

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

## **HIPERPARASITISMO DE *Cladosporium* sp. SOBRE *Puccinia horiana* Henn. Y SU IMPACTO EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA ROYA BLANCA DEL CRISANTEMO**

**DAVID EDUARDO TORRES SÁNCHEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2015**

La presente tesis titulada: Hiperparasitismo de *Cladosporium* sp. Sobre *Puccinia horiana* Henn. y su impacto en el control biológico de la roya blanca del crisantemo, realizada por el alumno David Eduardo Torres Sánchez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

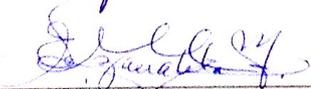
MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez

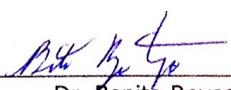
ASESOR

  
Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESOR

  
Dra. Patricia Guevara Fefer

ASESOR

  
Dr. Benito Reyes Trejo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2015

# RESUMEN

## HIPERPARASITISMO DE *Cladosporium* sp. SOBRE *P. horiana* Henn. Y SU IMPACTO EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA ROYA BLANCA DEL CRISANTEMO

David Eduardo Torres Sánchez, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2015

Los objetivos del presente trabajo fueron, determinar la identidad de las especies de *Cladosporium* sp. asociadas a *Puccinia horiana*, así como determinar su tipo de interacción mediante diversas aproximaciones, con la finalidad de esclarecer su potencial dentro del control biológico de la roya blanca del crisantemo. Mediante un enfoque integrado, basado en el análisis de caracteres moleculares y morfológicos, se llegó a la identificación de los antagonistas *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* y *C. delicatulum*, asociados a *P. horiana*. Los aislamientos se detectaron por primera vez en pústulas de roya blanca contaminados, colectados en un invernadero comercial en Villa Guerrero, México. Sólo *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* fueron asociados estadísticamente a *P. horiana*, siendo *C. delicatulum* un invasor secundario.

Se estudiaron las interacciones entre los antagonistas *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* con la roya blanca del crisantemo mediante microscopía óptica y electrónica *in vitro*. *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* crecieron sobre las teliosporas y en las células esporógenas de la roya blanca, aunque no se produjo la penetración directa de teliosporas. Las tres *Cladosporium* spp. fueron capaces de crecer en medios con laminarina, lo que sugiere la producción de glucanasas, crecimiento ausente cuando se utilizó la quitina como única fuente de carbono. El contacto con *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, daña la estructura y citoplasma de la teliospora, posiblemente debido a mecanismos de antibiosis. El micelio de los antagonistas se cultivó en un medio de cultivo particular, se filtró y se extrajo con disolventes orgánicos. Los extractos orgánicos crudos y las fracciones obtenidas, inhiben la germinación de teliosporas de la roya blanca a las 48 h. Aunque en *Botrytis cinerea*, las fracciones sólo redujeron el crecimiento a las 24 h, la actividad se redujo a 48h y de 72 h. Este es el primer reporte de antagonismo por *C. pseudocladosporioides*, *C. cladosporioides* sobre *Puccinia horiana*. Los antagonistas reducen la producción y la viabilidad de teliosporas y por lo tanto, potencialmente se podrían utilizar para el control biológico de la roya blanca del crisantemo.

# ABSTRACT

## HYPERPARASITIC *Cladosporium* sp. STRAINS AGAINST *P. horiana* Henn., AND ITS IMPACTS ON THE BIOLOGICAL CONTROL OF THE CHRYSANTHEMUM WHITE RUST.

David Eduardo Torres Sánchez, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2015

The goals of this work were the identification of *Cladosporium* sp. strains associated to *Puccinia horiana*, and therefore describes its interaction by different approaches, with the explicit purpose of determine its role in the biological control of the chrysanthemum white rust. An integrated approach, based on the analysis of both molecular and morphological characters, has led to the unambiguous detection and identification of the rust associated antagonists *Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* and *C. delicatulum* from teliospores of the chrysanthemum white rust fungi *P. horiana*. The three associated fungi were first detected from contaminated field-collected rust pustules from a commercial greenhouse in Villa Guerrero, Mexico. Only *C. cladosporioides* and *C. pseudocladosporioides* were statistically associated with *P. horiana*, but *C. delicatulum* could be a secondary invasor.

Interactions between the antagonists *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* and the chrysanthemum white rust were studied through light and electron microscopy in vitro at the host–parasite interface. *C. cladosporioides* and *C. pseudocladosporioides* grew towards the white rust spores and on the sporogenous cells, did not occur direct penetration of teliospores. Enzyme production by the antagonists was suggested by the loosening of the matricial components of the fungal wall. The three *Cladosporium* spp. were able to grow on media containing laminarin, suggesting the ability of producing glucanases, but not when chitin was used as the sole carbon source. On contact with both *C. cladosporioides* and *C. pseudocladosporioides*, teliospore cytoplasm and structure was damaged, possibly due to antibiosis mechanisms. Mycelia of antagonists had been grown on a particular medium filtered, and extracted with organic solvents. The crude organic extracts and purified fractions, inhibit teliospore germination on white rust at 48 h, but on *Botrytis cinerea*, fractions only reduced growth at 24 h, activity was decreased at 48h and 72 h. This is the first report of antagonism by *C. pseudocladosporioides*, *C. cladosporioides* on *Puccinia horiana*. The antagonists reduced the production and viability of teliospores and, therefore, could potentially be used for biological control of chrysanthemum white rust

A mi madre, porque gracias a ella soy todo lo que soy y a ella le debo haber logrado esto.

Te amo.

A mi padre, por enseñarme que todo es posible, que la suerte no cae del cielo y que no hay nada que no se consiga con amor, dedicación y esfuerzo. Esto es un logro tuyo también.

A mis hermanos Karla y Carlos... porque el cielo es el límite  
y ustedes volarán más alto que yo.

A mis abuelitos Virginia, Mario, Carmen y Jacinto, porque buena parte de lo que soy y hasta donde he llegado se los debo a ustedes, a su cariño y enseñanzas.

A mis tíos y tías, porque gracias a sus motivaciones, cariño y reprimendas,  
hoy he llegado aquí.

A todos aquellos que como yo, compartimos el mismo gusto, los mismos sueños y en ocasiones los mismo desvelos. En particular a Minely, Daniel, Paul, Eridani, Alejandra y Mirna. Mi estancia en El Colpos no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A todos aquellos que han compartido mi felicidad, mis logros, mis decepciones y mis frustraciones. En particular a mi segunda familia: Marcela, Melissa, Alejandra A., Nadia, Alberto y Pili. No lo hubiera logrado sin ustedes, esto también es suyo.

# AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez, por hacerme ver mis aciertos y sobre todo mis tropiezos, por la confianza depositada en mí y por apoyarme en todos los aspectos posibles para la culminación de éste capítulo académico de mi vida.

A la Dra. Patricia Guevara Fefer, por apoyarme en todo lo posible y por abrirme una vez más las puertas de su laboratorio. Pero sobre todo, por alentarme a no desistir de éste camino, por darme palabras de ánimo cuando el cielo estaba cada vez más oscuro y por impulsarme a sonreír no importando lo pedregoso y sinuoso del camino.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía, por ser ese estímulo intelectual de curiosidad y sobre todo, de rigor académico. Igualmente por sus importantes observaciones para la mejora del presente manuscrito.

Al Dr. Benito Reyes Trejo, por cuestionarme e impulsarme a dar el extra en mi vida académica, así como por sus valiosas observaciones para el mejoramiento del presente manuscrito.

A la Dra. G. Judith Márquez Guzmán, por el apoyo incondicional desde mis estudios de licenciatura, por hacerme siempre un espacio en su agenda, por escucharme y darme esos consejos que sólo las angiospermas son capaces de otorgar.

Igualmente al Dr. René Cardenas, a la M.C. Mónica K. Pérez Pacheco y a la M.C. Verónica Muñoz Ocotero, de la Facultad de Ciencias, UNAM; por todas sus atenciones, paciencia y apoyo técnico otorgado para la realización de mi trabajo de investigación.

A la Dra. Carolina Pérez Martínez, por todo su apoyo, tiempo y asesoría durante mi estancia en el Instituto de Fitosanidad. Igualmente por sus acertadas correcciones del capítulo II del presente manuscrito.

Al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, en especial a la Biol. Yolanda Hornelas Orozco, por su ayuda en el procesamiento y observación del material en el Microscopio Electrónico de Barrido. Así mismo, al Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM, en especial a la M. en F.P. Ana Isabel Bieler Antolín por su ayuda en la toma de fotografías.

A la Dra. Gemma Assante de la Universidad de Milán, Italia, por el apoyo incondicional que me otorgó en un país en el que me encontraba completamente sólo, sin hablar una pizca de su lengua. Por hacer siempre un esfuerzo para estar presente, por darme palabras de apoyo e inspiración para continuar por este camino sin importar lo necesario y por demostrarme que las barreras oceánicas no existen.

Al Dr. Giovanni Venturini, a la Dra. Silvia Toffolati y a la Dra. Paola Campia, por todo el apoyo, tiempo y dedicación que me prestaron, a pesar del momento difícil en el que llegué a sus vidas. Su amistad, las enseñanzas del laboratorio y la manera correcta de preparar un buen café, los llevaré por siempre.

Así mismo a la Dra. Sabrina DallaValle, por recibirme en su laboratorio en la Universidad de Milán, Italia y a la Dra. Loana Musso del mismo laboratorio, por apoyarme en todo lo necesario durante mi estancia en Italia.

Al Dr. Salvatore Moricca y a la Dra. Beatrice Ginnetti de la Universidad de Florencia, Italia por permitirme aprender un poco de su experiencia y reservarse un pequeño tiempo para compartir su laboratorio y unas buenas pláticas.

A la Sra. Fernanda Riva y al Sr. Gabrielle Rho... e tutta la sua bellissima famiglia italiana!

A todos aquellos que cruzamos el camino, a los que están y a los que se fueron. Gracias.

# CONTENIDO

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	IX-X

## **CAPÍTULO I. Introducción: La Roya Blanca del Crisantemo y el Control**

<b>Biológico.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>La floricultura y el crisantemo.....</b>	<b>2</b>
El cultivo del crisantemo.....	4
Problemas fitosanitarios en la producción de crisantemo.....	6
La roya blanca del crisantemo.....	7
Biología.....	7
Sintomatología.....	9
Epidemiología.....	10
Manejo.....	11
El control biológico de enfermedades.....	12
<b>Referencias.....</b>	<b>15</b>

## **CAPÍTULO II. Especies del género *Cladosporium* Link asociadas a *Puccinia horiana* Henn. en Villa Guerrero, Estado de México.....**

<b>Introducción.....</b>	<b>22</b>
<b>Revisión de Literatura.....</b>	<b>23</b>
<i>Cladosporium</i> asociado a otros hongos.....	24
<i>Cladosporium</i> asociado a <i>Puccinia horiana</i> .....	25
<b>Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>29</b>
Colecta.....	29
Aislamiento.....	29
Identificación morfológica y cultivo.....	29

Obtención de ADN y amplificación por PCR.....	30
Análisis y filogénia.....	30
Prueba de antagonismo.....	31
<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO III. Antagonismo de <i>Cladosporium</i> sp. contra <i>Puccinia horiana</i> Henn.....</b>	<b>50</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>50</b>
<b>Revisión de Bibliografía.....</b>	<b>51</b>
Mecanismos de acción en asociaciones micofílicas de hongos.....	51
Mecanismos de acción en asociaciones micofílicas de <i>Cladosporium</i> sp.....	53
<b>Objetivos.....</b>	<b>55</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>55</b>
Colecta.....	55
Pruebas de parasitismo <i>in vitro</i> .....	55
Degradación de quitina y $\beta$ -glucanos.....	56
<b>Resultados.....</b>	<b>57</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>64</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>70</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO IV. Actividad de los metabolitos secundarios de especies de <i>Cladosporium</i> antagonicas de <i>Puccinia horiana</i> Henn.....</b>	<b>80</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>80</b>
<b>Revisión de Bibliografía.....</b>	<b>81</b>
Función de los metabolitos secundarios en hongos.....	82
Química de <i>Cladosporium</i> .....	83
<b>Objetivos.....</b>	<b>88</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>88</b>

Producción de extractos orgánicos de <i>Cladosporium</i> sp.....	88
Fraccionamiento de los extractos orgánicos.....	88
Actividad biológica contra <i>Puccinia horiana</i> .....	89
Actividad biológica contra <i>Botrytis cinerea</i> , como modelo.....	90
Análisis de datos.....	90
<b>Resultados</b> .....	<b>91</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>98</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>103</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>104</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>115</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>116</b>

# INDICE DE CUADROS

## CAPÍTULO II

**Cuadro 2.1.** Especies de *Cladosporium* s. str. reportadas en asociación con otros hongos (Dugan *et al.*, 2004; Heuchert *et al.*, 2005 y Bensch *et al.*, 2012).....**26**

**Cuadro 2.2.** Cuadro 2.2. Iniciadores utilizados para la amplificación de la región ITS1-5.8 ADNr-ITS2 y regiones parciales de actina y de factor de elongación, sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Morelos).....**30**

## CAPÍTULO IV

**Cuadro 4.1.** Medio de cultivo (CL) utilizado para la producción de los extractos orgánicos de *Cladosporium cladosporioides* (DETSC1A y DETSC1B) y *C. pseudocladosporioides* (DETSC03).....**89**

**Cuadro 4.2.** Rendimiento de los extractos orgánicos de las diferentes especies/cepas de *Cladosporium* a partir de **1L** de medio de cultivo líquido.....**91**

**Cuadro 4.3.** Rendimiento del total de las fracciones obtenidas a partir de los diferentes extractos orgánicos (**600 mg**) de ambas especies de *Cladosporium*.....**93**

**Cuadro 4.4.** CI<sub>50</sub> de las cinco diferentes fracciones obtenidas de ambas especies de *Cladosporium*, en contacto con diferentes *P. horiana* y *B. cinerea*.....**96**

# INDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

<b>Figura 1.1.</b> Comparativa entre la producción y valor de las principales flores de corte en México, con datos del 2013 (SIAP, 2014).....	2
<b>Figura 1.2.</b> Comparación de la superficie sembrada de hectáreas de crisantemo en los seis estados productores de México, datos del 2013 (SIAP, 2014).....	4
<b>Figura 1.3.</b> Ciclo de vida de la Roya Blanca del Crisantemo.....	9

## CAPÍTULO II

<b>Figura 2.1.</b> Morfología del conidióforo y conidios de especies de <i>Cladosporium</i> aisladas a partir de <i>P. horiana</i> .....	32
<b>Figura 2.2.</b> Morfología de las colonias de <i>Cladosporium</i> aisladas en asociación con <i>P. horiana</i> , con tres medios de cultivo diferenciales.....	33
<b>Figura 2.3.</b> Análisis filogenético de las especies de <i>Cladosporium</i> asociadas a <i>Puccinia horiana</i> . .....	35
<b>Figura 2.4.</b> Porcentaje de parasitismo de las diferentes especies y aislamientos de <i>Cladosporium</i> en pústulas de <i>Puccinia horiana</i> .....	38
<b>Figura 2.5.</b> Parasitismo de diferentes especies y aislamientos de <i>Cladosporium</i> en pústulas de <i>Puccinia horiana</i> .....	38

### CAPÍTULO III

<b>Figura 3.1.</b> Controles positivos y negativos de la interacción entre <i>Cladosporium</i> sp. con <i>P. horiana</i> . .....	<b>57</b>
<b>Figura 3.2.</b> Ausencia de antagonismo entre <i>C. delicatulum</i> (DETSC02) y <i>P. horiana</i> . .....	<b>58</b>
<b>Figura 3.3.</b> Interacción entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> DETSC1A con <i>Puccinia horiana</i> . .....	<b>59</b>
<b>Figura 3.4.</b> Interacción entre <i>Cladosporium cladosporioides</i> DETSC1B con <i>Puccinia horiana</i> . .....	<b>60</b>
<b>Figura 3.5.</b> Interacción entre <i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (DETSC03) y <i>Puccinia horiana</i> . .....	<b>62</b>
<b>Figura 3.6.</b> Crecimiento de los diferentes aislamientos de <i>Cladosporium</i> sp. en agar suplementado con diferentes fuentes de carbono a los 15 días en oscuridad.....	<b>63</b>
<b>Figura 3.7.</b> Micrografías electrónicas de pústulas de <i>P. horiana</i> obtenidas de un invernadero comercial en Villa Guerrero, Estado de México.....	<b>63</b>

### CAPÍTULO IV

<b>Figura 4.1.</b> Estructuras representativas de metabolitos secundarios aislados de <i>Cladosporium</i> sp....	<b>87</b>
<b>Figura 4.2.</b> Cromatografía en capa delgada de los diferentes extractos orgánicos de <i>Cladosporium</i> con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 15:1 como fase móvil.....	<b>91</b>
<b>Figura 4.3.</b> Inhibición de la germinación de las teliosporas de <i>Puccinia horiana</i> a las 48 h, con los extractos orgánicos obtenidos a partir de medio CL, de los diferentes aislamientos de <i>Cladosporium</i> .....	<b>92</b>
<b>Figura 4.4.</b> Inhibición de la germinación de las teliosporas de <i>Puccinia horiana</i> a las 48h, en contacto con diferentes fracciones obtenidas a partir de los extractos orgánicos de los aislamientos de <i>Cladosporium</i> spp.....	<b>94</b>
<b>Figura 4.5.</b> Inhibición del desarrollo de <i>Botrytis cinerea</i> , en contacto con cinco fracciones de <i>C. cladosporioides</i> DETSC1A y <i>C. pseudocladosporioides</i> (DETSC03).....	<b>95</b>
<b>Figura 4.6.</b> Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> expresado en valores de absorbancia a 492 nm.....	<b>97</b>

“...Como no estas experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen algo de dificultad te parecen imposibles. Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades...”

