



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

---

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**Determinación del perfil de metabolitos secundarios  
de un hongo endófito septado oscuro**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

**Sandra Franco Romero**

Matrícula

2143061707

ASESORES

Dr. Facundo Rivera Becerril

Dra. Martha Adriana Leyte Lugo

Ciudad de México

17 de Marzo de 2020

## Índice

I.	Introducción	1
II.	Revisión de literatura	2
	1. Hongos endófitos septados oscuros	2
	2. Hongos ESO en jales	2
	3. Metabolitos secundarios	3
	4. <i>Alternaria alternata</i>	5
	5. Metabolitos secundarios producidos por <i>A. alternata</i>	5
III.	Objetivos	8
IV.	Metodología	8
	1. Identificación molecular	9
	2. Experimento	10
	3. Identificación micro y macromorfológica	10
	4. Extracción de metabolitos secundarios	10
	5. Métodos cromatográficos	11
V.	Resultados	11
	1. Identificación molecular	11
	2. Descripción morfológica	11
	3. Perfil de metabolitos secundarios	13
VI.	Discusión	14
	1. Crecimiento de <i>A. alternata</i> en tratamientos	14
	2. Perfil de metabolitos secundarios de <i>A. alternata</i>	14
VII.	Conclusiones	16
VIII.	Literatura citada	16

## Resumen

Dentro de la comunidad de microorganismos endófitos de raíz, se encuentran los hongos endófitos septados oscuros (ESO). Los hongos ESO mantienen una estrecha relación con su planta hospedera mediante la producción de metabolitos secundarios y la modificación de mecanismos de defensa vegetal. Lo anterior incide positivamente en la sobrevivencia de ambos organismos en condiciones de estrés ambiental, por ejemplo, en presencia de metales. Desde una perspectiva biotecnológica, los hongos ESO producen compuestos bioactivos útiles para la síntesis de fármacos y agroquímicos. El objetivo de esta investigación fue identificar las modificaciones en el perfil de metabolitos secundarios de *Alternaria alternata* en presencia de Pb. *A. alternata* fue identificado molecularmente según la amplificación por PCR y secuenciación del segmento ITS. Se cultivó en papa-dextrosa-agar (PDA) y en medio modificado Melin-Norkrans adicionados con 400 mg/l de Pb, a 25°C, pH 6, durante siete días. La extracción de metabolitos se realizó mediante un proceso de maceración con acetato de etilo como disolvente; se analizó el perfil por cromatografía en capa fina y por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). En ambos medios de cultivo se detectaron cinco metabolitos con tiempos de retención (rt) de 5.83, 17.54, 22.59, 24.04 y 29.64 minutos, aunque varió su abundancia relativa en cada medio. Adicionalmente, se observó un metabolito con rt de 21.53 minutos sólo en PDA en presencia y en ausencia de Pb. La comparación de los espectros de masas de los diferentes metabolitos con los contenidos en la base de datos NIST2008 indicó una coincidencia del 97.1% del componente con rt de 22.59 minutos con el ftalato de bis (2-etilhexilo), el metabolito con mayor abundancia relativa, descrito previamente como antimicrobiano. En conclusión, el perfil metabólico de *A. alternata* varió entre medios de cultivo y la abundancia relativa fue modificada por el Pb. Por lo menos dos metabolitos constituyen un nuevo registro de metabolitos secundarios producidos por *A. alternata*.

**Palabras clave:** *Alternaria alternata*, Hongo endófito septado oscuro, Metabolitos secundarios, Plomo.

## I. Introducción

Dentro de la comunidad de los microorganismos endófitos de raíz se encuentra un grupo de hongos que por sus características morfológicas son denominados hongos endófitos septados oscuros (ESO). Estos hongos están presentes en la mayoría de los ecosistemas terrestres y pueden cohabitar o no con los hongos micorrízicos (Heredia *et al.*, 2014). Existe una estrecha relación entre el endófito y su planta hospedera; el hongo es capaz de producir metabolitos secundarios y modificar los mecanismos de defensa vegetal, lo que incide positivamente en la sobrevivencia de ambos organismos en condiciones particulares de estrés ambiental como la contaminación edáfica por metales pesados (Sánchez *et al.*, 2013). Asimismo, desde una perspectiva biotecnológica, los hongos ESO tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos útiles para el desarrollo de fármacos y agroquímicos potenciales (Tapiero, 2001). Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, a partir del cultivo del hongo *Penicillium notatum*, hasta la actualidad, existen numerosos antecedentes de metabolitos secundarios aislados de cultivos de hongos que fueron de enorme relevancia para la industria farmacéutica (Gallardo, 2009). Por ello, es importante continuar con estudios del perfil metabólico de los hongos ESO para contribuir con el conocimiento de los mecanismos de defensa, y para la obtención de diversos metabolitos bioactivos de interés biotecnológico (Sánchez *et al.*, 2013). Algunos hongos ESO permiten que especies vegetales puedan sobrevivir bajo condiciones de estrés, como la contaminación edáfica presente en los desechos mineros o jales, al reducir la toxicidad de los metales pesados (Beltrán y Gómez, 2016). El micelio de los hongos tiene la capacidad de secuestrar metales y de prevenir la translocación a los vegetales, disminuyendo la disponibilidad de los elementos tóxicos en el suelo (Moyano *et al.*, 2010)

El hongo ESO aislado para este estudio fue *Alternaria alternata*, procedente del interior de raíces de *Asphodelus fistulosus*, una especie vegetal presente en desechos mineros liberados a cielo abierto. La presente investigación tuvo como objetivo estudiar el perfil metabólico de un hongo endófito septado oscuro aislado de un jal antiguo abandonado en Vetagrande, Zacatecas.

## **II. Marco teórico**

### **1. Hongos endófitos septados oscuros**

Los hongos endófitos septados oscuros (ESO) pertenecen a un grupo misceláneo del filo Ascomycota, poseen hifas melanizadas septadas que colonizan tejidos internos de la raíz sin causar efecto negativo en la planta huésped. Están presentes en ambientes extremos, como en suelos secos y en áreas de alta y baja temperatura. Presentan capacidades enzimáticas que incluyen celulasas, amilasas, proteasas, lacasas y pectinasas, entre otras, lo que sugiere el potencial que poseen para acceder a detritos ricos en carbono, nitrógeno y fósforo (Tamayo, 2017).

