutations H272R, H272Y, P225L, and P225H from table grape in Chile. *Plant Disease*, 99 (891).
11. Fang, Z.F.; Yu, S.S.; Zhou, W.Q.; Chen, X.G.; Ma, S.G.; Li, Y.; Qu, J. (2012). A new isocoumarin from metabolites of the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* (Nee & T. Nee: Fr) Wiltshire. *Chinese Chemical Letters*, (23): 317–320.
12. Feng C., Ma Y. (2010). Isolation and anti-phytopathogenic activity of secondary metabolites from *Alternaria* sp. FL25, an endophytic fungus in *Ficus carica*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, (16): 76–78.
13. Fillinger Sabine, E.Y. (2015) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*, Springer.
14. Finney, D. J., Ed. (1952). Probit Analysis. Cambridge, England, Cambridge University
15. Fuentefria A., Pippi B., Lana D., Donato K. and Andrade S. (2017). Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance, *Letters in Applied Microbiology*, (66): 2-13.
16. González-Menéndez, V., Crespo, G., de Pedro, N., Diaz, C., Martín, J., Serrano, R. Genilloud, O. (2018). Fungal endophytes from arid areas of Andalusia: high potential sources for antifungal and antitumoral agents. *Scientific Reports*, 8 (9729).
17. González-Teuber, M. (2016). The defensive role of foliar endophytic fungi for a South American tree. *AoB Plants*, 8.
18. González-Teuber, M., Vilo, C., & Bascuñán-Godoy, L. (2017). Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genomics Data*, (11): 109–112.
19. Hahn M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Biological Chemistry*. 28;7(4):133-41.
20. Hellwig V., Grothe, T., Mayer-Bartschmid A., Endermann R., Geschke F.-U., Henkel T., Stadler, Altersetin M. (2002). A new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. taxonomy, Fermentation, Isolation, Structure elucidation and biological activities. *Journal of Antibiotics*, (55): 881–892.
21. Hoog G. and Horre R. (2002). Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses*, (45): 259–276
22. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12): 1647–1649.
23. Keller, N.P., Turner, G. and Bennett, J.W. (2005) Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, (3): 937–947.
24. Lou J., Fu L., Peng Y., Zhou L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18 (5): 5891-935.
25. Macheleidt, J., Mattern, D., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., Brakhage, A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics*, (50): 371-392
26. Meena, M., Gupta, S. K., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K., & Upadhyay, R. S. (2017b).

- Alternaria* Toxins: Potential Virulence Factors and Genes Related to Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 8 (1451).
27. Meena, M., Swapnil, P., & Upadhyay, R. S. (2017a). Isolation, characterization and toxicological potential of *Alternaria*-mycotoxins (TeA, AOH and AME) in different *Alternaria* species from various regions of India. *Scientific Reports*, 7 (8777).
  29. Orfali, R.S., Ebrahim, W. & El-Shafae, A.M. (2017). Secondary Metabolites from *Alternaria* sp., a Fungal Endophyte Isolated from the Seeds of *Ziziphus jujube*. *Chemistry of Natural Compounds*, 53 (1031).
  30. Park, Y., Kim, Yoosam M., Ratnesh C. (2017). Fungal endophytes inhabiting mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng* Meyer): Diversity and biocontrol activity against ginseng pathogens. *Scientific Reports*, 7 (16221).
  31. Rouabhi R. (2010). Introduction and Toxicology of Fungicides. *IntechOpen*
  32. Rupp, S., Weber, R. W. S., Rieger, D., Detzel, P., & Hahn, M. (2016). Spread of *Botrytis cinerea* Strains with Multiple Fungicide Resistance in German Horticulture. *Frontiers in Microbiology*, (7) 2075.
  33. Schulz, B. and Boyle, C. (2006). What are Endophytes? *Soil Biology*, (9): 1–14.
  34. Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K. and Krohn, K. (2002) Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* (106): 996–1004.
  35. Selim K., El-Beih A., Abdel-Rahman T., El-Diwany A. (2014). Biological evaluation of endophytic fungus, *Chaetomium globosum* JN711454, as potential candidate for improving drug discovery. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68 (1): 67-82.
  36. Sharma O., Bhat T., Singh B. (1998). Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *Journal of Chromatography A*, 822 (1).
  37. Shentu, Xuping, Zhan, Xiaohuan, Ma, Zheng, Yu, Xiaoping, & Zhang, Chuanxi. (2014). Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1): 248-254.
  38. Silva-Hughes, A.F., Wedge, D.E., Cantrell, C.L., Carvalho, C.R., Pan, Z., Moraes, R.M., Madoxx, V.L. and Rosa, L.H. (2015) Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research*, (175): 67–77.
  39. Soković M., Glamočlija J. and Ćirić A. (2013). Natural Products from Plants and Fungi as Fungicides. *IntechOpen*
  40. Stefani, A., Felício, J. D., & de Andréa, M. M. (2012). Comparative Assessment of the Effect of Synthetic and Natural Fungicides on Soil Respiration. *Sensors*, 12 (3): 3243–3252.
  41. Strobel G, D.B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (67): 491–402.
  42. Tamura K., Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10 (3): 512-26.
  43. Tiwari K. Frequency distribution and assessment of genetic diversity of novel endophyte *Alternaria alternata* accessions isolated from *Pongamia pinnata* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 16 (19):1004-9.
  44. Vengurlekar S., Sharma R., & Trivedi P. (2012). Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. *Pharmacognosy Reviews*, 6 (12): 91–99.
  45. Wang X, Mohamed M. Radwan, Amer H. Taráwneh, Jiangtao Gao, David E. Wedge, Luiz H. Rosa, Horace G. Cutler, and Stephen J. Cutler. (2013). Antifungal Activity against Plant Pathogens of Metabolites from the Endophytic Fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (61): 4551-4555.
  46. Wang Y., Yang M., Wang X., Li T., Kong L. (2014). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Fitoterapia*, (99): 153-158.
  47. Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. and Kan, J.A.L. Van (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, (8) 561–580.
  48. Woudenberg J., Groenewald J., Binder M., Crous P. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, (75): 171-212.
  49. Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R. and Mukherjee, P.K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, (30): 74–90.
  50. Zhang N., Zhang C., Xiao X., Zhang Q., Huang B. (2016). New cytotoxic compounds of endophytic fungus *Alternaria* sp. isolated from *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. *Fitoterapia*. (110): 173-80.
  51. Zhu X. and Xiao C. (2015). Phylogenetic, Morphological, and Pathogenic Characterization of *Alternaria* Species Associated with Fruit Rot of Blueberry in California. *Phytopathology*, 105 (12): 1555-1567.

## Agradecimientos

Se agradece a proyecto DICYT

## Financiamiento

Proyecto DICYT USACH