

Una alternativa para el biocontrol de hongos fitopatógenos

Dra. Rosalba Ortega Jiménez

Universidad Veracruzana

roji53@gmail.com

Dra. Verónica G. Domínguez Martínez

Universidad Veracruzana

vdominguez@uv.mx

Dra. Norma A. Coria Gil

Universidad Veracruzana

ncoriagil@live.com.mx

Resumen

El uso de metabolitos secundarios de diversas especies para el biocontrol de plagas, es de gran provecho a los productores y al ambiente, dado que son biodegradables y su aplicación es una de las áreas de investigación de la Biotecnología actual. Las acetogeninas producidas por las Anonáceas destacan entre estos metabolitos. Son derivados de ácidos carboxílicos, y se pueden extraer tanto de las raíces como de las hojas y semillas del fruto de especies como la guanábana (*Annona muricata*), chirimoya (*A. cherimolia*) y otras. Las acetogeninas presentan una gama de actividades citotóxicas, particularmente como antitumorales y antimicrobianas. Dado el impacto de los hongos fitopatógenos sobre la economía de los agricultores, diseñamos un proyecto enseñanza aprendizaje para obtener y evaluar un extracto de guanábana rico en acetogeninas sobre cultivos *in vitro* de hongos que infestan cultivos como jitomate, ciruela y gladiola. Se demostró la inhibición significativa del crecimiento de nueve hongos fitopatógenos, incluyendo *Fusarium sp.* y *Sclerotium sp.* Esto abre la oportunidad de ofrecerlos a agricultores para uso en campo. Dos de los alumnos participantes elaboraron su tesis de licenciatura con los resultados obtenidos.

Palabras clave: biocontrol, metabolitos secundarios, hongos fitopatógenos

Introducción

Considerando que en la filosofía actual de las Universidades pudiera aceptarse como lema “hacer para aprender y para servir a la sociedad”, hemos diseñado un proyecto de trabajo conjunto entre 3 Académicas radicadas en 3 Facultades de la universidad Veracruzana. De forma interdisciplinaria atendemos los programas educativos de Biología, Ciencias Biológico Agropecuarias y Química industrial, y hemos encontrado convergencia en el ámbito de la Bioquímica-Fitoquímica y Agroecosistemas. Nuestra propuesta de trabajo se centra en la búsqueda de alternativas de biocontrol frente a diversas plagas que afectan cultivos regionales como chayote, papa, jitomate y un cultivo ornamental, gladiola. Abordamos esta propuesta desde nuestra experiencia previa en el uso de extractos de diversas plantas con bioactividad. En esta experiencia hemos valorado la gran efectividad de extractos procedentes de anonáceas, principalmente guanábana (*Annona muricata*), cuyas raíces, corteza, hojas frutos se distinguen por producir derivados de ácidos carboxílicos, las acetogeninas.

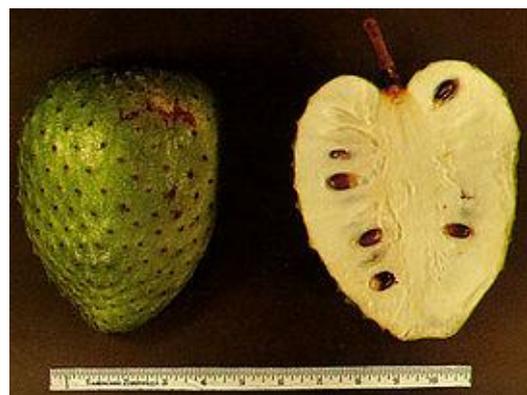


Figura 1. Árbol con fruto de guanábana, y fruto mostrando las semillas dentro del mesocarpo.

Al probar los extractos contra insectos de diversos géneros, tanto holometábolos (culícidos como *Aedes aegypti*, *Anastrepha ludens*) como hemimetábolos (*Blatella periplaneta*) se encontró una capacidad letal del 100% a dosis baja (25ppm). Al analizar el daño causado a los organismos expuestos, llegamos a la conclusión que el mecanismo subyacente es diferente al propuesto en la literatura a la fecha, por lo que estamos desarrollando un proyecto de investigación básica paralelo al de aplicación para biocontrol de hongos. En este proyecto exponemos mutantes haploides de levadura a la dosis proporcional de los extractos, eligiendo aquellas cepas con genes potencialmente involucrados en un mecanismo de acción en que se involucran diversos aspectos de la morfogénesis, ya que en insectos expuestos a dosis subletales, los procesos metamórficos se ven interrumpidos (Domínguez Martínez, et al., 2001).