Los hongos ESO pueden facilitar la toma de nutrimentos por la planta en algunos ambientes naturales o bajo condiciones experimentales controladas. Este grupo de hongos se ha asociado con aproximadamente 600 especies de plantas en todo el mundo, inclusive en plantas no micorrizadas. Por su gran abundancia y por el amplio intervalo de hospederos que colonizan en sitios bajo condiciones extremas, se cree que cumplen una función importante en el ecosistema, como favorecer la tolerancia o resistencia vegetal a esas condiciones (Tamayo, 2017).

Los hongos ESO contribuyen con la protección de su hospedero contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales, entre otros), por medio de tres mecanismos: uno directo, a través de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo; un mecanismo indirecto que consiste en la inducción o en el incremento de la expresión de vías de defensa químicas o fisiológicas intrínsecas a su planta hospedera; y, finalmente, una estrategia ecológica, que se lleva a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo o depredación (Sánchez *et al.*, 2013).

### **2. Hongos ESO en jales**

La minería es una de las actividades económicas de mayor tradición en México. Sin embargo, esta industria ha generado por décadas una gran cantidad de desechos mineros o jales, los cuales pueden ser definidos como lodos residuales originados durante el proceso de beneficio del mineral económicamente aprovechable (Gómez *et al.*, 2010). Los jales se caracterizan por carecer de materia orgánica y otros elementos necesarios para la vida como el nitrógeno y el fósforo, evitando que pueda desarrollarse la microbiota que contribuiría con mantener una superficie fértil favorable para la sucesión vegetal (Delfín y Durán, 2008). Existen microorganismos

que juegan un rol vital en la transformación de elementos traza, incluidos los metales, ya que afectan su biodisponibilidad y remediación, pueden alterar la toxicidad, solubilidad en agua y la movilidad del elemento (Beltrán y Gómez, 2016). Los microorganismos modifican la concentración de metales pesados en el ambiente a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para remover metales en solución. Un ejemplo de ello son los hongos que desempeñan un papel relevante en el ciclo de los bioelementos, en especial en sistemas forestales; influyen positivamente en la estructura del suelo mediante la creación de microagregados de las partículas del suelo, con lo que mejoran la aireación y la porosidad. El micelio de los hongos tiene la capacidad de secuestrar metales pesados bioasimilables y prevenir la translocación a los vegetales, disminuyendo la disponibilidad de los elementos en el suelo. Es decir, los hongos reducen la toxicidad del metal para su planta hospedera al unir los iones a su pared celular o al rodearlos con polisacáridos, lo que contribuye con la sobrevivencia de la planta en la zona contaminada (Moyano *et al.*, 2010; Beltrán y Gómez, 2016).

### **Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios no se sintetizan a partir de las principales vías metabólicas de los organismos; son compuestos que poseen estructura química muy diferente a los metabolitos primarios como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos (Tapiero, 2001; Torrenegra y Baquero, 2000). De acuerdo con Tapiero (2001), la distinción entre compuestos primarios y secundarios se ha basado en gran medida en el conocimiento sobre su función y distribución en la naturaleza. Los metabolitos primarios tienen una función conocida en la estructura celular, en el metabolismo energético y en la regulación del metabolismo, o son intermedios en su biosíntesis y están ampliamente distribuidos en los organismos. Los metabolitos secundarios se caracterizan por tener una distribución taxonómicamente restringida; una síntesis por enzimas específicas a partir de genes específicos; una compartimentación de precursores, enzimas, productos intermedios; un control biosintético por regulación de la dosificación y actividad enzimática; y la expresión como un aspecto de la especialización, diferenciación y desarrollo celular (Tapiero, 2001).

Las plantas y los hongos se encuentran entre los mejores productores de metabolitos secundarios. En las últimas décadas los hongos han generado un gran interés debido a que producen una gran variedad de metabolitos secundarios con propiedades

biológicas de interés para el hombre como antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos, antioxidantes y antiinflamatorios (Tapiero, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2000). Estos microorganismos tienen la capacidad para sintetizar y producir un amplio y diverso intervalo de moléculas orgánicas de relativo bajo peso molecular (Gallardo, 2009). Actualmente la mayoría de los grupos de investigación que trabajan con productos naturales producidos por hongos se centran en sus aplicaciones farmacéuticas, en sus roles como micotoxinas y en sus multifacéticas funciones ecológicas. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 a partir del hongo *Penicillium notatum*, hasta la actualidad, existen numerosos antecedentes de metabolitos secundarios aislados de cultivos de hongos que fueron de enorme relevancia para la industria farmacéutica (Gallardo, 2009). Otro ejemplo es el taxol, metabolito empleado en el tratamiento de cáncer de ovario y de mama, que inicialmente se aisló de la especie vegetal *Taxus brevifolia*, y que actualmente se puede obtener de los hongos *Alternaria*, *Aspergillus* y *Fusarium solani* (Sánchez *et al.*, 2013). También existen metabolitos secundarios producidos por hongos que son útiles contra plagas y enfermedades de cultivos, que no dañan el ambiente y la salud humana; ejemplo de ello son las destruxinas empleadas contra insectos y las leucinostatinas con actividad antibacteriana (Borges *et al.*, 2010).

Para que un metabolito secundario se produzca deben suministrarse al hongo los nutrimentos necesarios durante su fermentación (Torrenegra y Baquero, 2000). La producción de un metabolito en específico puede ser significativamente alterado mediante la optimización de las condiciones del cultivo, como la concentración de los nutrimentos, la temperatura y el pH del medio y el tiempo de incubación (Borges *et al.*, 2010).