El ingenioso hidalgo Don Quijote de la Mancha (adaptación)

Miguel de Cervantes Saavedra

# CAPÍTULO I

## Introducción:

# La Roya blanca del crisantemo y el control biológico

### Introducción

El crisantemo (*Chrysanthemum × morifolium*) es una de las especies ornamentales más cultivadas a nivel mundial, por lo cual sus problemas fitosanitarios se han convertido en muchos casos temas de interés internacional (EPPO, 2004; USDA-NASS, 2014). Tal vez la enfermedad más importante para el crisantemo es la roya blanca, cuya especie, *Puccinia horiana* es un agente cuarentenado en todos los países que importan las diversas variedades de crisantemo, ya sea para flor de corte, maceta o como esqueje de invernadero (Firman y Martin, 1968; EPPO, 2004; Bonde *et al.*, 2013; USDA-NASS, 2014), como tal los esfuerzos para su control han sido exhaustivos. En México, el control químico es la opción más utilizada para combatir esta enfermedad (Huerta, 2000; García-Velasco, 2007).

En la actualidad los países importadores, como E.U.A. o la Unión Europea, retan a las naciones productoras, en este caso de flores ornamentales, para reducir el uso de agroquímicos. Es por esto que, países como Colombia, el segundo productor de flores a nivel mundial, ha considerado el control biológico como una alternativa viable (van Wijk, 1994; Corredor, 1997), convirtiéndose en un componente importante del manejo de la flor. Los retos fitosanitarios que ofrece la floricultura moderna son muchos, la roya blanca del crisantemo es un ejemplo claro, el mirar a otras formas de control no convencionales, es una oportunidad en la búsqueda de soluciones sostenibles y sustentables que vayan de acuerdo con la agricultura moderna, por lo que el objetivo general del presente trabajo, es el obtener e identificar aislamientos de *Cladosporium* sp. con potencial antagonista de la roya blanca, así mismo mediante diversas aproximaciones determinar su interacción con *P. horiana* y establecer su viabilidad como agente de control biológico de la roya blanca del crisantemo.

## **La floricultura y el crisantemo**

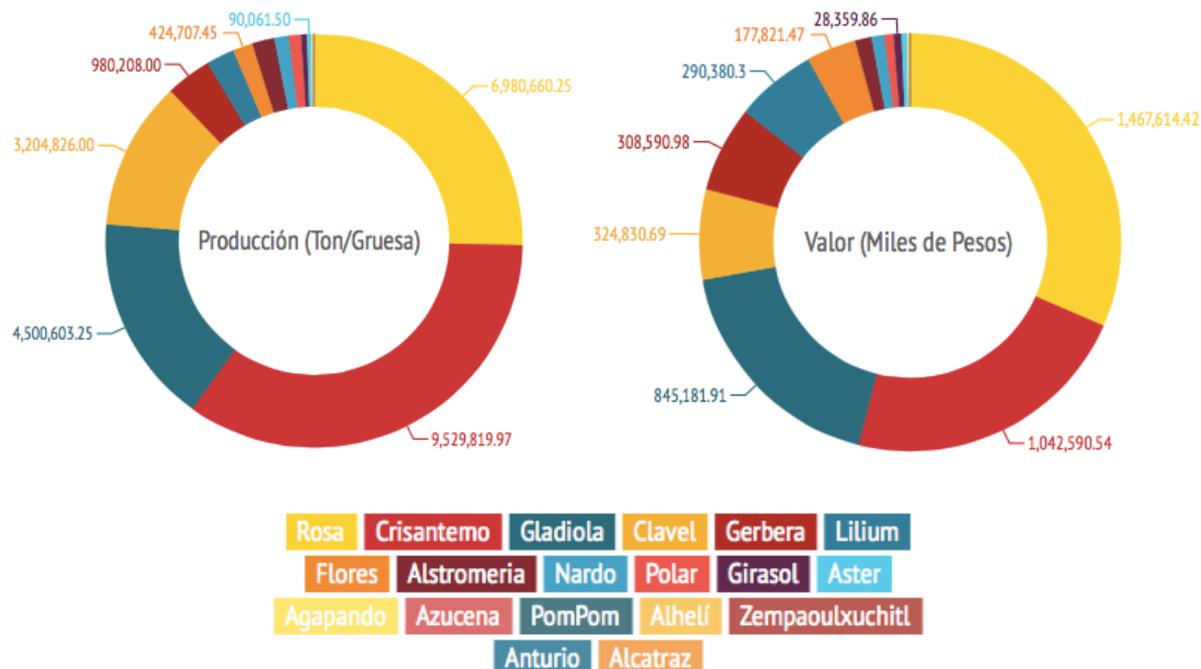
La floricultura es una de las actividades económicas más importantes y rentables a nivel mundial. En América latina los principales productores son Colombia, Costa Rica, Ecuador y México (ASERCA, 2006). Así mismo los principales importadores de flor son Canadá, Holanda, Reino Unido, Alemania y Estados Unidos, los últimos cuatro llegando a invertir 3, 427.5 millones de dólares anuales (ASERCA, 2006).

En México la producción de ornamentales genera alrededor de 3, 600 millones de pesos en cultivos como gladiolo, rosa y crisantemo (Fig. 1.1), destinándose hasta el 80% de la producción hacia consumo interno y el restante 20% hacia exportación. Los estados más importantes son: Morelos, Puebla, Guerrero, Michoacán y el Estado de México (ASERCA, 2008; SIAP, 2014), sobresaliendo el último como el mayor productor de flores a nivel nacional, con los municipios de Villa Guerrero, Tenancingo, Coatepec, Tenango del Valle y Texcoco (Rivas, 1994; Huerta, 2000; Orozco y Martínez, 2003). A pesar de éstos datos, México sólo participa en el 1% de las exportaciones internacionales a: Estados Unidos, Canadá, Japón, Alemania, España, Panamá e Italia (Orozco y Martínez, 2003; Elizondo, 2013). En 2010 estas exportaciones generaron 1, 272 millones de dólares reflejados en 25, 500 productores que ocasionaban 188 mil empleos permanentes, 50 mil eventuales y un millón de empleos indirectos (SIAP, 2014).

El crisantemo es para la floricultura nacional e internacional uno de sus productos más importantes. A nivel internacional, por mencionar un par de ejemplos, en 2008 para Holanda, el principal productor de flores en el mundo, significaban 332 millones de euros en flores de corte y 30 millones en maceta (Anon, 2009); para Estados Unidos en 2012 representaban alrededor de 14 mil millones de dólares en flor de corte, 21.5 millones en maceta y 123.6 millones en flores de jardín (USDA NASS, 2014). En el caso de México significaban en 2013, en conjunto, tanto flores de corte como en maceta, alrededor de 1,100 millones de pesos (SIAP, 2014, Fig. 1.1). Es el producto ornamental con mayor extensión sembrada en nuestro país, con 2, 364.75 Ha a cielo abierto y 102 Ha bajo invernadero con una producción total de 8, 740.82 ton, convirtiéndola en la flor número uno cultivada en México. De éstos números, el 91.82% de la superficie, el 84.1% de la producción y el 90.3%

del valor de la producción de crisantemo corresponde al Estado de México (Fig. 1.2; SEDAGRO, 2011; SIAP, 2014).

La producción de crisantemo en México, en muchas ocasiones se ve mermada por diversos problemas, desde fitosanitarios hasta socioeconómicos a los que se enfrentan los productores, tales como el desconocimiento de tecnologías postcosecha que aumenten la vida en anaquel, problemas de movilización de la flor, por ejemplo por roya blanca, problemas en la comercialización debido a los intermediarios o problemas arancelarios derivados del TLCAN (Huerta, 2000; Orozco y Martínez, 2002; Elizondo, 2013). Entonces, al ser un producto destinado sólo al mercado nacional, no se exige una calidad o cantidad constante, ya que el crisantemo en México es más valorado por el pensamiento religioso o mágico que por su estética o calidad, en consecuencia se convierte en una flor “desechable y de olvido”, que se compra para llevarla a una tumba, altar o adorno y concluido el evento se olvida o desecha (Huerta, 2000; Orozco y Martínez, 2002), por lo que muchos productores se han visto renuentes a una mayor inversión económica en la producción simplemente porque la flor no sería costeaible.



**Figura 1.1. Comparativa entre la producción y valor de las principales flores de corte en México. Datos del 2013 (SIAP, 2014).**

## El cultivo de crisantemo

Dentro de la familia Asteraceae, se encuentra el género *Chrysanthemum*, su híbrido comercial *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. (Sin. *D. grandiflora* Tzveler., *D. morifolia* Ramat. y *D. × grandiflorum* (Ramat.) Kitam), tiene su origen en China (Wu *et al.*, 2011; Davidse *et al.*, 2014). Ha sido cultivado como una hierba desde hace 3 000 años en Asia (Horst y Nelson, 1997; Hacket, 2013), es probablemente uno de los primeros cultivos ornamentales en el mundo (Boase *et al.*, 1997; Mukherjee *et al.*, 2013). Gracias a su complejidad genética, que llega a ser decaploide y su sistema de autoincompatibilidad, existe una gran diversidad de cultivares, clasificados debido a las características florales (Horst y Nelson, 1997; Ping-Li *et al.*, 2012), pocos son los reportes de selección de otras características fenotípicas, como la resistencia a enfermedades (Teixeira da Silva, 2003). A ciencia cierta, se desconoce el número preciso de cultivares con valor hortícola de crisantemo, aunque se han calculado en alrededor de 7,000 (Boase *et al.*, 1997; Mukherjee *et al.*, 2013).

El crisantemo se cultiva a partir de esquejes, que se enraízan y se trasplantan al sustrato. El ciclo de cultivo es de 90-120 días y crece eficientemente en suelos que estén compuestos por 50% sustrato, 30% agua y 20% aire, con un pH entre 6.2 y 7.0, con baja salinidad, con una humedad relativa en invernadero de 65 a 70% (ICAMEX, 2003). Es un cultivo de día corto,



**Figura 1.2. Comparación de la superficie sembrada de hectáreas de crisantemo en los 6 estados productores de México.** Datos del 2013 (SIAP, 2014). Valores en Ha.

es decir requiere de noches largas para iniciar la floración, por lo tanto 14 h de luz son necesarias para promover el crecimiento vegetativo y menos de 12 h diarias de luz inducen floración (Arbos, 1992; Huerta, 2000; ICAMEX, 2003). En cuanto a requerimientos minerales, dentro de las primeras siete semanas se requieren altas concentraciones de K y N, posteriormente en floración no se necesita fertilización intensa ya que los nutrientes se translocan directamente de las hojas hacia las inflorescencias, lo que mejora la calidad de la flor (Gutierrez, 2003; Larson, 2004). Es un cultivo que necesita una gran cantidad de agua, ya que al momento de sembrar se realiza un riego pesado con lámina de 5 cm, después durante 20 días se aplica una lámina de riego de 1-1.5 cm cada 3 días y al final del ciclo, de nuevo se aplica riego pesado, con la finalidad de darle vigor a la flor (Huerta, 2000). El cultivo es sensible a la temperatura, por lo que durante el día, en plántula son recomendables los riegos de refresco que disminuyen la temperatura de las plantas, por el contrario, para contrarrestar las heladas en muchas ocasiones es necesaria la presencia de un calefactor o encender fogatas dentro del invernadero (Boase *et al.*, 1997; Huerta, 2000). Finalmente, como manejos culturales, destacan el *pinchado* o eliminación de meristemas apicales, el *deshierbe, tutoro*, el *despate* o eliminación de follaje en los primeros 15-20 cm a partir del suelo y el *desbotone* o eliminación de botones laterales, que se realizan dependiendo del cultivar que se esté trabajando y apegados a calendarios dictados por el ciclo de cultivo, por lo que no todos éstos manejos se realizan en todos los cultivares de crisantemo (Huerta, 2000; Elizondo, 2013).

Las épocas de cosecha del crisantemo son en donde la flor presenta mayor valor comercial, por ejemplo en 1992 para el 14 de febrero se obtenía un precio por arriba del 70% sobre el valor promedio, para el 10 de mayo 30% superior al valor promedio al igual que en los primeros días de noviembre, por lo que el productor anticipaba a esas fechas la cosecha para vender su producto a buen precio (Rivas, 1994), otras fechas importantes y por las cuales se rige su cultivo son para el día de muertos, para el aniversario de la Virgen de Guadalupe o para el día de las madres (Huerta, 2000), esta tendencia se ha mantenido, siendo esas fechas las de mayor venta de crisantemo (ICAMEX, 2003). Así entonces, no existe una fecha específica de plantación de esquejes, si no que se pretende tener producción todo el año sobrelapando los ciclos de producción (Huerta, 2000), por ejemplo en Texcoco, Estado de México la mayoría de los productores obtienen dos o tres ciclos en el año (Elizondo, 2013).

## Problemas fitosanitarios en la producción de crisantemo

El cultivo de crisantemo es afectado por una amplia diversidad de plagas y enfermedades, que en consecuencia disminuyen el precio de la flor, dañan los canales de comercio y los mercados de destino del producto. Las enfermedades causadas por hongos son las más importantes, como el marchitamiento por *Verticillium albo-atrum*, que comienza con una clorosis de las hojas y termina con un marchitamiento generalizado (Alexander y Hall, 1974; Horst y Nelson, 1997; UCIPM, 2010). El follaje también se puede ver afectado por otros hongos como *Septoria obesa* y *S. chrysanthemella* e igualmente la inflorescencia puede ser invadida por *Botrytis cinerea* (Alexander y Hall, 1974; Horst y Nelson, 1997; UCIPM, 2010). En el segundo lugar, dentro de los virus y viroides, destacan el *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) que produce enanismo, reduciendo la calidad de la flor (Horst y Nelson, 1997; UCIPM, 2010; Cho *et al.*, 2013) y el *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) causando necrosis del tallo y anillos cloróticos en hojas (Ochoa-Martínez *et al.*, 1999), en total 9 virus y 2 viroides se han reportado infectando el crisantemo (Cho *et al.*, 2013). En el caso de bacterias, el tizón bacteriano por *Erwinia chrysanthemi* o *E. carotovora* es sin duda alguna de las enfermedades más destructivas, causando en casos severos pudrición blanda de los tallos y necrosis del follaje (Romero, 1996; Horst y Nelson, 1997; UCIPM, 2010). Finalmente, dentro de los nematodos, especies del género *Meloidogyne* llegan a afectar las raíces, aunque *Aphelenchoides ritzemabosi* y *A. fragariae* causan daños importantes en el follaje (Horst y Nelson, 1997; UCIPM, 2010).