El desarrollar dos aspectos del trabajo académico de forma simultánea, nos ha permitido ofrecer a los alumnos una “plataforma de aprendizaje en acción”, en que abarcamos al menos los siguientes aspectos de su formación profesional:

- Aprendizaje de los fundamentos teóricos y prácticos de Química Orgánica y Fitoquímica que sostienen toda investigación sobre metabolitos secundarios
- Entrenamiento en técnicas para la purificación y análisis de metabolitos bioactivos: cromatografía (capa fina y columna), reactividad de grupos funcionales, etc..
- Desarrollo de destrezas para el cultivo y mantenimiento de estadios larvales de culícidos
- Destrezas para el cultivo y manejo de mutantes haploides de levadura, como organismo modelo para el estudio del mecanismo de acción de metabolitos bioactivos.
- Conocimientos de la bioquímica del metabolismo de levaduras: determinación de productos de reacción en organismos knock out frente a metabolitos bioactivos.
- Ensayos de toxicidad para el biocontrol de hongos fitopatógenos.

Desarrollo de contenidos

***La interdisciplinariedad para conciliar intereses y objetivos de aprendizaje/investigación**

Al participar en 3 programas educativos diferentes, aunque pertenecientes a las Ciencias Químicas y Naturales, hemos logrado implementar técnicas de laboratorio compatibles entre los programas especiales para el curso de Bioquímica a impartir en las tres carreras. Esto se hizo congruente al considerar que el campo profesional requiere de conocimientos no exclusivos de cada perfil formativo. Los profesionistas actuales de las Ciencias biológico agropecuarias se ven involucrados en problemas de alimentación, salud, deterioro de medios ambientes. La Biotecnología ofrece abordajes importantes para la solución de los mismos, y al estar fundamentada en las Ciencias Químico-Bioquímicas, es posible empatar los contenidos temáticos de los cursos básicos.

Al buscar la aplicación de la Fitoquímica a la obtención de metabolitos naturales aplicables en la biorremediación, los Alumnos de los tres programas se ven motivados a aprender:

- Los fundamentos de la relación estructura química-purificación, en base a la regla de “lo semejante disuelve a lo semejante”.
- Las técnicas de separación y análisis químico de biomoléculas: cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, reacciones de grupos funcionales.
- La importancia de la investigación “básica” en el campo profesional
- La capacidad de diseñar proyectos avocados a resolver problemas sociales.

Contando con preparaciones de compuestos de suficiente pureza, se integran a la dinámica de búsqueda de aplicación.

*Bioensayos

Para ello hemos elegido las pruebas de toxicidad con modelos biológicos de manejo sencillo. Habiendo iniciado con el establecimiento para el desarrollo de estados larvarios de vida acuática de *Culex sp* y particularmente *Aedes aegypti*, logramos un sistema de bioensayo no sólo económico, sino didáctico. La caracterización taxonómica de insectos y el estudio de sus ciclos de vida permite integrar los conocimientos de la Bioquímica y la Fitoquímica a la Entomología y Parasitología, además de que el modelo brinda resultados a corto plazo.

Requerimos el implemento de condiciones de laboratorio para el desarrollo de las etapas larvales de los mosquitos. Para ello se adecuaron “sistemas” sencillos (recipientes con agua limpia, temperatura controlada y alimentación de peces) para la eclosión y desarrollo larvario *A. aegypti*. Los huevecillos fueron proporcionados por el Departamento de Vectores de los Servicios de Salud de Veracruz. En las condiciones de laboratorio, los estadios larvales I-IV tuvieron los tiempos normales de crecimiento, por lo que la exposición a los extractos bioactivos reflejó el verdadero impacto de los metabolitos usados (Figura 4).



Figura 4. Pupa de *Aedes aegypti* expuesta a extractos. Se advierte daño severo al desarrollo de trompa y patas (Flechas). El cuerpo no evolucionó y permaneció con vestigios del estado larval.

El trabajo con culícidos nos permitió iniciar la etapa de atención a problemas relevantes. Los culícidos no sólo afectan la salud humana, también la animal. Son

notables las pérdidas que sufren los ganaderos por las parasitosis transmitidas por estos insectos ya que son conocidos vectores de virus causantes de fiebre amarilla, dengue, etc. (REF). Siendo Veracruz uno de los principales Estados afectados por *A. aegypti*, la incorporación de Alumnos a los trabajos de muestreo de larvas y pupas en zonas afectadas, el análisis de variación estacional, la recopilación de datos sobre la capacidad de extensión territorial que los mosquitos han mostrado en últimos años, resulta una buena estrategia para propiciar la formación integral que se requerirá en la vida profesional.