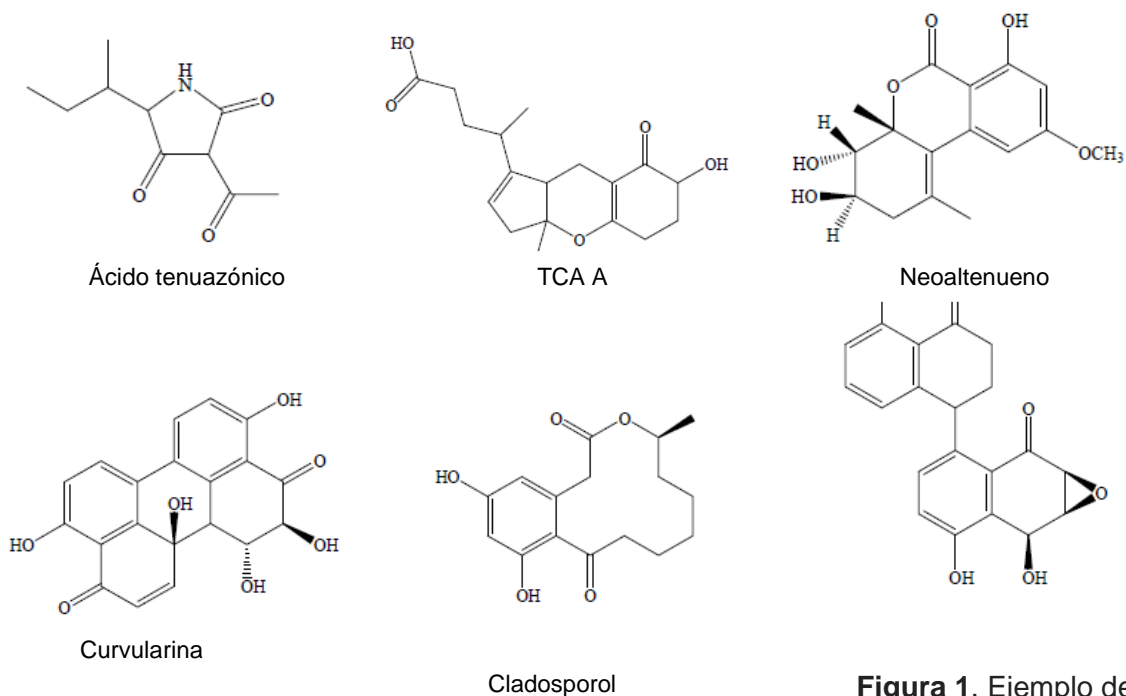
### ***Alternaria alternata***

*Alternaria* es un género fúngico muy común, que comprende numerosas especies saprófitas, endófitas y patógenas ampliamente distribuidas en el suelo y en la materia orgánica en descomposición. Las especies del género *Alternaria* sintetizan más de 70 metabolitos secundarios tóxicos para las plantas (fitotoxinas), algunos de los cuales afectan también a personas y animales, por lo que se consideran micotoxinas. Este género es considerado uno de los principales causantes de alergias humanas, es decir, que la mayoría de los metabolitos secundarios reportados para este género son toxinas (Pavón *et al.*, 2012).

*Alternaria alternata* es una especie cosmopolita que se encuentra como saprófito, endófito o fitopatógeno en un amplio intervalo de hospederos (Andersen *et al.*, 2001; Carrillo, 2003). Este hongo presenta un micelio de color oscuro, conidios grandes, alargados y oscuros, o bien multicelulares en forma de pera con septos tanto transversales como longitudinales (Carrillo, 2003; Agrios, 2005). Sus hifas son septadas con color. Los conidios se desprenden rápidamente, lo que permite que sean transportados por corrientes de aire. Sus colonias tienen el aspecto de terciopelo o gamuza, son de color blanco grisáceo al inicio, con el tiempo se vuelven de color negro con un borde blanco grisáceo, y al reverso son de color negro (Ramjagathesh y Ebenezar, 2012; Agrios, 2005).

### Metabolitos secundarios producidos por *Alternaria alternata*

Los metabolitos secundarios producidos por *A. alternata* se pueden agrupar en varias categorías que incluyen compuestos que contienen nitrógeno, esteroides, terpenoides, pironas (pironas), quinonas y fenólicos, entre otros (Figura 1). En la tabla 1, se describen más de 70 metabolitos secundarios que han sido reportados para esta especie; en su mayoría son fitotoxinas y micotoxinas.



**Figura 1.** Ejemplo de metabolitos secundarios de *A. alternata*.

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados para *A. alternata* (Lou *et al.*, 2013).

Tipo de metabolito	Metabolito secundario	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)
--------------------	-----------------------	-----------------	------------------------



Compuestos que incluyen nitrógeno	Fumonisina B <sub>1</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub>	721.8
	Piropeno	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO	59.1
	Toxina ACT I	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>10</sub>	525.6
	Toxina ACT II	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>9</sub>	509.6
	Toxina AS-I	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	390.4
	Toxina AK I	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	413.5
	Toxina AK II	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	399.4
	Ciclo-(Pro-Ala)	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	168.2
	Ciclo-(L-Leu- <i>trans</i> -4-hidroxi-L-Pro)	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	226.3
	Ciclo-(S-Pro-R-Val)	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>8</sub>	507.6
	Ciclo-(Pro-HomoLeu)	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	224
	Ciclo-(Pro-Phe)	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	244.3
	Maculosina	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	260.3
	Ciclo-(L-Pro-L-Tyr)		
	Ciclo-(L-Phe- <i>trans</i> -4-hidroxi-L-Pro)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	260.3
	Ciclo-(L-Ala- <i>trans</i> -4-hidroxi-L-Pro)	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	184.2
	Toxina AM I	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	445.5
	Toxina AM II	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	415.5
	Toxina AM III	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	431.5
	Uridina	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	244.2
Adenosina	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	267.2	

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados para *A. alternata* (continuación) (Lou *et al.*, 2013; <sup>1</sup>Fernández, 2015).

Tipo de metabolito	Metabolito secundario	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)
Compuestos que incluyen nitrógeno	Paclitaxel = Taxol	C <sub>47</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>14</sub>	853.9
	Tentoxina (TEN)	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	414.5
	<sup>1</sup> Ácido tenuazónico (TeA)	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	197.2
Esteroides	Ergosterol	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	396.6
	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O	392.6
	Ergosta-4,6,8(9),22-tetraen-3-ona	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O	392.6
	Ergosta-7,24(28)-dien-3-ol	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O	398.7
Terpenoides	Bicicloalternareno 1	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	364.5
	Bicicloalternareno 11	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	378.5
	Bicicloalternareno 2	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.5
	Bicicloalternareno 3		
	Toxina ACTG A	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.5
	Bicicloalternareno 4	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	350.4
	Bicicloalternareno 10	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	378.5
	Bicicloalternareno 5	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	378.5
	Bicicloalternareno 8	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.5
	Bicicloalternareno 9		
	Toxin ACTG B	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.5
	Bicicloalternareno 6	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	350.4
	Bicicloalternareno 7	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	378.5
	Tricicloalternareno 1a	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.5
	Tricicloalternareno 1b	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.5
Tricicloalternareno 11a	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	362.5	