Entre las plagas del crisantemo, destaca la araña roja: *Tetranychus urticae* (Romero, 1996), por su hábito polífago y la resistencia que ha desarrollado a la mala aplicación de plaguicidas (Huerta, 2000). Después de los ácaros, los insectos son el problema más fuerte (Huerta, 2000). Así, los trips (Thysanoptera: Thripidae) como *Trips tabaci* o *Frankliniella occidentalis* (Romero, 1996) provocan disminución en longitud del tallo, disminución del área foliar y manchas blanquecinas en pétalos como consecuencia de su tipo de alimentación, además de esto, son transmisores de por lo menos 4 géneros de virus (Ullman, 1996). Los áfidos (Homoptera:Aphididae) como *Macrosiphoniella sanborni* (Romero, 1996) de igual manera, causan una reducción en el crecimiento y deformación de las hojas, aunado a ser transmisores de virus como el *Chrysanthemum Mosaic Virus* (ChMV). Las mosquitas blancas (Homoptera:Aleyrodidae) llegan a ser problemas importantes, como en el caso de *Trialeurodes vaporariorum* que puede retrasar la floración, la aparición de fumagina o la transmisión de

varias especies de virus (Romero, 1996; Arbos, 1992). Finalmente, los minadores (Diptera: Agromycidae) dañan el follaje y en consecuencia el desarrollo de la planta, siendo la principal plaga *Liryomyza trifolli*, motivo de cuarentena para algunos países (Arbos, 1992).

En México, el control de estos problemas fitosanitarios respecto al cultivo de crisantemo, se vuelve complejo por las diversas limitaciones que presentan los productores, así entonces no se siguen las dosis o las aplicaciones químicas como debería de ser o se hace una mezcla de diferentes moléculas, pero con el mismo modo de acción, trayendo como consecuencia a largo plazo problemas más graves, siendo un problema multifactorial que merece ser atendido desde varios puntos de vista.

### **La roya blanca del crisantemo**

La principal enfermedad que afecta al crisantemo es la roya blanca. Detectada en México en 1992 en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México (Huerta, 2000), se reconoce su existencia desde 1895 en Japón (Hiratsuka, 1957; Horst y Nelson, 1997) y a partir de mediados del siglo pasado se ha reportado en todos los continentes (Firman y Martin, 1968), aún así el estatus epidemiológico de esta enfermedad ha sido debatido en múltiples ocasiones, ya que aunque efectivamente es reportada en casi todas las regiones de producción de crisantemo a nivel mundial (EPPO, 2004; Whipps, 1993), se encuentra clasificada a nivel internacional como patógeno de importancia cuarentenaria para la EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal), IAPSC (Consejo Fitosanitario Interafricano), CAN (Comunidad Andina) y la NAPPO (Organización Norteamericana de Protección Vegetal). Su diagnóstico tradicionalmente se ha llevado a cabo por determinación morfológica del agente causal, aunque también ya existen iniciadores específicos, para su detección en esquejes asintomáticos (Pedley, 2009; Alaei *et al.*, 2009).

### **Biología**

El agente causal, *Puccinia horiana* Hennings, pertenece a la clase Basidiomycetes, orden Uredinales (Bauer *et al.*, 2006). Es una roya microcíclica, en consecuencia sólo forma teliosporas y basidiosporas, es autoica ya que su ciclo de vida lo desarrolla por completo en el crisantemo (Firman y Martin, 1968; Hennings, 1901; Whipps, 1993) y es un hongo biotrófico,

es decir sólo permanece viable (particularmente las teliosporas) sí el tejido vegetal se encuentra vivo (Bonde *et al.*, 2015). Se encuentra relacionada filogenéticamente con las royas de cereales *P. trebouxii*, *P. boroniae* y *P. cygnorum* y no con las royas de asteráceas (Alaei *et al.*, 2009). Aunque no es la única roya que afecta al híbrido comercial del crisantemo, si es la que causa mayor daño comparada con *P. tanacetii* o *P. chrysanthemi*, las otras dos royas comunes en crisantemo (Horst y Nelson, 1997; Alaei *et al.*, 2009). Aunque Alaei *et al.* (2009) sustentan la hipótesis de que *P. tanacetii* no es un patógeno del crisantemo y que esta confusión se debe a una mala interpretación de *P. chrysanthemi* y de un nuevo clado de *Puccinia* sp.

En cuanto a la morfología de *P. horiana*, las teliosporas son en su mayoría bicelulares (hasta 5% llegan a ser tricelulares), hialinas amarillentas, de forma oblonga-clavada de 32-24 x 12-18  $\mu\text{m}$  (30-45 x 13-17  $\mu\text{m}$  en la descripción original) y con una fuerte constricción en el centro, con paredes no muy gruesas, el ápice obtuso engrosado, la base cuneiforme atenuada y con un pedúnculo hialino y consistente de 40 x 5-8  $\mu\text{m}$  (Hennings, 1901; Gonzales y Montealegre, 1981; García-Velasco *et al.*, 2002). Las basidiosporas son hialinas, por lo general binucleadas o multinucleadas generalmente dos por basidio, aunque se han reportado hasta ocho por basidio, de 14.4-7.2 x 4.8-9.6  $\mu\text{m}$  y de forma ovalada (Kapooria y Zadocks, 1973; García-Velasco *et al.*, 2002; Alaei *et al.*, 2009).

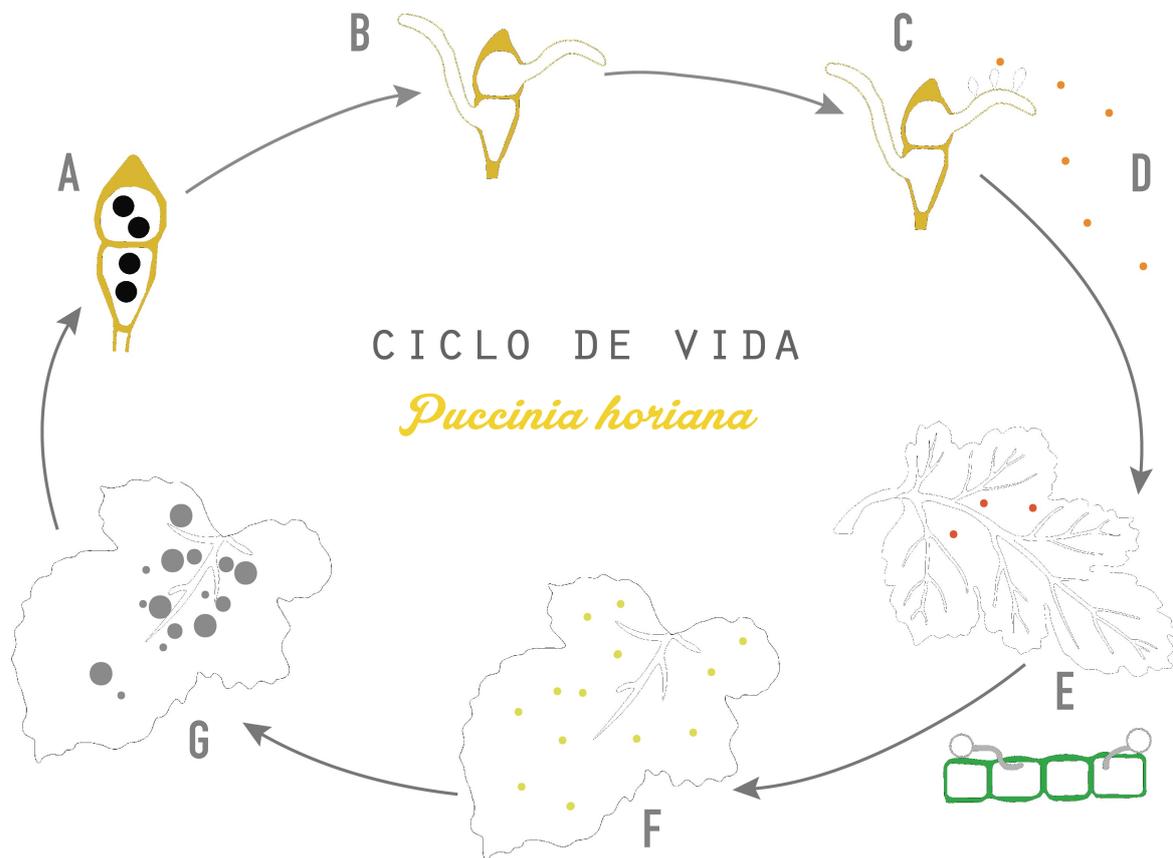
En el ciclo de vida de la roya blanca, no ocurre plasmogamia, sólo ocurre cariogamia en las teliosporas, seguida de una meiosis que da lugar a núcleos haploides distribuidos generalmente en dos basidiosporas, proceso que ocurre mientras las teliosporas están adheridas a la hoja y liberan las basidiosporas, que viajan y se adhieren por medio de microfibrillas a la cutícula, posteriormente penetra el tubo germinativo y comienza a colonizar la hoja de manera intercelular, para posteriormente formar hifas infectivas y penetrar las células del mesófilo por degradación enzimática, así mismo llega a colonizar las traqueidas, en ocasiones ocupando todo el lumen (Firman y Martín, 1968; Bonde *et al.*, 2015; Fig. 1.3).

Desde hace mucho tiempo se piensa la existencia de varias razas fisiológicas (Dickens, 1971; Whipps, 1993), Krebs (1985) y De Backer *et al.* (2011) lo confirman; para México, García-Velasco *et al.* (2007) encuentran una diferencia en virulencia y agresividad en aislamientos provenientes de las principales regiones floricultoras del país, siendo los del Estado de México

(Occidente y Oriente) los más agresivos y virulentos, dando un indicio de la presencia de tres razas en el país.

### Sintomatología

Los signos característicos de la enfermedad causada por *P. horiana* en crisantemo, son pústulas principalmente en el follaje, localizadas en el envés, en su madurez blanquecinas, antes de la maduración son de color rosa tenue y de apariencia cerosa, en cuanto a la sintomatología, en el haz se presentan manchas cloróticas que llegan a alcanzar una pulgada de diámetro y se vuelven más oscuras con el tiempo (Hennings, 1901; Whipps, 1993; Horst y Nelson, 1997). Aunque llega a afectar también la inflorescencia (Dickens, 1970). A los 7-10 días posteriores a



**Figura 1.3. Ciclo de vida de la Roya Blanca del Crisantemo.** A) Las teliosporas producidas en las pústulas llevan a cabo cariogamia, B) Germinación de las teliosporas a condiciones óptimas (17-24°C y >96% humedad relativa), C) Se forman las basidiosporas, D) Se liberan las esporas al ambiente después de 3-6 h de llevada a cabo la germinación de las teliosporas, E) Las basidiosporas caen sobre hojas sanas de crisantemo, se adhieren, germinan y penetran la epidermis foliar, F) Entre los 7 y 14 días después de la infección, se observan los primeros síntomas: manchas cloróticas en el haz de la hoja. G) Aproximadamente a los 7 días de la aparición de los síntomas, en el envés de la hoja aparecen las primeras pústulas cerosas, amarillentas a rosadas que en su madurez se tornarán blancas, las pústulas son formadas por teliosporas que así continuarán el ciclo.

la infección se comienzan a presentar las manchas cloróticas y a los 14-18 días aparecen ya las pústulas aún sin madurar (Dickens, 1990; Horst y Nelson, 1997; Leyva-Mir *et al.*, 2001; De Backer *et al.*, 2011).

### Epidemiología

Las basidiosporas de *P. horiana* son las que funcionan como propágulos efectivos, es decir son los que se liberan de la pústula, dispersan e infectan otras plantas, aunque poco se sabe sobre el modo preciso de su dispersión y la distancia que estas llegan a viajar (Zandvoort, 1968), por otro lado estas esporas son muy delicadas (Firman y Martin, 1968), por lo que la dispersión a grandes distancias, si es que existe por medios como el viento, tendría que ser mediante teliosporas y no basidiosporas. Leyva-Mir *et al.* (2001) reportan que las teliosporas, sin producir basidiosporas, son capaces de infectar el tejido vegetal, por lo que podrían fungir como esporas *efectivas*, dato que resulta interesante ya que la definición ontológica de “teliospora” es: tipo de espora en Uredinales que da origen a basidios y basidiosporas (Hiratsuka y Sato, 1982), por lo que tendría que confirmarse esa afirmación.

Para la germinación de las teliosporas es necesario como mínimo un 96% de humedad relativa, por lo menos 17°C y un tiempo óptimo de liberación de 3 h después de la inoculación, es decir no existe un periodo de dormancia, se ha comprobado que estas esporas pueden sobrevivir hasta 8 semanas a una humedad relativa de 50% en las hojarasca y sólo dos semanas si se compostea las hojas (Firman y Martin, 1968; Bonde *et al.*, 2013). En el caso de las basidiosporas hasta 90% germinan a las 2h de la inoculación con humedad libre, efecto relacionado a la sensibilidad de las esporas a la desecación, por lo que a las 2 h entre 17°C-24°C se piensa que ya se han establecido en el hospedero (Firman y Martin, 1968), aunque Leyva-Mir *et al.* (2001) reporta que más de 7 h son necesarias para éste fenómeno. Así entonces hay una correlación positiva entre la humedad relativa, la temperatura mínima y la precipitación con la severidad (Firman y Martin, 1968; Rodríguez-Navarro *et al.*, 1996). Es entonces, una enfermedad policiclica con un comportamiento ajustado al modelo Gompertz, debido a la gran cantidad de inóculo secundario que produce y las constantes infecciones que genera en un sólo ciclo de cultivo (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1996).

## Manejo

La resistencia o susceptibilidad de ciertas variedades de crisantemo a *P. horiana* se ha puesto a prueba por varios autores (Dickens, 1968; Baker, 1967; Nilsson, 1964; Firman y Martin, 1968, García-Velasco *et al.*, 2007; De Backer *et al.*, 2011). De Backer *et al.* (2011) en el único análisis de aislamientos a nivel mundial y utilizando 36 cultivares de compañías multinacionales de producción y comercialización de esqueje, reportan sólo 8 cultivares completamente resistentes, en su mayoría utilizados como flor de corte. Este patosistema es bastante complejo, ya que la resistencia a la roya blanca esta determinada por una interacción gen por gen, mediante 7 genes de resistencia (con sus 7 genes de avirulencia respectivos) que controlan al patosistema (De Backer *et al.*, 2011). Por lo que aunado al poco conocimiento que se tiene sobre la interacción, hace complicado trabajar y encontrar respuestas en la resistencia genética frente a la roya blanca.

Dentro de las estrategias culturales que se han propuesto para el control de la roya blanca, destacan algunas opciones, como el tratamiento con calor, ya sea de plantas completas a 38-40°C por 24 h, o a los esquejes en agua a 45°C por 5 min (Glaeser, 1966), tratamiento que sólo funciona para las variedades resistentes al calor. Se ha propuesto bajar la humedad relativa a menos del 90% en los lugares donde se cultiva (Wojdyla, 1999a; 2004), opción complicada, ya que la mayoría de la producción de flor se encuentra bajo invernadero o bajo microtuneles y el mismo cultivo requiere mucha agua. Así mismo el *despate*, es decir la remoción de las hojas inferiores (Huerta, 2000). Se ha probado la aplicación de la mineraloterapia, basados en el hecho de alterar el pH de la superficie foliar con sales inorgánicas, en donde el sulfato de cobre, bicarbonato de potasio, y bicarbonato de sodio han tenido éxito en experimentos controlados, aunque ya en campo, sólo han mostrado ser efectivos cuando son combinados con cubiertas epidermales (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1996).