***Los modelos biológicos**

Al observar la bioactividad de nuestros extractos ricos en acetogeninas causaron serios daños a pulas de *A. aegypti*, nos llevó a iniciar los estudios sobre el posible mecanismo de acción diferente al reportado en la literatura. Puesto que observamos alteraciones en la morfogénesis de las larvas, decidimos exponer mutantes haploides de levadura, pertenecientes a la cepa MAT α (proporcionadas amablemente por el Dr. Sergio Encarnación Guevara, del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM).

El trabajo en laboratorio con estos organismos representa otro ámbito de formación para nuestros estudiantes. Se trata del modelo eucarionte más utilizado en la investigación de la Biología Molecular, en campos avanzados como la Genómica y Proteómica, ya que permite, entre otras cosas, probar medicamentos y compuestos bioactivos en mutantes de genes potencialmente involucrados en la acción sugerida de los mismos. Una vez establecida la LD₅₀ la mutante que muestre alteraciones en la replicación o en su metabolismo, será aquella cuyo gen *knock out* esté involucrado en la vía de acción del compuesto en prueba.

De esta forma, nuestros alumnos aprendieron a:

- Establecer condiciones de cultivo y determinación de la cinética de crecimiento para las mutantes de levadura
- Realizar ensayos metabólicos usando diferentes fuentes de Carbono (sustratos), observando el efecto de diversas mutaciones sobre vías

metabólicas potencialmente involucradas: fermentación aerobia o anaerobia, ciclo de Krebs, biosíntesis de pentosas.

- Análisis de cinéticas de crecimiento y su variación atribuible a metabolitos bioactivos.
- Integración de vías metabólicas. Al comparar la cinética de crecimiento de las mutantes con diferentes fuentes de C, los Alumnos propusieron las vías de biosíntesis necesarias para la replicación celular de las levaduras y el impacto de los metabolitos bioactivos sobre las mismas.

*Biocontrol de hongos fitopatógenos

El trabajo experimental con mutantes de levadura, nos llevó a descubrir el impacto de los metabolitos bioactivos en la vía de biosíntesis de quitina. La evidencia principal son las alteraciones de la morfogénesis de cepas de levadura ΔCHS y ΔCHD expuesta a extractos de guanábana. Encontramos alteraciones del ciclo celular, así como formación anormal de septos, lo que causa un fenotipo parecido a pseudohifas (Figura 5, tomada de Domínguez Martínez, et al., 2011).

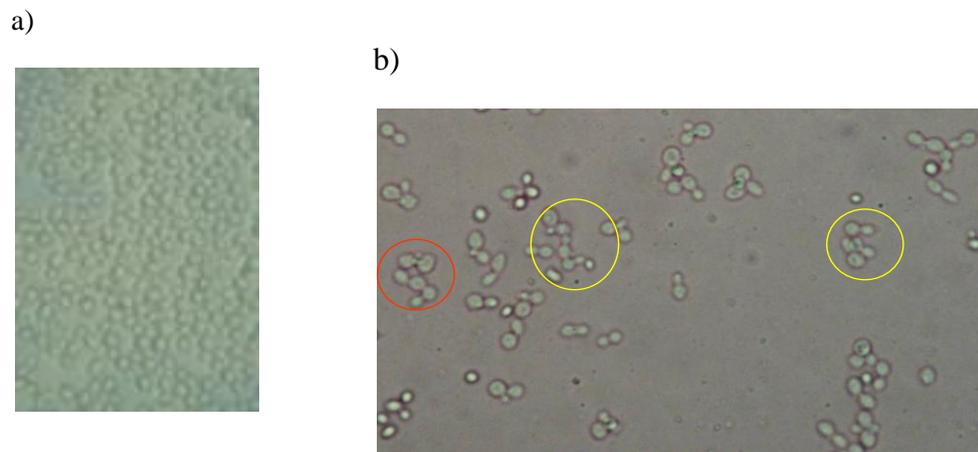


Figura 5a. Mutantes de Mat α ΔCHS crecidas en ausencia de extracto. Se observan células confluentes, redondas u ovals. Al exponerlas al extracto (b) aparecen células con más de una hija (círculos amarillos). Es evidente la malformación del septo, lo que causa que las nuevas células no se despeguen de la materna (círculo rojo)

Dado que las mutantes son haploides, tal crecimiento hace evidente la participación de los genes mencionados, cuyos productos son las enzimas quitina-sintetasa y quitina-desacetilasa, ambas requeridas para la formación de la pared celular de hongos.