Tricicloalternareno 11b	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	362.5
Tricicloalternareno 2a	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	346.5
Tricicloalternareno 2b	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	346.5
Tricicloalternareno 3a	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	330.5
Tricicloalternareno 3b	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330.5
Toxin ACTG G		
Tricicloalternarenal	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.5
Tricicloalternareno 4a	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	344.5
Tricicloalternareno 4b	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	344.5
Tricicloalternareno 10b	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	360.5
Tricicloalternareno 5a	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	344.5
Tricicloalternareno 5b	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	344.5
Tricicloalternareno 8a	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	346.5
Tricicloalternareno 9b	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330.5
Tricicloalternareno 6a	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	364.5
Tricicloalternareno 7a	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	378.5
Tricicloalternareno 7b	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	378.5
Tricicloalternareno A	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.5
Tricicloalternareno B	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	378.5
Tricicloalternareno C	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348.4
Tricicloalternareno D	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	390.5
Tricicloalternareno E	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	364.5

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados para *A. alternata* (continuación) (Lou *et al.*, 2013; <sup>2</sup>Pavón *et al.*, 2012).

Tipo de metabolito	Metabolito secundario	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)
Piranonas	Alternariol 9-metil éter (AME)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272.2
	Djalonensona		
	<sup>2</sup> Alternariol (AOH)	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	258.2
	<sup>2</sup> Altenueno (ALT)	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	292.3
	Isoaltenueno	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	292.3
	4'-Epialtenueno	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	294.3
	5'-Epialtenueno	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	292.3
	Neoaltenueno	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	292.3
	Rubrofusarina B	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	286.3
	Fonsecina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.3
	Fonsecina B	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	304.3
	Aurasperona A	C <sub>32</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	570.5
	Aurasperona B	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	606.6
	Aurasperona C	C <sub>31</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	592.5
	Aurasperona F	C <sub>31</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	574.5
Quinonas	Alterperilenol	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	350.3
	Dihidroalterperilenol	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	352.3
	Stemfiperilenol	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	352.3
	6-Epi-stemfitriol	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	368.3
	<sup>2</sup> Alertoxina I (ATX-I)	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	352.3
	<sup>2</sup> Alertoxina II (ATX-II)	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	350.3
	<sup>2</sup> Alertoxina III (ATX-III)	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	348.3
	Alterlosina I	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	366.3
	Alterlosina II	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	368.3
	Alteichin	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	350.3
	Fenólicos	Curvularina (CURV)	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>
<sup>2</sup> Altenusina		C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.3
Diversos metabolitos	Toxina AF I	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	440.5
	Toxina AF II	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	324.4
	Toxina AF III	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	424.5
	Cladosporol	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	352.3

	Toxina AAL TB	C <sub>25</sub> H <sub>47</sub> O <sub>9</sub>	505.6
	<sup>2</sup> Toxina ACR	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	354.4

### III. Objetivo

Estudiar el perfil de metabolitos secundarios de un hongo endófito septado oscuro aislado de raíces de *Asphodelus fistulosus* creciendo en un suelo minero.

### IV. Metodología

Para este estudio se eligió como hongo endófito septado oscuro un aislado de *Alternaria alternata*, procedente del interior de raíces de la planta *Asphodelus fistulosus* colectada en el Jal Viejo ubicado en Vetagrande, Zacatecas, en las coordenadas 22°50'27"N y 102°33'14"W (Flores *et al.*, 2016).

#### 1. Identificación molecular

La identificación molecular del hongo ESO se hizo con base en una amplificación mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del ITS del ADN ribosomal. El ITS es la región diana más estudiada en hongos debido a que está muy conservada dentro de este grupo, lo cual permite diseñar iniciadores específicos para su amplificación (Llorens *et al.*, 1997). Para ello se obtuvo micelio fresco del hongo ESO a partir de cultivos en medio PDA natural, incubados durante siete días a 25°C en la oscuridad. El DNA fúngico se extrajo con base en el método CTAB (Girlanda *et al.*, 2002) para ser utilizado como molde para la PCR con los iniciadores específicos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White, 1990), que amplifican la región ITS1-5.8S-ITS2 ADNr. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador MaxyGene Gradient (E.E.U.U.); la mezcla de reacción tuvo un volumen de 50 µl con 34 µl de agua destilada estéril, 2 µl de DNA total, 1 µl de cada iniciador (ITS1, ITS4, ITS5) a 1 µg ml<sup>-1</sup>, 5 µl de MgCl<sub>2</sub> a 25 nM, 5 µl del amortiguador 10x, 1 µl de dNTP's y 1 µl *Taq* DNA polimerasa (ThermoScientific). El programa de amplificación fue: desnaturalización inicial a 95°C/10 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C/1 min, hibridación a 55°C/1 min, una extensión inicial a 72°C/1 min y una extensión final a 72°C/7 min. El producto de la PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio y las bandas amplificadas fueron visualizadas en un transiluminador bajo luz UV. Los productos de la PCR se purificaron con el kit DNA Clean&Concentrator (ZymoResearch, E.E.U.U.) y fueron secuenciados en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la

FES-IZTACALA, UNAM. La secuencia del amplicón fue sometida a un análisis BLAST en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para determinar su identidad y cualquier relación potencial con secuencias existentes de hongos ESO.

## **2. Experimento**

El experimento consistió en el cultivo del hongo ESO en cuatro tratamientos, durante siete días, con un pH 6.0 y a 25°C:

- a) medio de cultivo sólido papa-dextrosa-agar (PDA) en ausencia de plomo (PDA sPb).
- b) medio de cultivo sólido papa-dextrosa-agar (PDA) con una concentración de 400 mg/l de plomo (PDA cPb).
- c) medio sólido Melin-Norkrans modificado (MMN) en ausencia de plomo (MMN sPb).
- d) medio sólido Melin-Norkrans modificado (MMN) con una concentración de 400 mg/l (MMN cPb).

Los medios de cultivo fueron preparados con soluciones madre de tampón fosfato (0.2 M de fosfato sódico monobásico y 0.2 M de fosfato sódico dibásico), para mantener el pH a 6.0 durante el periodo de crecimiento del hongo. Una mayor disponibilidad de metal en el medio de cultivo se logra a pH ácido.

## **3. Identificación micro y macromorfológica**

Se realizó la descripción micro y macromorfológica del hongo ESO con un microscopio binocular marca Nikon, en laminillas teñidas con azul de algodón. La observación microscópica se hizo con los objetivos 10x y 40x, consultado literatura especializada de Samson *et al.* (1984) y Ramjegathesh y Ebenezar (2012).