El método de control más utilizado para combatir a *P. horiana* es mediante sustancias químicas. Se han probado diferentes moléculas como el azoxystrobin (O'Neill y Pye, 1997; Wojdyla, 1999b; Wojdyla, 2004), benodanil (Gullino *et al.*, 1979; Dickens y Potter, 1983; Dickens, 1990), clorotalonil (O'Neill y Pye, 1997), fenpropimorf (O'Neill y Pye, 1997), kresoxim-metil (Wojdyla y Orlikowski, 1999), mancozeb (O'Neill y Pye, 1997), maneb (Pei y Sun, 1981), myclobutanil (Bonde *et al.*, 1995; Strider, 1995; Wojdyla, 2004), oxicarboxin

(Gullino *et al.*, 1979; Dickens y Potter, 1983), tridemorf (Pei y Sun, 1981), propiconazol (Dickens, 1990), tetraconazole + clorotalonil (Wojdyla, 2004), tebuconazole + triadimefon (Wojdyla, 2004), bitertanol (Dickens, 1990) y triforin (Dickens, 1990). Aunque Wojdyla (2004) comparando diferentes fungicidas en tratamientos preventivos y curativos, reporta que sólo los derivados de azoles o estrobilurinas tienen efecto cuando ya han aparecido los síntomas. De manera práctica, se han propuesto aplicaciones de miclobutanil como curativo, además mancozeb y clorobutanil o bitertanol y tebuconazole, como sustancias químicas de protección (ICAMEX, 2003; UCIPM, 2010). En México se utilizan miclobutanil, tebuconazole, propiconazol, bitertanol, triadimefon y bromuconazol (Huerta, 2000). Por lo tanto, debido a su uso indiscriminado, no es de extrañarse el surgimiento de resistencia. Akiko *et al.* (1977) reportan en Japón aislamientos resistentes a oxicarboxin, lo mismo Pei y Sun (1981) y Yang *et al.* (1992) en Taiwan. Cook (2001) reporta aislamientos ingleses resistentes a propiconazol, miclobutanil y azoxystrobin.

Finalmente, poco se ha trabajado con métodos de control biológico, existen los casos de manejo con *Verticillium lecanii* (Srivastava *et al.*, 1985; Whipps, 1993; Rodríguez-Navarro *et al.*, 1996), con *Cladosporium* sp. (Srivastava *et al.*, 1985; García-Velasco *et al.*, 2005) o con *Aphanocladium album* (Srivastava *et al.*, 1985), aunque hasta el momento no han dado el salto a la industria, ni han sido aplicados de manera extensiva en el cultivo de crisantemo.

### **Control biológico de enfermedades**

El concepto de control biológico surge desde la entomología en 1919, acuñado por Smith para indicar el uso de enemigos naturales introducidos o manipulados, para controlar insectos plaga (Wilson y Huffaker, 1976). Para la fitopatología, Cook y Baker (1984) lo definen como “la reducción de inóculo del patógeno o su capacidad de producir enfermedad, mediante la acción de uno o más organismos, excluyendo al ser humano”, Nigam y Mukerji (1988) lo expresan como “el uso de uno o más procesos biológicos, con la finalidad de disminuir la densidad de inóculo del patógeno o reducir sus actividades patogénicas”. Definiciones bastante amplias que ofrecen un contexto, pero no puntualizan, por lo que para 1987 la National Academy of Sciences (EUA) lo acotó a “el uso de organismos naturales o modificados, sus genes o productos con el fin de reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo a organismos benéficos como cultivos, árboles, animales, microorganismos o

insectos benéficos”. Hasta el momento, una definición completamente aceptada de control biológico y que incluya todas sus vertientes no existe, por lo que continua la discusión al respecto. La definición de la National Academy of Sciences, a mi parecer engloba todos los requerimientos, por lo que será la definición utilizada en éste trabajo.

Se conocen dos vertientes dentro del control biológico de fitopatógenos, el control clásico y el control no clásico (Gnanamanickam *et al.*, 2002). El control clásico se aboca a la utilización de agentes antagonistas o competidores, ya sean residentes del agroecosistema, o de alguna manera introducidos a éste (Narayanasamy, 2013). Así, el antagonismo en todas sus vertientes explota los mecanismos parasíticos, enzimáticos, antibióticos o de competencia por nutrientes y espacio, de uno o varios organismos, en contra de un patógeno (Cook y Baker, 1983; Gabriel y Cook, 1990; Couteaudier, 1992; Schippers, 1992; Pal y MacSpadden, 2006; Narayanasamy, 2013). Especies como *Agrobacterium radiobacter*, *Trichoderma harzianum* o *T. lignorum* son ejemplo de casos de éxito, perteneciendo a algunas de las formulaciones comerciales de control biológico utilizadas mundialmente (Butt *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2002; Fravel, 2005). Pero así mismo, el uso de inóculo “vivo” en diferentes formulaciones, como lo requiere el control clásico, trae diferentes implicaciones y limitaciones, tales como la pérdida de patogenicidad, el efecto de la deshidratación, el lavado por la lluvia, el daño por radiación UV o el costo/beneficio para el productor y otras implicaciones socioeconómicas (Whipps y Lumsden, 2001; Yang y del Rio, 2002; Desai *et al.*, 2002; Fravel, 2005).

En el control no clásico, la definición de control biológico de fitopatógenos, se vuelve más extensa y puede abarcar un gran número de aspectos. Generalmente engloba metodologías en donde se explotan productos de otros organismos, se habla de compuestos naturales o de enzimas presentes en filtrados o de la capacidad alelopática de algunas plantas hasta la utilización de extractos orgánicos concentrados (Yang y del Rio, 2002; Narayanasamy, 2013). Dentro del concepto anterior se incluye la aplicación de materia orgánica dirigida en el suelo, como la incorporación de residuos de *Tagetes erecta* contra *Nacobus aberrans* y *Meloidogyne incognita* (Zavaleta-Mejía, 2003), o residuos de brassicáceas en el cultivo de cebolla para la reducción de *Sclerotium cepivorum* (Narayanasamy, 2013), la asociación con otras plantas como *Crotalaria lognistrostrata* junto con jitomate en contra de *M. incognita* (Villar y Zavaleta-Mejía, 1990), o *T. erecta* para la reducción de vectores de virus (Zavaleta-Mejía y Gómez-Rodríguez,

1995), así como la utilización de extractos orgánicos con actividad antifúngica o antibacteriana, provenientes de plantas u otros organismos (Narayanasamy, 2013).

En el control biológico, la idea de utilizar a un organismo en contra de otro, en cualquiera de sus formas, ofrece un acercamiento ambientalmente compatible y racional en el control de enfermedades vegetales, reflejado en el interés cada vez mayor del consumidor en métodos seguros de control de enfermedades (o plagas), que protejan al medio ambiente y que eviten la resistencia de éstos organismos patógenos (Erwin y Ribeiro, 1996; Whipps y Lumsden, 2001). Estos aciertos y complicaciones, implican que el control biológico necesita de un estudio más arduo, antes de que se vuelva completamente práctico en todos los sentidos para el manejo de las enfermedades vegetales. Se tiende a utilizar a cabalidad el método científico, reduciendo todas las variables a una observable, particularmente en el control biológico esto se vuelve un problema por que existen muchos factores biológicos, ambientales y de manejo que trabajan en conjunto, tanto en el desarrollo de la enfermedad como en la efectividad de los agentes de control biológico, volviéndolo un método interdisciplinario (Campbell, 1989; Erwin y Ribeiro, 1996). Finalmente, es claro que el control biológico no puede aplicarse como una única estrategia de manejo y más bien debe de formar parte de un esquema de manejo integrado, no sólo de los patosistemas, si no del agroecosistema en conjunto, con el objetivo de alcanzar mejores resultados en cuanto a rendimiento, calidad y sanidad, una empresa que beneficia a todos.

## Referencias

- Akiko, K., Kishi, K y Yoshioka, A. 1977. Occurrence of oxicarboxin-tolerant isolates of *Puccinia horiana* P. Hennings in Japan. Annals of the phytopathological Society of Japan, 43: 145-150.
- Alaei, H., Baeyen, S., Maes, M., Höfte, M., y Heungens, K. 2009. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. Journal of microbiological methods, 76: 136-145.
- Alaei, H., De Backer, M., Nuytinck, J., Maes, M., Höfte, M. y Heungens, K. 2009. Phylogenetic relationships of *Puccinia horiana* and other rust pathogens of *Chrysanthemum* × *morifolium* based on rDNA ITS sequence analysis. Mycological research, 113: 668-683.
- Alexander, S.J. and Hall, R. 1974. *Verticillium* wilt of chrysanthemum: anatomical observations on colonization of roots, stem, and leaves. Canadian Journal of Botany 52:783-789.
- Arbos, A. 1992. El Crisantemo. Cultivo, multiplicación y enfermedades. Ediciones Mundi Prensa. 159 p.
- ASERCA, 2006. Floricultura mexicana: flores de corte. Revista Claridades agropecuarias, 153. 65 p.
- Baker, J. J. 1967. Chrysanthemum White Rust in England and Wales 1963–66. Plant Pathology, 16: 162–166.
- Bauer R, Begerow D, Sampaio JP, Weiss M, Oberwinkler F, 2006. The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. Mycological Research 5: 41–66.
- Boase, M.R., Miller, R. y Deroles, S. 1997. Chrysanthemum systematics, genetics and breeding. Plant Breeding Reviews, 14: 321-361.
- Bonde M.R., Petron G.L., Rizvi S.A. y Smilanick J.L. 1995. Myclobutanil as a curative agent for chrysanthemum white rust. Plant Disease 79: 500–505.
- Bonde, M. R., Palmer, C. L., Luster, D. G., Nester, S. E., Revell, J. M. y Berner, D. K. 2013. Sporulation capacity and longevity of *Puccinia horiana* teliospores in infected chrysanthemum leaves. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2013-0823-01-RS.
- Bonde, M.R., Murphy, C.A., Bauchan, G.R., Luster, D.G., Palmer, C.L., Nester, S.E., Revell, J.M. y Berner, D.K. 2015. Evidence for Systemic Infection by *Puccinia horiana*, Causal Agent of Chrysanthemum White Rust, in Chrysanthemum. Phytopathology, 105(1): 91-98.

- Butt, T.M. y Copping, L. 2000. Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook* 11, 186-191.
- Campbell, R. 1989. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*. Cambridge. 239 p.
- Cho, W. K., Jo, Y., Jo, K. M. y Kim, K. H. 2013. A current overview of two viroids that infect chrysanthemums: Chrysanthemum stunt viroid and Chrysanthemum chlorotic mottle viroid. *Viruses*, 5: 1099-1113.
- Cook, R.J. y Baker, K. 1983. *The nature and practice of biological control of Plant pathogens*. APS Press. 539 p.
- Cook R.T.A. 2001. First report in England of changes in the susceptibility of *Puccinia horiana*, the cause of chrysanthemum white rust, to triazole and strobilurin fungicides. *Plant Pathology* 50: 792.
- Corredor, D. 1997. Integrated pest management in cut flower crops grown in plastic houses at the Bogota plateau. In: *International Symposium on Cut Flowers in the Tropics 482*: 241-246.
- Couteaudier, Y. 1992. Competition for carbon in soil and rhizosphere, a mechanism involved in biological control of *Fusarium* wilts. In: *Biological control of Plant Diseases, progress and challenges for the future*. Tijamos, E.C., Papavizas, G.C. y Cook, J. (eds.). Springer Science+Business media. 99-104 pp.
- Davidse, G., M. Sousa-Peña, S. Knapp y F. Chiang Cabrera. 2015. Asteraceae. 5(2). In: *Flora Mesoamericana*, G. Davidse, M. Sousa Sánchez, S. Knapp y F. Chiang Cabrera (eds.). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- De Backer, M., Alaei, H., Van Bockstaele, E., Roldan-Ruiz, I., van der Lee, T., Maes, M., y Heungens, K. 2011. Identification and characterization of pathotypes in *Puccinia horiana*, a rust pathogen of *Chrysanthemum x morifolium*. *European Journal of Plant Pathology*, 130: 325-338.
- Desai, S., Reddy, M.S. y Kloepper, J.W. 2002. Comprehensive testing of biological control agents. In: *Biological Control of Crop Diseases*, Gnanamanickam, S. (Eds.), Marcel Dekker. 387-420 pp.
- Dickens, J. S. W. 1968. The resistance of various cultivars and species of chrysanthemum to white rust (*Puccinia horiana* Henn.). *Plant Pathology*, 17: 19–22.
- Dickens, J. S. W. 1970. White Rust – the knowledge to date. *Commercial Grower*, 1: 68-69.
- Dickens, J. S. W. 1971. Further observations on the resistance of chrysanthemum cultivars to white rust (*Puccinia horiana* Henn.). *Plant Pathology*, 20: 27–28.

- Dickens J. y Potter R. 1983. Chrysanthemums. Spraying for white rust. *Grower* 100: 35–37.
- Dickens JSW, 1990. Studies on the chemical control of chrysanthemum white rust caused by *Puccinia horiana*. *Plant Pathology* 39: 434–442.
- Elizondo López, Guadalupe. 2013. La participación del grupo doméstico en cadenas florícolas en Tequexquinahuac, Estado de México. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias especialista en Socioeconomía y Desarrollo Rural. Colegio de Postgraduados. 220 p.
- EPPO, 2004. *Puccinia horiana*. Bulletin of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) 34: 209–211.
- Firman, I.D. y Martin, P.H. 1968. White rust of chrysanthemums. *Annals of Applied Biology* 62: 429–442.
- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 337-359.
- Gabriel, C.J. y Cook, R.J. 1990. Biological control, the need for a new scientific framework. *Bioscience* 40: 204-207.
- García Velasco, R. 2001. Estudio preliminar de manejo integrado del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. Polaris en Villa Guerrero, Edo. de México. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias especialista en Fitopatología. Colegio de Postgraduados. 81 p.
- García-Velasco, R., Ochoa, M.D.L., Zavaleta-Mejía, E., Mora, G. y Gaytán, A.E.A. 2002. Características morfológicas de basidiosporas de *Puccinia horiana* Henn. en *Dendranthema grandiflora* Tzvelev. cv. polaris. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20: 213-215.
- García-Velasco, R., Zavaleta-Mejía, E. y Rojas-Martínez, R. 2005. Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. Causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23: 79-86.
- García-Velasco, R., Zavaleta-Mejía, E., Martínez, R. I. R., Mir, S. G. L., Davila, G. F., y Simpson, J. 2007. Pathogenic and molecular variability of *Puccinia horiana* Henn. isolates. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30: 223–234.
- Glaeser, G. 1966. Achtung auf den 'Mehligen Rost 'der Chrysantheme neue Quarantankrankheit. *Pflanzenarzt*, 19: 2.
- Gnanamanickam, S.S., P. Vasudevan, M.S. Reddy, G. Defago y J.W. Kloepper, 2002. Principles of Biological Control, In: *Biological Control of Crop Diseases*, Gnanamanickam, S. (Eds.), Marcel Dekker. 1-9 pp.