Al exponer hongos fitopatógenos principalmente de los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Phoma* y *Phytophthora*, se encontró un crecimiento disminuido notable al cultivar los hongos en agar papa-dextrosa (APD) adicionados con acetogeninas.



Figura 6. Inoculación de hongos en medio APD bajo condiciones de esterilidad.

Se comparó el diámetro micelial respecto al alcanzado en cultivos sin sustancias tóxicas, y mediante un diseño completamente al azar con 3 repeticiones, se evaluó la varianza mediante el programa MINITAB versión 15.

Se encontró que la acción inhibitoria de los extractos con acetogeninas es mayor para *Sclerotium sp* y *Fusarium* (muestras aisladas de jitomate, ciruela y gladiola). Para reportar estos resultados, los Alumnos diseñaron gráficas y tablas comparativas.

Tabla 1

Efecto del extracto de acetogeninas sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos en estudio	
Hongos Fitopatógenos	% de inhibición.
Fusarium sp Gladiola Blanca	19.82
Rhizotocnia solani	78.19
Phoma sp	82.23
Alternaria sp	85.0
Sclerotium rolfsii	87.7
Sclerotium sp	91.46
Fusarium sp Ciruela Mexicana	96.25
Fusarium sp Jitomate	97.04

La especie *Fusarium oxysporum f. sp Gladioli* resultó particularmente “resistente” a extractos bioactivos ensayados en trabajos previos, como un extracto de ajo en etanol, rico en eugenol. Tampoco hubo la inhibición esperada con los metabolitos de guanábana, por lo que representa la única especie en estudio que no se vió afectada..

Se muestra a continuación el crecimiento diferencial entre el testigo (izquierda) y un cultivo con acetogeninas:

Figura 7 a)



b)



Figura 7. Cultivo de *Fusarium* sp en medio APD a) Testigo b) Cultivo en presencia del extracto bioactivo.

Se determinó el diámetro como parámetro de crecimiento del micelio en los cultivos testigo y con sustancias bioactivas. En la siguiente figura se observa que el hongo *Fusarium* aislado de jitomate y ciruela, (además de *Sclerotium sp*), resultó inhibido por el extracto de *Annona muricata*, a tal grado que su desarrollo fue mínimo, casi nulo.

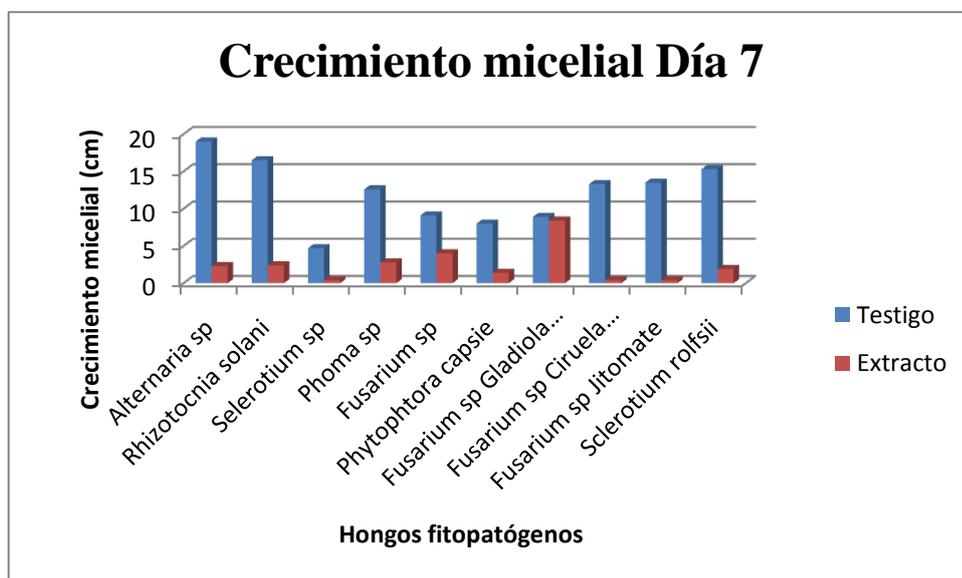


Figura 8. Comparación del crecimiento de hongos expuestos respecto a los testigos.