## **4. Extracción de metabolitos secundarios**

La extracción de metabolitos secundarios se realizó mediante un proceso de maceración utilizando acetato de etilo (AcOEt) como disolvente. La extracción se realizó a partir de seis cajas de cultivo por tratamiento: una vez transcurrido el tiempo de crecimiento, se cortó el agar con hongo en cubos y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 300 ml de AcOEt durante 20 min con agitación y temperatura

ambiente. Se filtró el sobrenadante sobre sulfato de sodio anhidrido, para posteriormente eliminar el disolvente con un rotavapor.

## **5. Métodos cromatográficos**

Los análisis de cromatografía en capa fina (TLC) se llevaron a cabo en placas de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílica gel 60 F254 Merck). La visualización de placas se realizó con una lámpara de luz UV (onda corta 254 nm; onda larga 356 nm) y como agentes cromógenos se utilizaron sulfato cérico y yodo. El análisis e identificación de metabolitos secundarios se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), con un equipo Trace™ Gas Chromatograph marca THERMOFISHER SCIENTIFIC y con un detector másico ISQ Single Mass Spectrometer.

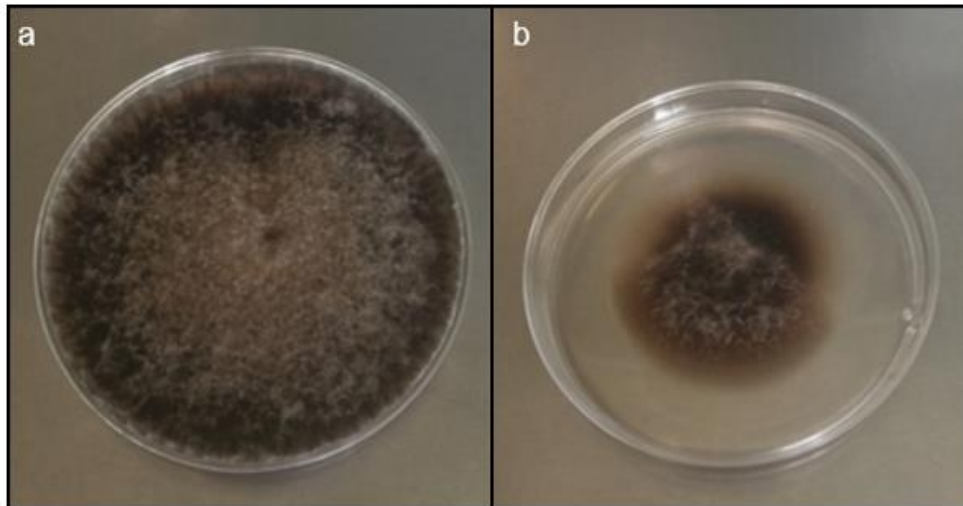
## **V. Resultados**

### **1. Identificación molecular**

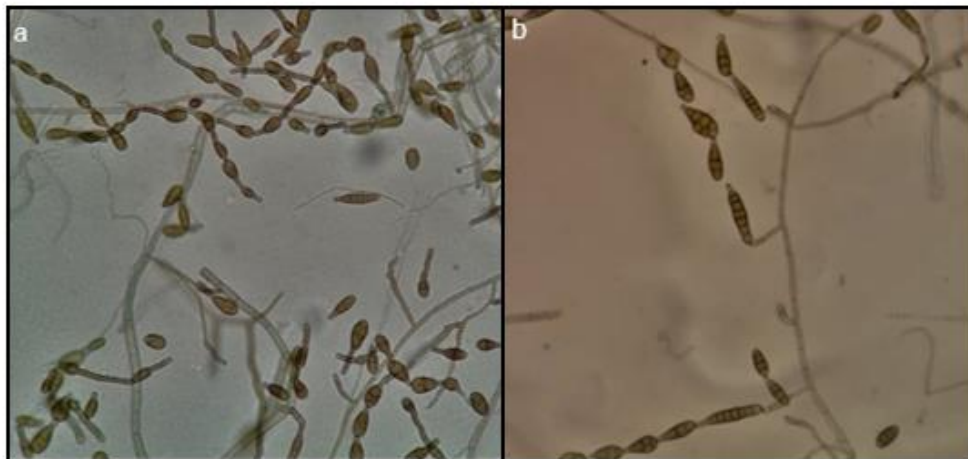
Al compararse la secuencia del segmento ITS con las secuencias del GenBank del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), la secuencia mostró una identidad del 100% con el hongo *Alternaria alternata*.

### **2. Descripción morfológica**

Las colonias fúngicas en los cuatro tratamientos se observaron de color marrón negruzco, con un micelio parcialmente superficial y con aspecto de terciopelo, de acuerdo con Carrillo (2003) y Ramjagathesh y Ebenezar (2012), como se aprecia en la figura 2.



**Figura 2.** Morfología de *A. alternata* a 16 días de incubación: a) medio PDA, b) medio MMN. La micromorfología del hongo ESO en presencia y en ausencia del metal pesado no mostró diferencias notables (Figuras 2 y 3). En coincidencia con Samson *et al.* (1984) y Ramjegathesh y Ebenezar (2012), esta especie presenta conidióforos simples, tabicados y en el extremo forma cadenas largas que pueden ser ramificadas de conidios multiformes de color café pardo, con septos transversales y verticales. Sus hifas son septadas con color. Tales características se observaron en todos los tratamientos.



**Figura 3.** Micromorfología de *A. alternata*: a) medio PDA, b) medio MMNcPb.

El crecimiento radial del hongo ESO a siete días de incubación fue distinto en cada tratamiento (Tabla 2). Se mostró el mayor crecimiento con  $5.26 \text{ cm} \pm 0.09$  de diámetro en el medio PDA en ausencia de plomo. En el medio MMN el crecimiento radial fue

inferior y alcanzó  $1.7 \text{ cm} \pm 0.12$  de diámetro (Figura 2). Los hongos en presencia del plomo mostraron un diámetro menor.