- González, M.S. y Montealegre, A.J. 1981. Notas sobre uredinales chilenos *Puccinia horiana* Henn. sobre *Chrysanthemum* spp. AgroSur, 9: 65-66.
- Gullino G., Armato B. y Garibaldi A. 1979. Experiments on the control of *Puccinia horiana* of chrysanthemum. Informatore Fitopatológico 29: 7–10.
- Gutiérrez, S. 2003. Relaciones iónicas de N, P y K en el crecimiento, nutrición y calidad del crisantemo. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias especialista en Edafología. Colegio de Postgraduados. 88 p.
- Hackett, L. 2013. consultado el 10 de noviembre de 2014 de: <http://www.mums.org>.
- Hennings P, 1901. Einige neue japanische Uredineen. Hedwigia 40: 25–26.
- Hiratsuka N, 1957. Three species of chrysanthemum rust in Japan and its neighboring districts. Sydowia 2: 34–44.
- Hiratsuka, Y. y Sato, S. 1982. Morphology and taxonomy of rust fungi. Pages. In: K. Scott and A.K. Chakravorty (eds.). The Rust Fungi. Academic Press. 1-36 pp.
- Horst, R. K. y Nelson, P. E. 1997. Compendium of Chrysanthemum Diseases. American Phytopathological Society. 88 p.
- Huerta, R. A. 2000. Diagnóstico agroecológico del cultivo de crisantemo en Texcoco, Méx. y propuestas de manejo para el control de plagas. Tesis de Maestría, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México.
- ICAMEX. 2003. Guía para cultivar flor de crisantemo en invernadero. 8 p.
- Kapooria, R.G. y Zadoks, J.C. 1973. Morphology and cytology of the promycelium and the basidiospore of *Puccinia horiana*. European Journal of Plant Pathology 79: 236–242.
- Krebs, K.E. 1985. Chrysanthemum white rust can be controlled. Gartenbörsen und Gartenwelt, 85: 69-73.
- Larson, R. 2004. Introducción a la floricultura. AGT editor. 158 p.
- Leyva-Mir, S.G., Lora-Trejo, I., Cárdenas-Soriano, E. y Valdovinos-Ponce, G. 2001. Patogénesis de la Roya Blanca *Puccinia horiana* Henn. en una Variedad Susceptible de Crisantemo [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Hemsl.]. Revista Mexicana de Fitopatología, 19(2):191-196.
- Liu, P.L., Wan, Q., Guo, Y., Yang, L. y Rao, G. 2012. Phylogeny of the Genus *Chrysanthemum* L.: Evidence from Single-Copy Nuclear Gene and Chloroplast DNA Sequences. PLoS ONE 7(11): e48970.

- Mukherjee, A., Dey, A., Acharya, L., Palai, S. y Panda, P. 2013. Studies on genetic diversity in elite varieties of *Chrysanthemum* using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 12: 161-169.
- Narayanasamy, P. 2013. Biological management of diseases of crops. Vol I: Characteristics of Biological Control Agents. Springer. 673 p.
- Nigam, N. y Mukerji, K. G. 1988. Biological control. Concepts and practice. *In: Biocontrol of Plant Diseases*. Vol. 1. Mukerji, K. G. y Garg, K. L. (Eds.). CRC Press 1-13 pp.
- Nilsson, L. 1964. Vit Krysanthemumrost i Sverige. *Växtskyddnotiser*, 28: 99–108.
- Ochoa-Martinez, D. L., Zavaleta-Mejía, E., Mora-Aguilera, G. y Johansen, N. 1999. Implications of weed composition and thrips species for the epidemiology of tomato spotted wilt in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant pathology*, 48: 707-717.
- O'Neil T.M. y Pye D. 1997. Evaluation of fungicides for control of chrysanthemum white rust (*Puccinia horiana*). *Annals of Applied Biology* 130, Supplement. Tests of Agrochemicals and Cultivars 18: 8–9.
- Orozco, M. E., y Martínez, M.M. 2003. Competitividad local de la agricultura ornamental en México. En: *Ciencia Ergo Sum*. Núm. 1. Vol. 10. México: Universidad Autónoma del Estado de México. 29-42 pp.
- Pal, K.K. y MacSpadden, B. 2006. Biological control of plant pathogens. The plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Pei C.L. y Sun S.K. 1981. Investigation on fungicide-tolerant strain of pathogenic fungi in Taiwan (II): Occurrence of oxycarboxin-resistant strains of *Puccinia horiana* P. Hennings, the white rust of chrysanthemum. *Plant Protection Bulletin, Taiwan* 23: 221–227.
- Pedley, K. F. 2009. PCR-based assays for the detection of *Puccinia horiana* on chrysanthemums. *Plant Disease*, 93: 1252-1258.
- Rivas García, J. S. 1994. Diagnóstico de las condiciones de producción del crisantemo. Estudio de caso: Tequexquahuac, Texcoco, Edo. de México. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias especialista en Economía. Colegio de Postgraduados. 106 p.
- Rodríguez-Navarro, J.A., Zavaleta-Mejía, E. y Alatorre-Rojas, R. 1996. Epidemiología y manejo de la roya blanca (*Puccinia horiana* P. Henn.) del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Fitopatología*, 31(2): 122-132.
- Romero, C.S. 1996. Plagas y enfermedades de ornamentales. Departamento de parasitología agrícola. UACH, Chapingo. 224 p.

- SIAP. 2014. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera <http://www.siap.gob.mx>, México D.F., consultado el 15 de enero de 2015.
- Schippers, B. 1992. Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. In: Biological control of Plant Diseases, progress and challenges for the future. Tijamos, E.C., Papavizas, G.C. y Cook, J. (eds.). Springer Science+Business media. 21-34 pp.
- Srivastava, A.K., Défago, G. y Kern, H. 1985. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. *Phytopathology Z.*, 114: 73-78.
- Strider D.L. 1995. White rust of *Chrysanthemum morifolium* – a review. *Revista-Chapingo. Serie – Horticultura 1*: 109–112.
- Teixeira da Silva, J. 2003. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances*, 21: 715-766.
- UCIPM. 2010. Pest management guidelines: Floriculture and ornamental nurseries. University of California Agriculture and Natural Resources UC Statewide Integrated Pest Management Program. 3392: 178 p.
- Ullman, D.E. 1996. Thrips and Tospoviruses: advances and future directions. *Acta Horticultae*, 431: 310-324.
- USDA-NASS. 2014. United States Department of Agriculture <http://www.nass.usda.gov>, consultada el 15 de enero de 2015.
- van Wijk, J. 1994. Floriculture in Colombia. *Biotechnology and Development Monitor*, 20: 4-5.
- Villar, E.M. y Zavaleta-Mejía, E. 1990. Effect of *Crotolaria longirostrata* Hook y Arnott on root galling nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 8: 166-172.
- Whipps, M.J. 1993. A review of thite rust (*Puccinia horiana* Henn.) disease on chrysanthemum and the potential for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. *Annals of Applied Biology*, 122: 173: 187.
- Whipps, J. M., y Lumsden, R. D. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*, 9-22.
- Wilson, E. y Huffaker, C.B. 1976. The phylosophy, scope and importance of biological control. In: *Theory and practice of biological control*. Huffaker, C.B. y Messenger, C.P. (Eds.). Academic Press. 3-15 pp.

- a) Wojdyła A.T. 1999. Susceptibility of chrysanthemum cultivars to *Puccinia horiana*. *Folia Horticulturae*, 11: 115–122.
- b) Wojdyła A.T. 1999. Azoxystrobin in the control of *Puccinia horiana* on chrysanthemum. *Progress in Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 39: 831–834.
- Wojdyła A.T., Orlikowski L.B. 1999. Strobilurin compounds in the control of rust, powdery mildew and black spot on some ornamental plants. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 64: 539–545.
- Wojdyła, A. T. 2004. Development of *Puccinia horiana* on chrysanthemum leaves in relation to chemical compounds and time of their application. *Journal of Plant Protection Research*, 44: 91-102.
- Wu, C.Y., Raven, P.H. y Hong, D.Y. 2011. *Flora of China*. Science Press & Missouri Botanical Garden Press, 992 p.
- Yang, H.C., Kao, C.W. y Leu, L.S. 1992. The ecology and control of white rust occurred on chrysanthemum. *Plant Protection Bulletin (Taiwan)*, 34: 125-138.
- Yang, X.B. y del Río, L. 2002. Implementation of biological control of plant diseases in integrated pest management systems. In: *Biological Control of Crop Diseases*, Gnanamanickam, S. (Eds.), Marcel Dekker. 339-354 pp.
- Zandvoort R, 1968. Wind dispersal of *Puccinia horiana*. *European Journal of Plant Pathology* 74: 124–127.
- Zavaleta-Mejía, E. y Gómez-Rodríguez, O. 1995. Effect of *Tagetes erecta* L.-tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) intercropping on some tomato pests. *Fitopatología*, 30: 35-46.
- Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, E. y Ochoa-Martínez, D.L. 2003. Manejo Ecológico de enfermedades. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. 114 p.

## CAPÍTULO II

# Especies del género *Cladosporium* Link asociadas a *Puccinia horiana* Henn. en Villa Guerrero, Estado de México

### Introducción

El género *Cladosporium sensu lato* es uno de los hongos más comunes a nivel mundial aislado de diversos sustratos; tradicionalmente incluye especies con hábitos de vida muy diversos, desde saprófitos hasta patógenos de humanos. En la actualidad, sólo la mayoría de las especies saprófitas se incluyen dentro del género, descartando y reubicando en diversos géneros, a las que presentan hábitos de vida diferentes (Braun *et al.*, 2003; 2012). Más allá de su hábito saprófito, su asociación con otros hongos, derivada de mecanismos de hiperparasitismo o antagonismo ha sido descrita (Kiss, 2003; Assante *et al.*, 2004). Una de las asociaciones más comunes, es la relación entre *Cladosporium* spp. con diversas royas (Sharma y Heather, 1983; Barros *et al.*, 1999; Moricca *et al.*, 2001; Assante *et al.*, 2004), de lo cual surge la posibilidad de utilizar algunas especies como potenciales agentes de control biológico (Moricca *et al.*, 2001 y 2005; García-Velasco *et al.*, 2005).

García-Velasco *et al.* (2005), reportaron en Villa Guerrero, Estado de México un aislamiento de *Cladosporium* sp. eficaz como agente de control biológico, por lo cual en el presente capítulo se determinan las especies de *Cladosporium* asociadas a la roya blanca (*Puccinia horiana*) del crisantemo (*Chrysanthemum × morifolium*), como probables agentes de control biológico en la misma localidad.

## Revisión de Literatura

El género *Cladosporium* Link:Fr. descrito en 1816, es uno de los grupos más grandes y heterogéneos dentro de los ascomicetos-hifomicetos, incluía siete especies descritas por Link (David, 1996; Dugan *et al.*, 2004; Heuchert *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2006; Bensch *et al.*, 2012) y actualmente se estima que pueden ser entre 100 y 540 especies (Prasil y de Hoog, 1988; Seifert *et al.*, 2011). Según Dugan *et al.* (2004) existen 772 nombres publicados, lo que muestra su complejidad taxonómica. Su heterogeneidad morfológica y su clasificación molecular compleja, han llevado a plantear su origen polifilético (Bensch *et al.*, 2012). Braun *et al.* (2003) determinan que el teleomórfo de *Cladosporium* no pertenece a *Mycosphaerella* como se creía, por lo que proponen un nuevo género: *Davidiella*, que es reconocido actualmente como su teleomórfo. Estos géneros difieren entre si por la presencia de inclusiones características en las ascas y en el caso del anamórfo por no poseer la cicatriz característica. El género *Cladosporium* queda entonces englobado en la familia *Davidiellaceae*, dentro del orden Capnodiales (Schoch *et al.*, 2006), aunque en cuanto al nombre de la familia Hyde *et al.* (2013) sostiene que el correcto debería de ser *Cladosporiaceae*, debido a que tiene prioridad por antigüedad.

Actualmente se reconoce a *Cladosporium herbarum* (*Davidiella tassiana*) como la especie tipo del género, morfológicamente delimitado por un rasgo particular en las estructuras reproductoras: un locus conidiogénico *coronado* y un hilum conidial compuesto de un domo central convexo rodeado de un anillo periclinal, determinado como cicatriz tipo *Cladosporium* (David, 1997; Dugan *et al.*, 2004; Seifert *et al.*, 2011; Schubert *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2007).

La correcta identificación de las especies de *Cladosporium* se basa tanto en la morfometría de diversas estructuras, como el conidióforo y conidios tanto *in vivo* como *in vitro* (Seifert *et al.*, 2011; Bensch *et al.*, 2012), así como en la determinación de relaciones filogenéticas apoyadas principalmente en tres regiones del ADN: ITS (ADNr Intergenic Transcribed Spacer + gen 5.8S), ACT (gen parcial de actina) y TEF 1 $\alpha$  (factor de elongación 1 $\alpha$ ) como lo reportan Bensch *et al.* (2010; 2012), aunque se han utilizado también otras dos regiones: parcial de calmodulina y parcial de la histona H3 (Schubert *et al.*, 2007). Ambas herramientas, son consideradas una regla en la asignación de especies dentro del género (Schubert *et al.*, 2007).

Hasta el momento no ha sido posible una clasificación taxonómica intragenérica por la complejidad del género, las propuestas de Krangauz (1970), Von Arx (1983) y David (1996) para estos rangos no fueron aceptadas, sin embargo con los trabajos de Schubert *et al.* (2007), Zalar *et al.*, 2007; Bensch *et al.* (2010) y Bensch *et al.* (2012) es claro que existen tres subclados bien diferenciados, soportados por los complejos de especies: *C. herbarum*, *C. cladosporioides* y *C. sphaerospermum*, por lo que no sería raro que en un futuro éstos sean la base para la clasificación intragenérica de *Cladosporium*.

Antiguamente cualquier hifomiceto dematiaceo con amerosporas o fragmosporas, organizadas en cadenas acropetalas era asignado al género *Cladosporium sensu lato* (Dugan *et al.*, 2004) muchas especies quedaron fuera del género al momento de su revisión, agrupándose en los siguientes géneros: *Ochrocladosporium*, *Rhizocladosporium*, *Hormoconis*, *Sorocybe*, *Cladophialophora*, *Metulocladosporiella*, *Fusicladium*, *Rachicladosporium*, *Graphiopsis*, *Verrucocladosporium*, *Toxicladosporium*, *Periconiella*, *Zasmidium*, *Pseudocercospora*, *Ramularia*, *Passalora*, *Penidiella*, *Stenella*, *Davriosa* y finalmente *Cladosporium s. str.* (Braun *et al.*, 2003; Bensch *et al.*, 2012). Especies patogénicas del hombre son ubicadas fuera de *Cladosporium s. str.*, ya que su anamórfo pertenece a la familia Mycosphaerellaceae, agrupándose dentro del género *Cladophialophora* (Dugan *et al.*, 2004, de Hoog *et al.*, 2005). Por lo que Zalar *et al.* (2007) mencionan que sería necesario una reexaminación de todos los casos de *Cladosporium* asociado a casos clínicos, ya que en la mayoría de ellos se ha demostrado que es un parásito oportunista. Por lo tanto dentro del género se encuentran especies en su mayoría saprófitas, algunas patógenas de plantas, excluyendo por ejemplo a *C. fulvum* (= *Passalora fulva*), fungícolas (asociadas a otros hongos), endófitas y en raras ocasiones parásitos oportunistas de especies animales (Heuchert *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2007; Zalar *et al.*; 2007; Bensch *et al.*, 2010; Bensch *et al.*, 2012).

### ***Cladosporium* asociado a otros hongos**

Dugan *et al.* (2004) y Heuchert *et al.* (2005) ubicaron a las especies que utilizan a otros hongos como sustrato (incluyendo hiperparásitas) encontrando 26 pertenecientes a *Cladosporium s. str.*, 12 de las cuales son estrictamente fungícolas, 6 con reportes de asociación o hiperparasitismo pero con problemas taxonómicos en la tipificación o identificación y 8 con problemas en la ubicación taxonómica. Por otro lado en la monografía del género publicada por Bensch *et al.* (2012) sólo se reconocen a 19 especies realmente asociadas a otros hongos: dos especies

asociadas a líquenes, ocho especies encontradas en ascomicetos (Capnodiales, Erysiphales, Helotiales, Hypocreales y Taphrinales), 9 reportadas en basidiomicetos (Exobasidiales, Pucciniales, Agaricales, Boletales, Polyporales y Russulales), incluyendo dentro de estas a *C. tenuissimum*, *C. herbarum*, *C. oxysporum* y *C. sphaerospermum*, por los reportes de asociación e hiperparasitismo de estas especies con otros hongos, a pesar de sus estatus como saprófitos. Muchas de estas especies reportadas y analizadas se les ha conferido un papel en el control biológico (Moricca *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002; Assante *et al.*, 2004; Moricca *et al.*, 2005) evaluando su hiperparasitismo o antagonismo contra otros hongos.