Los alumnos realizaron otras pruebas estadísticas que hace evidente el efecto, utilizando al menos 2 referentes estadísticos (y prueba de Tukey), otro aspecto relevante del diseño experimental. Los resultados se pueden apreciar mejor desde un diseño integral:

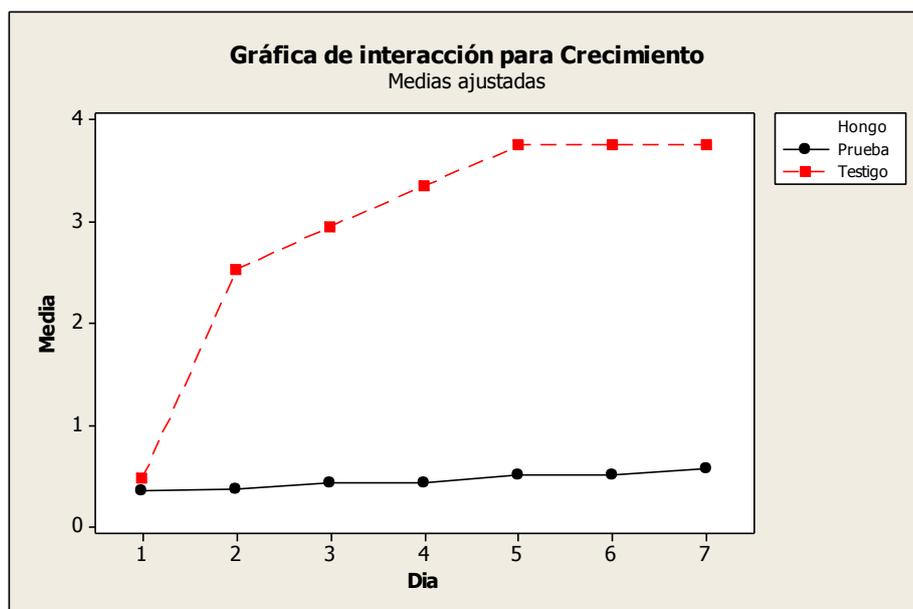


Figura 9. Crecimiento comparativo. Los hongos expuestos al extracto no logran un desarrollo micelial. Aun pasados 7 días.

Conclusión

El aprender haciendo para servir a la sociedad dentro de una Universidad pública y en tiempos en que el acceso al mercado de trabajo es difícil, es una vía para

- Ayudar a los estudiantes a hacer significativo su conocimiento.
- Motivarles para dedicar el esfuerzo necesario al estudio de experiencias educativas tradicionalmente “difíciles” como la Química, Bioquímica y Estadística, por las habilidades que reclaman: memoria de un lenguaje propio, capacidad de abstracción (fórmulas y modelos químicos) y creatividad (habilidad para relacionar conceptos abstractos).

- Desarrollar habilidades para trabajo en laboratorio experimental, que les serán requeridas en la vida profesional.
- Relacionar los aprendizajes universitarios con las demandas sociales.
- Iniciarles en las futuras demandas de la vida profesional.

Bibliografía

Domínguez-Martínez, Verónica G., Mariano Martínez Vázquez, Enrique Colar Gómez, José Atzin García and Fabián L. Chimalpopoca. 2001. Pupicidal activity of annonacin for *Aedes aegypti* (L.). (Diptera: Culicidae). Folia Entomológica Mexicana 42(3):349.358.

Domínguez Martínez Verónica G., Andrés Andrade Domínguez, Abigail Trejo Hernández, Norma A. Coria Gil, Mariano Martínez Vázquez. 2011. Las acetogeninas, ¿más que inhibidores del transporte electrónico? En: González Esquinca, Alma Rosa, Lorena Mercedes Luna-Cázares, Javier Gutiérrez-Jiménez, María Adelina Schlie-Guzmán y Dolores Guadalupe Vidal López (Coordinadores). Anonáceas. Plantas antiguas, estudios recientes. UNICACH. Pp475-496.

Hernández Meneses, Juan. Evaluación *in Vitro* de la actividad antifúngica de extractos de semilla de guanábana (*Annona muricata*) sobre el desarrollo de algunos hongos fitopatógenos. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Octubre 2011

Ortega Jiménez R, Veronica G. Domínguez Martínez, Marina Guevara Valencia 2009. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos en cormos de gladiola (*Gladiolus sp*) con extractos de semillas de guanábana (*Annona muricata*). Congreso de Investigación de AcademiaJournals.com: 37-43 (ISSN1948-2353)