**Tabla 2.** Crecimiento radial de *A. alternata* en cada tratamiento al día siete de incubación.

Tratamiento	Promedio del diámetro (cm $\pm$ ES; $n = 6$ )
PDA sPb	$5.26 \pm 0.09$
PDA cPb	$4.93 \pm 0.24$
MMN sPb	$1.75 \pm 0.12$
MMN cPb	$1.5 \pm 0.41$

### 3. Perfil de metabolitos secundarios

El peso de los extractos metabólicos obtenidos en cada tratamiento a que fue sometido el hongo se encuentra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Pesos de extractos obtenidos en cada tratamiento.

Extracción	Peso (mg)
PDA sPb	15.4
PDA cPb	4.6
MMN sPb	13.8
MMN cPb	7.3

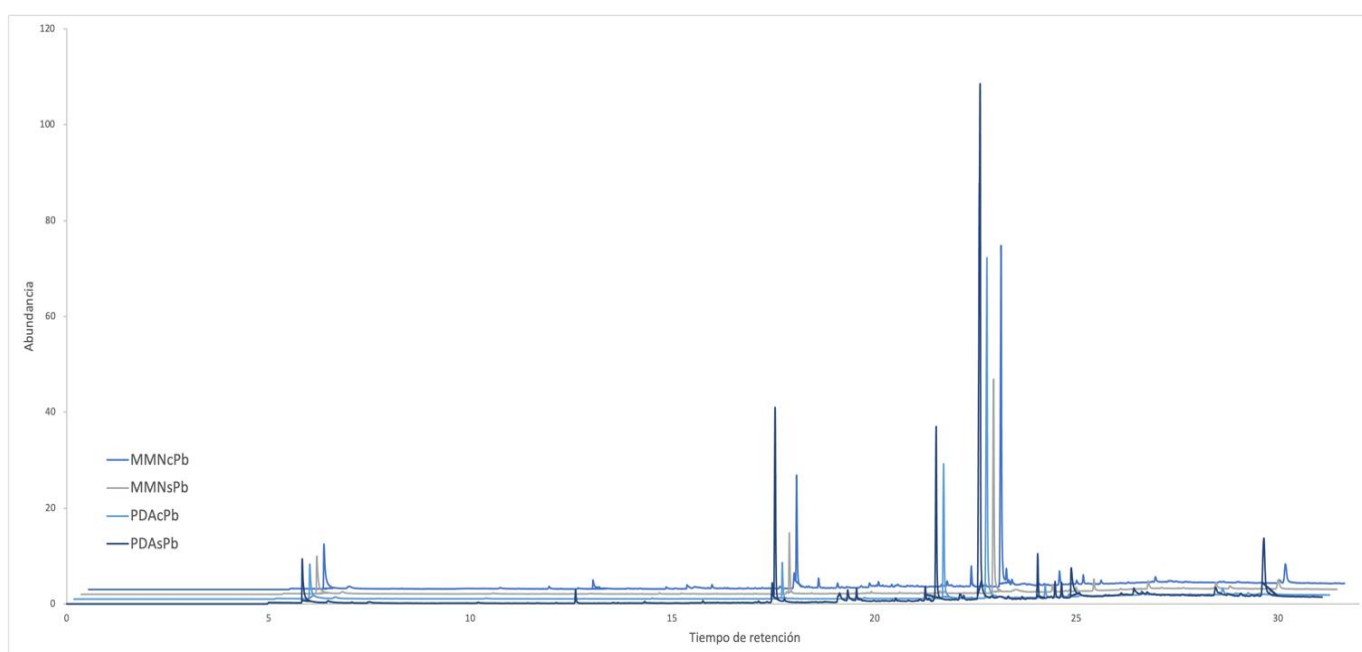
El análisis de los datos de CG-EM (Tabla 4), indicó la abundancia relativa de once metabolitos secundarios (Figura 4), de los cuales nueve se detectaron en el tratamiento PDA sPb, siete en PDA cPb, ocho en MMN sPb y siete en MMN cPb. Cinco de los metabolitos con mayor abundancia estuvieron presentes en los cuatro tratamientos con un tiempo de retención (rt) de 5.83, 17.54, 22.61, 24.04 y 29.64.

**Tabla 4.** Abundancia relativa de metabolitos secundarios fúngicos en los tratamientos

Tiempo de retención (min)	PDA sPb (%)	PDA cPb (%)	MMN sPb (%)	MMN cPb (%)
5.83	9	10	18	13
12.60	3	-	-	-
17.46	4	-	-	-
17.54	38	11	29	33
21.53	34	39	-	-

22.61	100	100	100	100
24.04	10	4	5	6
24.87	7	4	5	6
25.05	-	-	8	-
26.42	-	-	6	6
29.64	13	3	6	8

El metabolito secundario con rt de 12.61 minutos (Figura 4) únicamente se registró en el tratamiento PDA en ausencia de Pb (PDA sPb). De acuerdo con la comparación de los espectros de masas obtenidos con los contenidos en la base de datos NIST2008, existió una coincidencia del 98.9% del componente con el 2,4-Di-tert-butilfenol.



**Figura 4.** Perfil cromatográfico de los cuatro tratamientos de *A. alternata*.

El metabolito con rt de 22.61 minutos registró la mayor abundancia relativa en todos los tratamientos. De acuerdo con la comparación de los espectros de masas obtenidos con los contenidos en la base de datos NIST2008 (análisis de los datos de CG-EM), existió una coincidencia del 97.1% del componente con el ftalato de bis (2-etilhexilo).

El resto de los metabolitos secundarios no fueron identificados debido a que no están contenidos en la base de datos NIST2008, o porque pudiese tratarse de metabolitos hasta ahora no descritos.



## VI. Discusión

Las características coloniales y micromorfológicas permitieron identificar en forma preliminar el hongo como miembro del género *Alternaria*. Esta identificación inicial fue confirmada molecularmente con la secuencia del segmento ITS hasta el nivel de especie. *Alternaria alternata* ha sido ampliamente descrito como hongo endófito presente en ambientes extremos (Andersen *et al.*, 2001; Carrillo, 2003).

### 1. Crecimiento de *A. alternata* en los diferentes tratamientos

El análisis del crecimiento radial del hongo en cada medio de cultivo, a los siete días de incubación, permitió observar un mayor crecimiento en medio PDA a diferencia del MMN. Resultados semejantes se han reportado en diferentes estudios, por ejemplo, también en el caso de los hongos *Suillus granulatus* y *Lactarius deliciosus* (Murrieta *et al.* 2014; Chávez *et al.*, 2015), lo que se atribuye a que el medio PDA contiene una mayor cantidad de nutrimentos en comparación con el MMN. Murrieta *et al.* (2014) mencionan que el medio PDA es un mejor sustrato para el crecimiento fúngico debido a que es un medio rico en almidón, por lo que se sugiere utilizar para el aislamiento de hongos, mientras que el medio MMN se recomienda para su mantenimiento o para pruebas de micorrización ya que contiene una menor cantidad glucosa, lo que facilita la asociación hongo-planta.