En el Cuadro 2.1 se resumen las especies reportadas como fungícolas, es decir asociadas a otros hongos, aunque en muchos casos no queda claro su papel como saprófitos o como micoparásitos, por lo que una revisión a detalle sobre la ecología de estas especies se vuelve necesaria, ya que en total se muestran 31 taxa, lo que difiere con lo reportado anteriormente (Dugan *et al.*, 2004; Heuchert *et al.*, 2005; Bensch *et al.*, 2012). Finalmente, muchas de las especies de *Cladosporium* se han encontrado en diferentes especies de hongos como consta en los reportes de colecta con fines taxonómicos, por ejemplo en Bensch *et al.* (2010) pero quedando calificadas como saprófitas más que como parásitas del hongo en el que se reportan, por lo que su papel como hiperparásitos o antagonistas queda sin resolverse.

### ***Cladosporium* asociado a *Puccinia horiana***

Son pocos los reportes de *Cladosporium* en asociación con *Puccinia horiana*. Srivastava *et al.* (1985) reportan a *C. sphaerospermum* y a *C. uredinicola* con la posibilidad de parasitar las teliosporas de *P. horiana* en un 19% y 28% respectivamente, penetrando principalmente por el poro de germinación. Posteriormente Sheta (1996) reporta a *Cladosporium uredinicola* por primera vez en embarques de crisantemo provenientes de Brasil con una incidencia de 10% en pústulas infectadas. En México García-Velasco, *et al.* (2005) encuentran a *Cladosporium* (sin identificar la especie) asociado a *P. horiana*, obteniendo una disminución de la severidad pero sin afectar la incidencia de esta enfermedad. Así, surge la importancia de la determinación particular de las especies de *Cladosporium* en Villa Guerrero con potencial antagonista de *P. horiana*, como potenciales agentes de control biológico de la roya blanca del crisantemo.

**Cuadro 2.1. Especies de *Cladosporium* s. str. reportadas en asociación con otros hongos** (Dugan *et al.*, 2004; Heuchert *et al.*, 2005 y Bensch *et al.*, 2012).

Espece	Sustrato	Parasitismo
<i>C. aecidiicola</i>	En aecias de royas: <i>Aecidium</i> sp., <i>Aecidium carneum</i> , <i>A. cyparissiae</i> , <i>A. euphorbiae</i> , <i>A. falcaria</i> , <i>A. lonicerinum</i> , <i>A. trollii</i> , <i>Coleosporium campanulacearum</i> , <i>C. tussilaginis</i> , <i>Melampsora helioscopiae</i> , <i>Puccinia</i> sp., <i>Puccinia agropyrina</i> , <i>P. circaeae</i> , <i>P. coronata</i> , <i>P. graminis</i> , <i>P. grandeliae</i> , <i>P. passerinii</i> , <i>P. phragmitis</i> , <i>P. smilacearum-digraphidis</i> , <i>P. tragopogi</i> , <i>P. violae</i> , <i>Uromyces</i> sp., <i>Uromyces laponicus</i> , <i>U. limonii</i> , <i>U. pisi</i> ,	Se ha encontrado asociado a royas, pero su papel como hiperparásito no se ha demostrado hasta el momento.
<i>C. epichloës</i>	En estroma de <i>Epichloë typhina</i>	Sólo se conoce un hospedante pero aún así sigue sin conocerse su papel como hiperparásito.
<i>C. epimyces</i>	En agallas de <i>Armillaria mellea</i> , <i>Hypholoma sublatentum</i> , <i>Lactarius</i> sp. y <i>Leucopaxillus gentianeus</i>	
<i>C. episclerotiale</i>	En esclerocios de <i>Sclerotinia cinerea</i> (= <i>Monilinia laxa</i> ) y <i>Suillus bovinus</i>	No se ha reportado parasitismo como tal, ya que sólo se ha encontrado sobre los hongos reportados.
<i>C. exobasidii</i> var. <i>exobasidii</i>	En <i>Exobasidium rhododendri</i> , <i>E. vaccinii</i> ,	
<i>C. exobasidii</i> var. <i>verruculosum</i>	En <i>Exobasidium vaccinii</i> var. <i>vaccinii</i>	
<i>C. gallicola</i>	En <i>Cronartium comandre</i> , <i>Endocronartium harknessii</i> y <i>Puccinastrum goeppertianum</i> . Posiblemente <i>Cronartium conigenum</i> y <i>C. coleosporoides</i>	Se ha demostrado su papel como hiperparásito.
<i>C. gerwasiae</i>	En <i>Gerwasia</i> sp.	Colonias en soros y en el tejido vegetal deforme que rodea los soros
<i>C. lycoperdinum</i>	En agallas de <i>Gomphidius viscidus</i> , <i>Lactarius volemus</i> , <i>Lepiota procera</i> , <i>Lycoperdon</i> sp., <i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Polyporus</i> sp., <i>Scleroderma tuberoideum</i> , <i>Suillus bovinus</i>	No se ha reportado parasitismo como tal, ya que sólo se ha encontrado sobre los hongos reportados.
<i>C. phyllophilum</i>	En <i>Taphrina</i> sp. incluyendo <i>T. pruni</i> , <i>T. cerasi</i> , <i>T. communis</i> , <i>T. deformans</i>	Parasitando el estroma de <i>Taphrina</i>

Continúa Cuadro 2.1

Especie	Sustrato	Parasitismo
<i>C. taphrinae</i>	En <i>Taphrina coerulescens</i>	Crece entre y sobre las ascas de <i>Taphrina</i> , en comparación con la especie de <i>Cladosporium</i> anterior
<i>C. antarcticum</i>	Encontrado en <i>Caloplaca regalis</i>	Se desconoce más de la ecología de esta especie
<i>C. sphaerospermum</i>	Asociado a algunos líquenes	Se desconocen ejemplares de herbario, sólo se conoce el reporte.
<i>C. uredinicola</i>	En royas, Peronosporales y Erysiphales; <i>Chrysocyclusestri</i> , <i>Cronartium fusiforme</i> f. sp. <i>quercum</i> , <i>Erysiphe euonymi-japonici</i> , <i>Gymnosporangium nelsoni</i> , <i>G. sabine</i> , <i>Melampsora coleosporoides</i> , <i>M. laricis-populina</i> , <i>Peronospora arborescens</i> , <i>P. gaeumanii</i> , <i>Phragmidium</i> sp., <i>Phyllactinia angulata</i> , <i>P. guttata</i> , <i>Puccinia artemisicola</i> , <i>P. cestri</i> , <i>P. coprosmae</i> , <b><i>P. horiana</i></b> , <i>P. jaceae</i> , <i>P. malvacearum</i> , <i>P. melanocephala</i> , <i>P. recondita</i> , <i>Tranzschelia pruni-spinosae</i> , <i>Tiphragmium ulmariae</i>	Se reconoce como parásito de soros de diferentes royas y micelio de Peronosporales y Erysiphales
<i>C. cladosporioides</i>	Es un hongo saprófito y en ocasiones endófito cosmopolita. En ocasiones se ha reportado en <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Golovinomyces cichoracearum</i>	Aunque se ha encontrado asociado a algunos hongos, no hay ejemplar de herbario parasitando otros hongos
<i>C. herbarum</i>	Es un hongo saprófito cosmopolita. Se ha reportado asociado con otros hongos fungícolas como <i>C. aecidiicola</i> y <i>C. episclerotiale</i> . Encontrado también en <i>Lenzites appplanata</i> , <i>Mitophora semilibera</i> , <i>Amanita rubescens</i> , <i>Scleroderma</i> sp., <i>Clitocybe</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Laccaria</i> sp., <i>Gomphidius</i> sp., <i>Hypholoma</i> sp., <i>Lepiota</i> sp., <i>Panus conchatus</i> , <i>Boletus</i> sp. y <i>Polyporus</i> sp.	No se conoce su papel como parásito, así mismo los límites taxonómicos de la especie no están tan claros por lo que podría haber errores en la identificación.
<i>C. urediniphilum</i>	En soros de <i>Uredo cyclotrauma</i>	Falta de información en el ejemplar tipo, estatus taxonómico dudoso

**Continúa Cuadro 2.1**

Especie	Sustrato	Parasitismo
<i>C. oxysporum</i>	De amplia distribución generalmente en zonas tropicales y subtropicales como saprófito. Se ha encontrado en <i>Phyllactinia moricola</i> y <i>Melampsora ciliata</i>	A pesar del conocimiento de su hábito de vida en general, sí se le reconoce como hiperparásito de las dos especies de hongos con las que se ha encontrado asociado
<i>C. pannosum</i>	Probablemente en <i>Chaetophormus musae</i> , aunque no existe ejemplar de herbario	Se desconoce la ecología de esta especie
<i>C. tenuissimum</i>	Los ejemplares de herbario que se han revisado resultan ser confusiones con <i>C. uredinicola</i> , aunque se encuentra reportado en <i>Cronartium flaccidum</i> y <i>Peridermium pini</i> y <i>Uromyces appendiculatus</i>	Al parecer los eventos de hiperparasitismo de estas especie se han confundido con los de la especie <i>C. uredinicola</i> , aunque algunos autores demuestran su caracter como hiperparásito
<i>C. argillaceum</i>	Encontrado en un mixomycete marchito	Se desconoce su estatus y su ecología
<i>C. fungorum</i>	Reportado en <i>Dematium herbarum</i> $\beta$ - <i>fungorum</i> y <i>Polyporus</i> sp.	Posible confusión con <i>C. herbarum</i> , <i>C. cladosporoides</i> o <i>C. epimyces</i>
<i>C. herbarum</i> f. sp. <i>parasiticum</i>	Encontrado en ascas de <i>Taphrina tosquinetti</i>	No se conoce otro ejemplar más que el ejemplar tipo, pudiendo confundirse con otras especies de <i>Cladosporium</i>
<i>C. lophoermii</i>	Reportado en apotecios de <i>Lophodermium pinastrum</i>	Se desconoce su estatus taxonómico
<i>C. penicilloides</i>	Reportado en <i>Tubercularia granulata</i> y <i>T. vulgaris</i>	Se desconoce su estatus taxonómico, debido a la sinonimia de la especie y los pocos ejemplares de herbario
<i>C. phyllachorae</i>	En <i>Phyllacora apoensis</i>	Se desconocen ejemplares de herbario. Estatus dudoso.
<i>C. spongiosum</i>	En <i>Oidium dendrophthoeae</i>	Los materiales analizados corresponden a <i>C. uredinicola</i> . Estatus dudoso
<i>C. stromatum</i>	En <i>Eutypha lejoplaca</i>	Estatus dudoso ya que no existe ejemplar de herbario
<i>C. tuberculatum</i>	En <i>Cytospora leucosperma</i>	Estatus taxonómico dudoso
<i>C. umbrinum</i>	En <i>Agaricus olearius</i> y <i>Lactarius</i> sp.	Ejemplar parece ser corresponde a <i>C. herbarum</i>
<i>C. phyllactinicola</i>	En chasmotecios de <i>Phyllactinia guttata</i>	Estatus taxonómico dudoso

## Objetivo

Obtener e identificar morfológica y molecularmente, aislamientos de *Cladosporium*, asociados a pústulas de *Puccinia horiana*, como potenciales agentes de control biológico en Villa Guerrero, Estado de México.

## Materiales y Métodos

**Colecta.** Se efectuaron dos recolectas (Enero y Octubre, 2014) de hojas de crisantemo cv. spider con lesiones causadas por la roya blanca, tanto con signos de hiperparasitismo como pústulas “sanas”, en un invernadero comercial de crisantemo en Villa Guerrero, Estado de México (coordenadas: 18.957119, -99.660013).

**Aislamiento.** A partir de las pústulas de *Puccinia horiana* parasitadas se obtuvieron cultivos monospóricos de *Cladosporium*, mediante la obtención de una suspensión de esporas en 1 mL de agua estéril, depositada en una caja de Petri con agar 2% dejando por 24 h a 25°C (Crous *et al.*, 2009), posteriormente se revisó y las colonias incipientes provenientes de una sola espora se tomaron y se transfirieron a medio PDA 2% (Papa Dextrosa Agar, Bioxon®, México). A los 7 días las colonias se separaron por morfología, obteniendo cuatro aislamientos diferentes, determinados: DETSC1A, DETSC1B, DETSC02 y DETSC03.

**Identificación morfológica y cultivo.** Con los cuatro aislamientos obtenidos (DETSC1A, DETSC1B, DETSC02 y DETSC03), se siguieron los métodos de identificación de Schubert *et al.* (2007) y Bensch *et al.* (2012). Para determinar las características de las colonias, se cultivaron en los medios: PDA 2% sintético (Bioxon®), Extracto de malta-Agar 2%(MEA 2%, Bioxon®), Avena-Agar 2% (OA 2%, avena comercial y Agar Bioxon®) manteniéndose en oscuridad a 24°C por 14 días. Se documentó la apariencia y los colores con las tablas de Munsell (1994). Para el caso de la morfología de las estructuras reproductoras, los aislamientos se crecieron en medio SNA (Synthetic Nutrient Poor Agar, Crous *et al.*, 2009) por 7 días en oscuridad a 24°C, se realizaron preparaciones con cinta adhesiva transparente y una gota de glicerol en un portaobjetos, para su observación al microscopio. Se midieron 40 conidios (largo y ancho) y 20 conidióforos (ancho), se fotografiaron en un fotomicroscopio Carl Zeiss, se describieron siguiendo la terminología utilizada por Schubert *et al.* (2007).

**Obtención de ADN y amplificación por PCR.** A partir de los cuatro aislamientos antes mencionados, cultivados en medio PDA 2% (Bioxon<sup>®</sup>) por 14 días, 22°C y luz/oscuridad 12h, se obtuvo el micelio y mediante la metodología de Falcon y Valera (2007) se extrajo el ADN. La pastilla obtenida se disolvió en agua desionizada estéril, se estimó y verificó su calidad en espectrofotómetro (NanoDrop N100<sup>®</sup>). Con el DNA obtenido se amplificó la región ribosomal ITS (Internal Transcribed Spacer) junto con la región 5.8S, las regiones parciales de actina (ACT) y factor de elongación 1- $\alpha$  (TEF 1- $\alpha$ ). Las secuencias de los iniciadores utilizados se muestran en el Cuadro 2.2. La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación fueron las reportadas por Bensch *et al.* (2012), en un termociclador Techne TC3000 (Techne). Los fragmentos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 1.5%, (90 V/45 min.) y como marcador de peso molecular de referencia se utilizó el 1 kb (Axygen<sup>®</sup> 1kb Ladder DNA Marker). El gel se observó en un fotodocumentador (Geldoc 2000<sup>®</sup>, BioRad) para visualizar las bandas obtenidas y su correlación con el marcador de peso molecular. Los productos amplificados se purificaron con un kit (Wizard<sup>®</sup> SV gel and PCR clean up system, Promega) y se mandaron a secuenciar en ambos sentidos al Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Morelos).

**Cuadro 2.2. Iniciadores utilizados para la amplificación de la región ITS1-5.8 ADN-ITS2 y regiones parciales de actina y de factor de elongación.** Sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Morelos)

Región	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
ITS	ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS 4	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White <i>et al.</i> , 1990
ACT(región parcial)	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone y Kohn, 1999
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCAT	Carbone y Kohn, 1999
TEF 1 $\alpha$ (región parcial)	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone y Kohn, 1999
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	Carbone y Kohn, 1999

**Análisis y Filogénia.** Para confirmar la identidad de los aislamientos, las secuencias obtenidas (Anexo I) se analizaron por BLAST (NCBI). Se corroboraron las secuencias con el programa 4Peaks<sup>®</sup>, posteriormente se ensamblaron y editaron con el programa CLC sequence viewer<sup>7</sup><sup>®</sup>. Las secuencias obtenidas se compararon con 43 secuencias reportadas por Bensch *et al.* (2010; 2012) depositadas en el GenBank (Anexo I). El conjunto total de

secuencias para cada región se alinearon por medio de ClustalW y con Mesquite v.3.01 (Madison y Madison, 2014) se concatenaron las tres regiones en una sola matriz. Con jModelTest 2.1.7. (Darriba *et al.*, 2012) se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica para cada partición utilizando el criterio de información de Bayesiano (BIC).

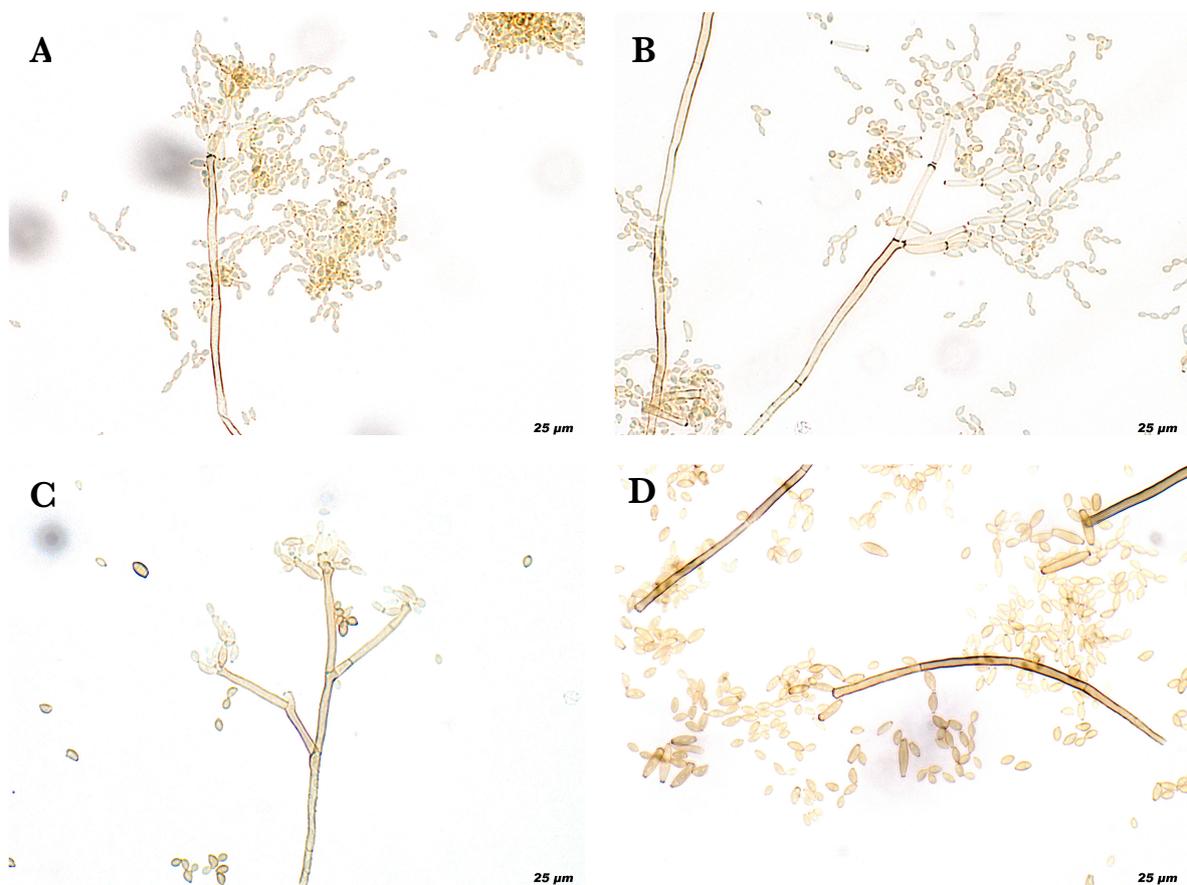
El análisis filogenético se estimó por métodos bayesianos utilizando BEAST v.1.8.1. (Drummond *et al.*, 2012) y métodos Monte Carlo con cadenas de Markov de cuatro cadenas, comenzando con una topología al azar hasta 20 millones de generaciones, salvando los árboles cada 1,000 generaciones resultando en 20,001 árboles generados. Se analizaron los resultados con Tracer v.1.6. con lo que el “burn in” se fijó en 2 millones de generaciones, después los valores se volvieron estacionarios. Los árboles resultantes fueron analizados en TreeAnnotator v.1.8.1., el resultado se visualizó y editó en FigTree v.1.4.2. Para evaluar la estabilidad de cada clado, se utilizó el método de Neighbor-Joining utilizando el mismo modelo de sustitución nucleotídica y 1,000 generaciones en bootstrap en el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Ya que la región ITS tiene una resolución limitada, sólo se utilizó ACT y TEF como marcadores de referencia (Anexo II).

**Prueba de antagonismo.** Se obtuvieron hojas infectadas con *P. horiana* de un invernadero comercial en Texcoco, Estado de México. Las hojas se desinfectaron con una solución de cloro 3% por 3 min y un lavado triple con agua destilada estéril. Se realizó un tratamiento con el antagonista asperjado sobre *P. horiana*, además de controles con *P. horiana* asperjada con agua destilada estéril y hojas sin *P. horiana* asperjadas con *Cladosporium*. Por tratamiento en cámara húmeda se colocaron 10 hojas (provenientes de 5 plantas diferentes), con severidad por arriba del 30% de *P. horiana* (Barbosa *et al.* 2006). A las hojas se les aplicó una suspensión de  $2 \times 10^5$  conidios/ml (0.01% Tween20) de los cuatro diferentes aislamientos obtenidos. Se mantuvieron en cámara húmeda por 4 días a temperatura ambiente. Cada hoja se consideró una repetición, a partir de esto, se calculó el porcentaje de asociación de las diferentes cepas de *Cladosporium* con las pústulas de *P. horiana*. Se realizó una prueba ANOVA, la distribución normal fue verificada con la prueba de Shapiro-Wilk [ $P > 0.05$ ] y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene [ $P > 0.05$ ]. Las diferencias entre las medias se calcularon con la prueba post hoc Ryan-Einot-Gabriel-Welch, basada en una prueba de F [ $P > 0.05$ ]. Todos los análisis se realizaron en SPSS Statistics 21.0©.

## Resultados

Los cuatro aislamientos pertenecen al género *Cladosporium* (*Cladosporiaceae* o *Davidiellaceae*: anamórfo *Davidiella*), basados en las claves de Brown y Crous contenidas en Crous *et al.*, 2007; Seinfert *et al.*, 2011 y Bensch *et al.*, 2012, mismas que consideran conidióforos pigmentados, bien diferenciados y desarrollados, loci bien diferenciados, múltiples y altamente pigmentados, así como conidios aseptados (Fig 2.1).

En cuanto al análisis filogenético, se obtuvo un alineamiento total de 47 taxa, con una matriz conjunta de 908 caracteres (incluyendo gaps), a partir de TEF (190 caracteres), ACT (231 caracteres) e ITS (487 caracteres), incluyendo a los grupos externos *Cercospora beticola*, *C. sphaerospermum* y *C. herbarum*. Los mejores modelos de sustitución nucleotídica fueron: para ITS y ACT, el K80+G; para TEF el mejor fue GTR+G. Estos modelos se utilizaron para evaluar la consistencia de los árboles obtenidos, mediante Neighbour-Joining.

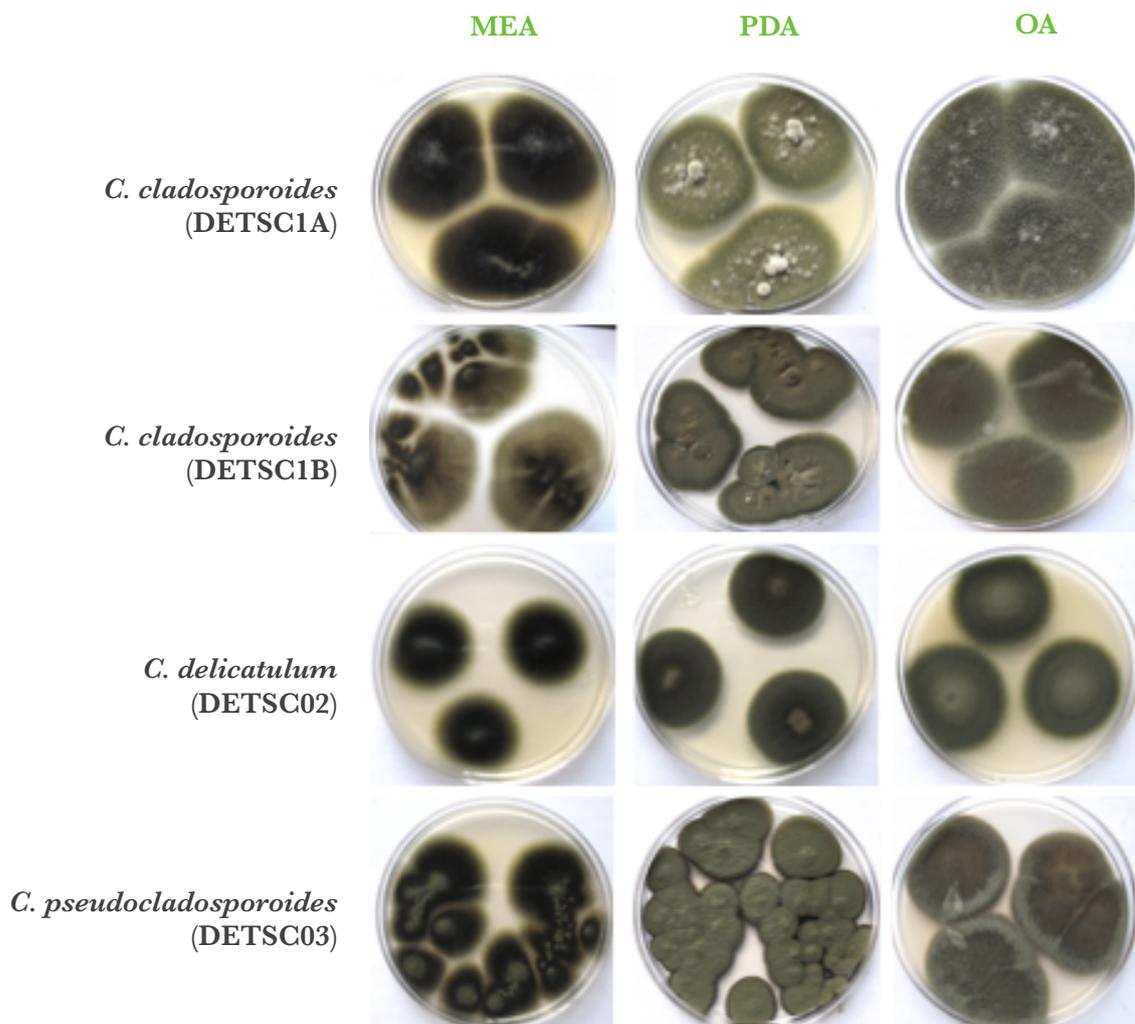


**Figura 2.1. Morfología del conidióforo y conidios de especies de *Cladosporium* aisladas a partir de *P. horiana*.** A) *C. cladosporoides* (DETSC1A), B) *C. cladosporoides* (DETSC1B), C) *C. delicatulum* (DETSC02), D) *C. pseudocladosporoides* (DETSC03).

Basados en la morfología *in vitro*, detallada en la Fig. 2.1 y 2.2, la identificación a especie con las claves de Bensch *et al.* (2010; 2012), así como el análisis molecular de tres regiones genómicas (números de acceso en el Anexo I), los cuatro aislamientos obtenidos: DETSC1A, DETSC1B, DETSC02 y DETSC03 corresponden a tres especies bien definidas. A continuación se detalla su descripción.

### *Cladosporium delicatulum* Cooke

A esta especie pertenece el aislamiento DETSC02, con las siguientes características. Micelio inmerso, liso, septado y color café claro. Conidióforos pigmentados bien diferenciados, definidos, lisos, solitarios, terminales o laterales, erectos, en ocasiones septados y ramificados (ancho: 5.39-4.30-3.41  $\mu\text{m}$ ), con células conidiogénicas no diferenciadas y terminales, con 1-4



**Figura 2.2. Morfología de las colonias de *Cladosporium* aisladas en asociación con *P. horiana*, con tres medios de cultivo diferenciales. MEA=extracto de malta agar, PDA= papa dextrosa agar, OA= avena agar**

loci engrosados y más oscuros en el ápice. Ramoconidios cilíndrico-oblongos, lisos, café claro, originándose del conidióforo, en ocasiones 1 septo, característicos por tener más de una cicatriz engrosada en alguno de los extremos ( $17.82-10.86-7.02 \times 4.22-3.59-3.08 \mu\text{m}$ ). Es difícil distinguir entre ramoconidios primarios, secundarios, etc. Conidios numerosos, catenados, cadenas de hasta 5 esporas, terminales: globoso, subgloboso a obovoide, intercalares: limoniforme, elipsoidal, ovoides a obovoides, café claro, aseptados ( $5.44-4.16-2.19 \times 4.9-2.74-1.93 \mu\text{m}$ ), lisos con hila conspicuos oscuros y engrosados, generalmente 1 en cada extremo. Fig. 2.1.

Las colonias en MEA son flocosas, micelio inmerso y difuso, gris olivo oscuro, al reverso oliváceas oscuras, sin exudados. En PDA superficie completamente aterciopelada, gris oliváceo oscuro, al reverso olivo oscuro, sin micelio aéreo, sin exudados. En OA aterciopeladas a polvorizadas, gris oscuro, al reverso gris olivo oscuro, sin micelio aéreo, sin exudados. Esporulación profusa en todos los medios. Fig. 2.2.

Respecto a la identificación molecular, en los resultados de BLAST (NCBI), para todas las regiones amplificadas se obtienen porcentajes de identidad con *Cladosporium delicatulum* del 100% y con valores de E muy cercanos a 0.0. En el análisis filogenético se incluyen los únicos 11 aislamientos de *C. delicatulum* reportados, provenientes principalmente de sustratos no biológicos (Anexo I). Nuestras secuencias se agrupan con altas probabilidades posteriores (0.99) a los otros 11 aislamientos, con consistencia en Neighbor-Joining (Anexo II); así mismo se observa una separación de nuestro aislamiento en la base del grupo, igual sostenida por valores cercanos a 0.99. Esta especie es monofilética, claramente divergente dentro de las especies estudiadas y estrechamente relacionada, con valores cercanos a 0.97, al linaje 4 de *C. cladosporioides* y con valores cercanos a 0.99 a los linajes 1 y 2 de *C. cladosporioides*. Fig. 2.3