El hongo ESO *A. alternata* en presencia de Pb no mostró diferencias significativas en la morfología ni en el crecimiento radial con respecto al testigo sin Pb. Ezzouhri *et al.* (2009) mencionan que *A. alternata* mostró resistencia al Pb a concentraciones de 1.89 a 3.75 mg/l y 15.6 a 17.8 µg/g; su crecimiento estuvo débilmente inhibido en presencia del metal. Por ello, puede considerarse como un hongo con un alto nivel de resistencia al Pb y es un candidato potencial para investigaciones con respecto a su capacidad para eliminar metales pesados de aguas residuales contaminadas (Ezzouhri *et al.*, 2009; Cardenas *et al.*, 2010).

### 2. Perfil de metabolitos secundarios de *A. alternata*

El perfil metabólico de la especie mostró diferencias mínimas en los cuatro tratamientos; se observó que la presencia de Pb en los medios de cultivo PDA y MMN modificó la producción, pero principalmente la abundancia relativa de ciertos metabolitos secundarios. Es decir, las condiciones de estrés como la presencia de un metal pesado o la baja o alta cantidad de nutrimentos en el medio cultivo modificaron

el perfil de metabolitos secundarios de *A. alternata*. Este comportamiento también se observó en el hongo endófito del mismo Phylum, *Penicillium chrysogenum*, cultivado en presencia de zinc a 1,200 y 1,400 mg/l, en donde el metal tuvo un efecto positivo en la producción de antibióticos y un efecto negativo en la producción de micotoxinas con excepción de la neoxalina (Sánchez *et al.*, 2013; Bourzama *et al.* 2019). Asimismo, *Aspergillus parasiticus* cultivado con  $\text{Cd}^{2+}$  a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , mostró un aumento en su crecimiento radial y un aumento en la síntesis del compuesto versicolorín (Kumar *et al.*, 2019).

En el caso de *A. alternata*, únicamente en ausencia de Pb en PDA (PDA sPb) se observó la producción del metabolito secundario 2,4-di-tert-butilfenol (2-4 DTBP). Kontham *et al.* (2015) demostraron mediante ensayo de difusión de disco que el 2-4 DTBP, un compuesto orgánico volátil, tiene actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium chrysogenum*, además de que en ensayos *in vivo* evitó el crecimiento de estas especies en granos de trigo. Podría postularse que la producción de 2-4 DTBP en los desechos mineros reduciría la competencia entre *A. alternata* y otros micromicetos del ambiente por la colonización vegetal. Este metabolito es de interés particular para la conservación de productos alimenticios a base de granos o cereales donde los hongos son la causa más importante de contaminación y deterioro. Asimismo, se reportó que el 2,4-DTBP presenta actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer (HeLa) (Kontham *et al.* 2015).

A su vez, el compuesto ftalato de bis (2-etilhexilo) (DEHP) mostró la mayor abundancia relativa en todos los tratamientos con y sin Pb. Este metabolito secundario es un éster de ácido ftálico que se ha producido sintéticamente y se ha utilizado como plastificante en muchos materiales; debido a su uso prolongado, se clasifica como contaminante con algunos riesgos para la salud humana. Sin embargo, en los últimos años, se ha reportado que este compuesto es producido por plantas y microorganismos (bacterias u hongos), por lo que también se trata de un metabolito natural con actividades biológicas (Ortiz y Sensinenea, 2018). De acuerdo con Momen *et al.* (2018) el ftalato de bis (2-etilhexilo) expresa una alta actividad antifúngica contra *Candida albicans* (zona de inhibición = 20 mm), y también exhibe una alta actividad antimicrobiana contra *Sarcina lutea*, una bacteria Gram positiva (zona de inhibición = 23 mm). Lo anterior también sugiere que el ftalato de bis (2-etilhexilo) liberado tanto

en sustratos contaminados como en no contaminados con Pb, reduciría la competencia entre *A. alternata* y bacterias del ambiente por la colonización vegetal. Este metabolito también muestra eficacia citotóxica contra líneas celulares de carcinomas humanos como cáncer de mamá y cáncer de hígado (Momen *et al.*, 2018).

En este trabajo se reporta por vez primera la liberación de los metabolitos secundarios 2,4-Di-*tert*-butilfenol y ftalato de bis (2-etilhexilo) por *A. alternata* y por el género *Alternaria*. El aislamiento de estos dos metabolitos y la investigación de sus efectos mediante diferentes bioensayos permitiría conocer su actividad potencial como compuestos antimicrobianos. Por último, es de resaltar la producción de otros metabolitos, no identificados aún durante la presente investigación, por el hongo *A. alternata* bajo las condiciones de cultivo aquí presentadas. Podría tratarse de metabolitos nuevos, relevantes en la tolerancia del hongo en presencia de Pb, y con potencial en desarrollos biotecnológicos.

## **VII. Conclusiones**

El perfil metabólico de *A. alternata* mostró coincidencias y diferencias entre el PDA y el MMN; el Pb modificó la abundancia relativa de los metabolitos. Los dos metabolitos identificados por CG-EM (2,4-Di-*tert*-butilfenol y ftalato de bis (2-etilhexilo)) constituyen un primer reporte para la especie *A. alternata* y podrían estar involucrados en la inhibición de otros microorganismos para reducir su competencia en desechos mineros contaminados con Pb; asimismo, tienen potencial bioactivo para la industria farmacéutica y agroquímica. Además, es pertinente mencionar que el análisis por CG-EM muestra otros metabolitos secundarios que sería importante identificar.

## **Perspectivas**

En próximos estudios se requiere identificar la estructura química del resto de metabolitos secundarios obtenidos en este estudio para ser registrados en la base de datos del perfil metabólico de la especie. Asimismo, se sugiere aislar los compuestos para someterlos a pruebas de bioensayo y conocer más sobre su potencial bioactivo.

## **VIII. Referencias**

Agrios G. (2005). Plant pathology. Quinta edición. Elsevier Academic Press. New York. 922p.

Andersen B, Kroger E y Roberts G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105, 291-299.

Beltrán P. y Gómez R. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 12 (2), 172-197.

Borges D., Díaz A., San Juan A. y Gómez E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de Azúcar Cuba (ICIDCA)* 44 (3), 49-55.

Bourzama G., Ennaghea N., Soumati B., Benoune S. y Atriche N. (2019). Effect of zinc metal at high concentration on secondary metabolic pathways in *Penicillium chrysogenum* strain. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences* 9(2), 307-313.

Brizuela M., García L., Pérez L. y Mansur M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 15, 69-74.

Cárdenas G., Moctezuma Z. y Acosta R. (2010). Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes Ríos de la Huasteca Potosina. *Revista Académica de Investigación TLATEMOANI*, 1.

Carrillo L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Cuarta edición. Argentina. 130.

Castillo U. y Durán-de-Bazúa C. (2006). Las micotoxinas: metabolitos secundarios de los hongos filamentosos. *Educación Química* 12(2), 122-128.

Chávez D., Pereira G. y Machuca Á. (2015). Crecimiento in vitro de *Lactarius deliciosus* en medio de cultivo BAF y MNM. Universidad de Concepción. Laboratorio

de Biotecnología de Hongos. Departamento Forestal, Campus Los Ángeles, Los Ángeles, Chile.

Delfín A. y Durán-de-Bazúa M. (2008). La microbiota presente en un desecho minero, como opción de restauración de jales. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, Desarrollo y Práctica* 1 (4), 1-9.

Ezzouhri L., Castro E., Moya M., Espinola F. y Lairini K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 3(2), 035-048.

Fernández V. (2015). Identificación y caracterización de grupos de especies de *Alternaria* y *Pithomyces* asociados a enfermedades del trigo en Argentina. Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Flores T., Vela C., Chimal H., Salas L. y Rivera B. (2016). Plantas invasoras y nativas se asocian con hongos del suelo para tolerar niveles tóxicos de metales pesados en sustratos mineros, Encuentro Académico del Día del Biólogo, UAM-Xochimilco, Ciudad de México.

Gallardo G. (2009). Aislamiento y determinación estructural de metabolitos bioactivos con potencial aplicación en apicultura y agricultura a partir de cultivos de hongos. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Girlanda M., Ghignone S. y Luppi A. (2002). Diversity of sterile root-associated fungi of two Mediterranean plants. *New Phytologist* 155, 481-498.

Gómez B., Armienta María A. y Morton Bermea O. (2010). Plantas de sitios contaminados con desechos mineros en Taxco, Guerrero, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 87, 131-133.

Gutiérrez S., Casqueiro J. y Martín J. F. (2000). Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 17, 854-860

Heredía A., Alarcón A., Hernández C., Ferrera C. y Almaraz S. (2014). Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Botanical Sciences* 92 (3), 321-333.

Kontham K., Leena D., Ganesan S., Sulochana P. Ashok P. y Kesavan M. (2015). 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. *International Journal of Food*, 211, 44-50.

Kumar D., Meena, Aamir, Zehra y Sanmukh (2019). Regulation and role of metal ions in secondary metabolite production by microorganisms. In: *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, Chapter 19, Elsevier, United States of America, 259-269.

Leyte-Lugo, Figueroa M., Gonzáles M., Glenn E., Gonzáles A. y Mata R. (2013). Metabolites from the entophytic fungus *Sporormiella minimoides* isolated from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 96, 273–278.

Llorens V., Martín M.P. e Hidalgo E. (1997). PCR: Una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrícicos. *Revista Catalana de Micología* 20, 187-198.

Lou J., Fu L., Peng Y. y Zhou L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18, 5891-5935.

Momen M., Hossan H., Mona H. y Ahmed O. (2018). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(2018), 263-269.

Moyano A., García S., Fernández T. y Charro E. (2010). Metales pesados en hongos de áreas contaminadas. *Revista de Ciencias Agrarias* 33(1), 13-21.

Murrieta H., Noa C. y Mata R. (2014). Effect of culture medium on development of *Suillus granulatus* (L.) Roussel and *S. Brevipes* (Pk.) Kuntze. Nota científica. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(19), 101-107.

Noriega L., Morales R., Luna Q., Ulloa V., Cruz J. Serafín M. y Gutiérrez O. (2016). Identificación de especies vegetales asociadas a jales del distrito minero de Guanajuato. *Acta Universitaria* 26 (NE-2), 71-77.

Noriega L. B., Morales R. A., Luna Q. R., Ulloa V. T., Cruz J. G., Serafín M. A. y Gutiérrez O. N. (2016). Identificación de especies vegetales asociadas a jales del distrito minero de Guanajuato. *Acta Universitaria* 26 (2), 71-77.

Ortiz A. y Sansinenea E. (2018). Di-2-ethylhexylphthalate may be a natural product, rather than a pollutant. *Hindawi Journal of Chemistry*, 2018, 7.

Pavón M, González A., Martín de Santos R. y García L. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria* 27(6), 1772-1781.

Ramiegathest R. y Ebenezar E. (2012) Morphological and physiological characters of *Alternaria alternata* causing leaf blight disease of onion. *International Journal of Plant Pathology*, 3(2), 34-44.

Rothen C. (2015). Hongos endófitos septados en raíces de *Glycine max*: diversidad, caracterización y estudio de la interacción. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Samson A., Hoekstra E. y Van Oorschot C. (1984). Introduction to food-borne fungi. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Segunda edición, Países bajos, 185-186.

Sánchez F., Sánchez O., Sandoval E., Ulloa B., Armendáriz G., García M. y Macías R. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos

con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16 (2), 132-146.

Solórzano A., Aguilar M. y Noriega L. (2016). Aislamiento y caracterización de microorganismos nativos de muestras de suelos contaminados con residuos mineros. *Revista de Divulgación Científica: Jóvenes en la Ciencia* 2 (1), 522-526.

Tamayo L. (2017). Papel de hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia del pasto *Brachiaria decumbens* Stapfa condiciones ambientales extremas de sequía y baja fertilidad general del suelo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias Medellín, Colombia.

Tapiero L. (2001). Importance of plant and fungal secondary metabolites in plant diseases. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 3 (2), 24-30.

Torrenegra R., y Baquero J. (2000). Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Penicillium* spg 28. aislada del Páramo de Guasca. Departamento de Cundinamarca. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.

White T., Bruns T., Lee S. y Taylor J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to methods and applications*, Academic Press, Inc., Nueva York, 315-322.