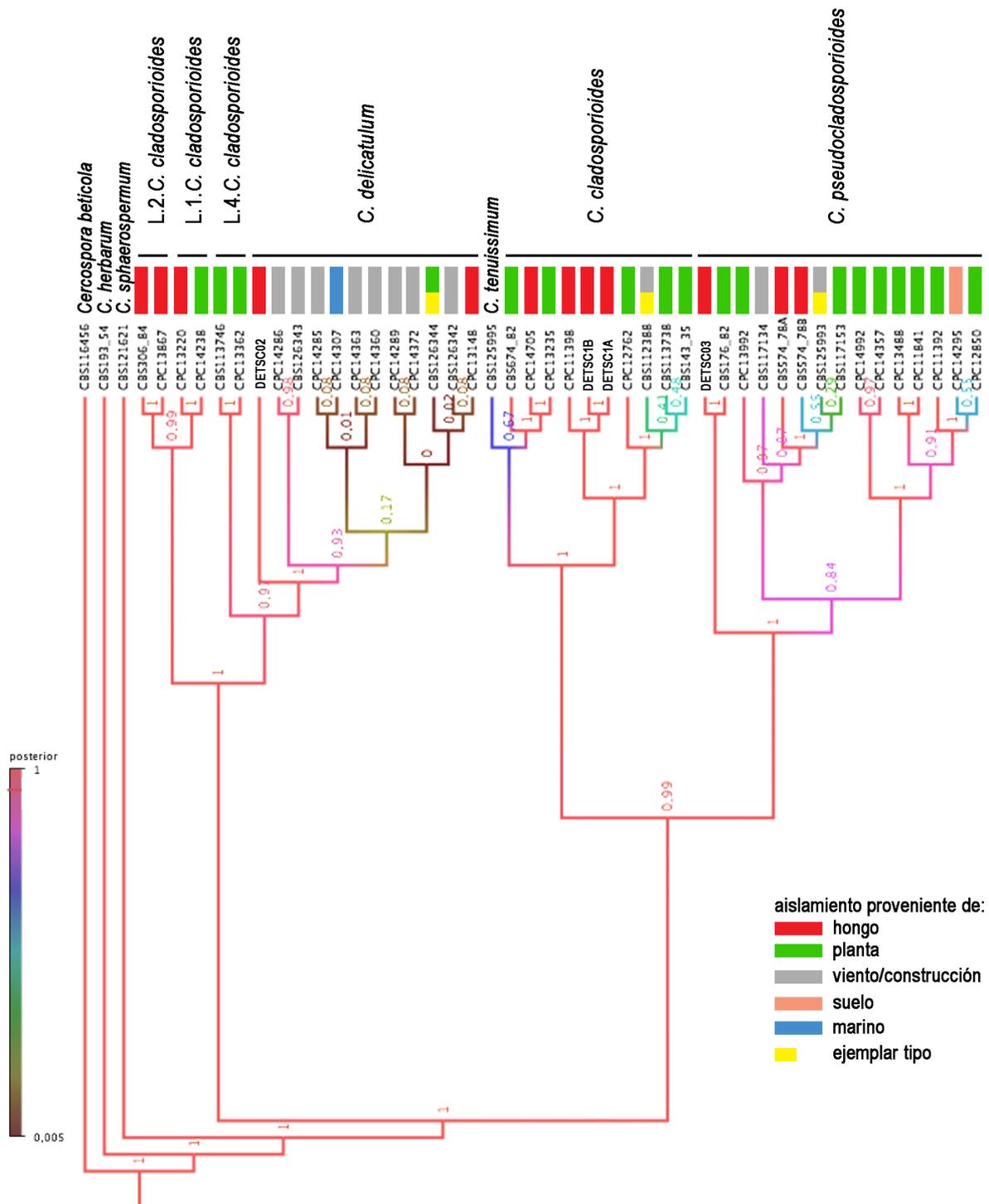
### ***Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries**

A esta especie pertenecen los aislamientos DETSC1A y DETSC1B, con las siguientes características. Micelio inmerso, liso, septado, y subhialino. Conidióforos pigmentados bien diferenciados, solitarios sin ramificaciones, lisos, terminales o laterales, erectos (ancho, DETSC1A:  $3.63-3.1-2.77 \mu\text{m}$ ; DETSC1B  $3.83-3.44-2.91 \mu\text{m}$ ), con células conidiogénicas no diferenciadas terminales, 3-4 loci engrosados y oscuros en el ápice. Ramoconidios cilíndrico-

oblongos, lisos, café claro originándose del conidióforo, característicos por tener más de una cicatriz engrosada en alguno de los extremos (DETSC1A: 18.15-9.27-5.47 × 3.83-2.96-2.43 μm; DETSC1B: 30.2-12.43-6.39 × 3.41-2.74-2.34 μm). Es difícil distinguir entre ramoconidios primarios, secundarios, etc. Conidios numerosos, catenados de hasta 9 esporas, cadenas ramificadas, terminales: ovoides, obovoides a subglobosos, intercalares: limoniformes, ovoides a obovoides (DETSC1A: 5.02-4.08-2.94 × 2.94-2.18-1.77 μm; DETSC1B: 5.55-4.20-2.80 × 3.37-2.28-1.59 μm), café claro, aseptados, con hila engrosados y conspicuos, generalmente 1 en cada extremo. Fig. 2.1.

Las colonias en medio MEA flocosas, oliváceas oscuras, al reverso oliváceas oscuras, micelio inmerso y difuso, sin exudados. En medio PDA oliváceas (DETSC1A) a gris-oliváceas (DETSC1B), al reverso olivo oscuro, superficie plana aterciopelada, en ocasiones plegada al centro, micelio aéreo agrupado sólo formado en DETSC1A, sin exudados. En OA polvorientas a aterciopeladas, oliváceas a gris-oliváceas, al reverso gris oliváceas, micelio aéreo en DETSC1A, sin exudados. Esporulación profusa en todos los medios. Debido a estas características diferenciales, particularmente en PDA y OA, nos permitimos mencionar la presencia de dos cepas (DETSC1A y DETSC1B), que serán trabajadas independientemente. Fig. 2.2.

Respecto al análisis molecular mediante BLAST (NCBI), indicó para todas las regiones porcentajes de identidad con *Cladosporium cladosporioides* por arriba del 98% y con valores de E muy cercanos a 0.0. En el análisis filogenético, se incluyen 16 aislamientos de *C. cladosporioides* provenientes de diversos sustratos (Anexo I). Nuestras secuencias se agrupan con altas probabilidades posteriores en el “core” de *C. cladosporioides* (Fig. 4), consistencia verificada por Neighbor-Joining de cada una de las regiones (Anexo II). Dentro del core se encuentran tres grupos principales, todos ellos apoyados por probabilidades posteriores cercanas a 0.99, el primero agrupa a sólo 3 aislamientos obtenidos a partir de hongos, incluyendo los nuestros. El segundo grupo definido por las secuencias tipo, agrupa a aislamientos asociados a plantas, finalmente el tercero agrupa a aislamientos provenientes de hongos y plantas, pero con una probabilidad posterior de 0.67 en relación a las secuencias tipo *C. tenuissimum*, especie utilizada como guía por sus reportes de hiperparasitismo de royas y producción de un tipo particular de metabolitos secundarios. Los otros aislamientos se encuentran en la base del árbol relacionados con *C. delicatulum*, agrupados en tres linajes claros,



**Figura 2.3. Análisis filogenético de las especies de *Cladosporium* asociadas a *Puccinia horiana*.** Consenso de 20 001 árboles generados por análisis bayesiano de secuencias obtenidas de Bensch *et al.* (2010; 2012) y las generadas el presente trabajo. Con un alineamiento concatenado de ITS, ACT, TEF. Probabilidades posteriores de los clados reportadas en los nodos. En la clave se muestran los detalles del sustrato donde fueron aisladas esas cepas. El árbol fue enraizado con secuencias (ITS, ACT, TEF) de *Cercospora beticola*, así mismo se encuentran los aislamientos tipo de *Cladosporium herbarum* y *C. sphaerospermum* y *C. tenuissimum*.

por lo que *C. cladosporioides* resulta ser polifilético. Fig. 2.3.

### ***Cladosporium pseudocladosporioides* Bensch, Braun & Crous**

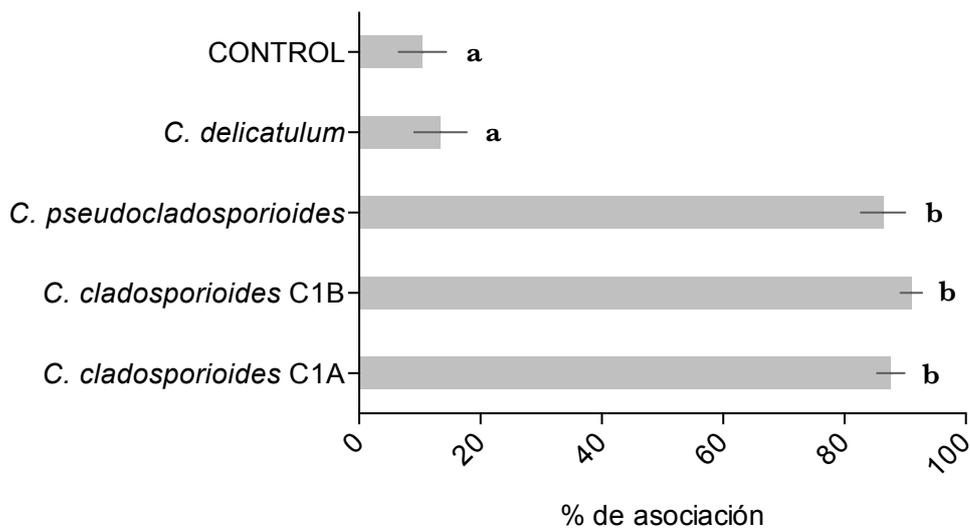
Finalmente, el aislamiento DETSC03 corresponde a esta especie, con las siguientes características. Micelio inmerso, liso, septado y subhialino. Conidióforos pigmentados bien diferenciados, solitarios, sin ramificaciones, en ocasiones septados, terminales o laterales, erectos (ancho: 4.57-3.44-2.21  $\mu\text{m}$ ) y lisos; células conidiogénicas no diferenciadas, terminales, 3-4 loci bien diferenciados y engrosados. Ramoconidios cilíndrico-oblongos, lisos, café claro originándose en el conidióforo, característicos por tener más de una cicatriz engrosada en alguno de los extremos (38.23-13.94-7.37  $\times$  4.76-3.57-2.43  $\mu\text{m}$ ). Es complicado distinguir entre ramoconidios primarios, secundarios, etc. Conidios numerosos, catenados de alrededor de 6 esporas, cadenas ramificadas, aseptados (7.59-5.64-4.08  $\times$  3.97-2.76-1.82  $\mu\text{m}$ ), terminales: obovoide, ovoide a elipsoide, intercalares: limoniforme a elipsoide, lisos, café claro, con hila engrosados y conspicuos, generalmente uno en cada extremo. Fig. 2.1.

Las características de las colonias en medio de cultivo MEA son flocosas, oliváceas oscuras, al reverso oliváceas oscuras, micelio inmerso y difuso, sin exudados. En medio PDA de aterciopeladas a polvorientas, en ocasiones plegada al centro, olivo a olivo oscuro con los bordes más oscuros, al reverso café rojizo, sin micelio aéreo ni exudados. En medio OA aterciopeladas a polvorientas en el margen, al centro micelio inmerso, gris a café grisáceo, al reverso café rojizo. Esporulación profusa en todos los medios. Fig. 2.2.

En cuanto a la identificación molecular, los resultados de BLAST (NCBI), para todas las regiones obtienen porcentajes de identidad con *Cladosporium pseudocladosporioides* por arriba del 99% y con valores de E muy cercanos a 0.0. En el análisis filogenético se incluyen 14 aislamientos de *C. pseudocladosporioides* provenientes de diversos sustratos (Anexo I). Nuestras secuencias se agrupan con altas probabilidades posteriores con los otros 14 aislamientos, consistencia verificada por Neighbor-Joining de cada una de las regiones (Anexo II). La especie parece ser monofilética, pero dentro se encuentran tres grupos principales bien soportados estadísticamente. Nuestro aislamiento se agrupa con otro obtenido a partir de material vegetal, formando una sola rama, aunque efectivamente diferentes por valor cercano a 0.99. El grupo anterior se separa en la base con los otros dos grupos por un valor de 0.99.

El segundo y tercer grupo están bien soportados por un valor de 0.84, dentro del segundo podemos observar aislamientos provenientes de una diversidad de sustratos, mientras que en el tercer y último en su mayoría se encuentran aislados de material vegetal. Fig. 2.3.

Aunque se identificaron tres especies distintas (cuatro aislamientos), la Fig. 2.4 y 2.5. muestran que sólo *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* se asociaron de manera significativa y causan los signos observados sobre *Puccinia horiana*.



**Figura 2.4. Porcentaje de parasitismo de las diferentes especies y aislamientos de *Cladosporium* en pústulas de *Puccinia horiana*.** Como control se muestra el porcentaje de pústulas parasitadas sólo con agua destilada estéril. Entre cada tratamiento, columnas con letras diferentes indican diferencias significativas,  $P < 0.05$  (REGW-F). Las barras representan el error estándar.



**Figura 2.5. Parasitismo de diferentes especies y aislamientos de *Cladosporium* en pústulas de *Puccinia horiana*.** A) Control sin roya, sólo se muestra una hoja en donde se aplicó *C. cladosporioides* DETSC1A, aunque ninguna especie/aislamiento parasito las hojas de crisantemo sanas; B) Control con roya y agua+0.01%Tween20; C) Tratamiento con *C. cladosporioides* DETSC1A; D) Tratamiento con *C. cladosporioides* DETSC1B; E) Tratamiento con *C. pseudocladosporioides* DETSC03; F) Tratamiento con *C. delicatulum* DETSC02.

## Discusión

Aunque en su mayoría el género *Cladosporium* es reconocido como saprófito, hay excepciones de importancia agrícola (Hyde *et al.*, 2013), como *C. cucumerinum*, que causa lesiones foliares en cucurbitáceas (Laborda y Maxwell, 1976), *C. caricinum* que afecta al género *Carica* (Bensh *et al.*, 2012) o de importancia ornamental como *C. colocasiae* afectando al género *Colocasia* (Holcomb, 1989) y *C. heterophragmatis* que causa daño foliar en *Heterophragma adenophyllum* (Schubert y Braun, 2004), por lo que la identificación precisa de sus miembros no es un asunto trivial. Así, se ha propuesto dejar de lado las características morfológicas para la identificación a nivel de especie debido a su plasticidad y complejidad, abriendo paso a la clasificación basada en marcadores moleculares con ADNr-ITS, ACT y TEF, útiles en la reorganización y asignación moderna de especies de *Cladosporium* (Schubert *et al.*, 2007; 2009; Bensh *et al.*, 2012; Hyde *et al.*, 2013).

La región ITS a rangos intraespecíficos no muestra una efectiva diferenciación (Zalar *et al.*, 2007; Bensh *et al.*, 2010), por lo que aunque es un buen apoyo para la distinción a rasgos genéricos, su uso es limitado. Así, se ha propuesto la utilización de genes codificantes de proteínas, debido a la resolución intraespecífica que poseen (Schoch *et al.*, 2012). Particularmente TEF, que generalmente posee una sola copia en el genoma y sintetiza el factor de elongación de la traducción, molécula que controla la tasa y fidelidad de la síntesis de proteínas (Roger *et al.*, 1999; Helgason *et al.*, 2003), y ACT, que igualmente posee una sola copia en el genoma y codifica la actina, una proteína del citoesqueleto. Ambos marcadores son altamente conservados, aunado a que su variabilidad intraespecie es muy baja, por lo que son preferidos en la tipificación molecular de hongos (Voigt y Wöstemeyer, 2000; Helgason *et al.*, 2003). Voigt y Wöstemeyer (2001) analizando la filogenia de los Zygomycetes menciona que la utilización de ambas regiones da como resultado una buena resolución filogenética, además de que es posible su concatenación con ADNr (i.e. ITS), robusteciendo así la información filogenética. En nuestro caso, sólo ACT y TEF se utilizan para el soporte de los clados, efectivamente congruentes para todas las especies (Anexo II), hecho también reportado por Bensh *et al.* (2010).

Basados en lo anterior y en la imposibilidad de que la morfología explique la diversidad de especies en el género *Cladosporium*, actualmente el concepto de “especie filogenética” ha

mostrado ser por demás útil. Definiéndola como “*el taxón menos inclusivo reconocible en una clasificación, cuyos organismos se agrupan debido a la evidencia de monofilia*” (Seinfert *et al.*; 2011; Morrone, 2013). Ligado con lo anterior, el género es reconocido por la presencia de especies crípticas, definidas como “*especies filogenéticas pero distintas genéticamente, que no pueden ser distinguidas usando caracteres morfológicos*” (Seinfert *et al.*, 2011; Bensch *et al.*, 2012). En este contexto, las especies identificadas en éste estudio se agrupan en un sólo complejo de especies dentro de *Cladosporium*, el complejo definido por *Cladosporium cladosporioides*, confirmando la agrupación previamente reportada por diversos autores (Schubert *et al.*, 2007; Zalar *et al.*, 2007; Bensch *et al.*, 2010; 2012).

El aislamiento DETSC02, corresponde a *Cladosporium delicatulum*, originalmente descrita en hojas muertas (Cooke, 1876), así mismo se ha aislado de frutos, tallos o tubérculos muertos y en lesiones causadas por otros hongos (Bensch *et al.*, 2012), por lo que es una especie reconocida en su totalidad como saprófita (Bensch *et al.*, 2010). Esta condición se ve reflejada en el número de aislamientos provenientes de fuentes como polvo, viento o rocas (Anexo I). Así mismo, es cosmopolita, con aislamientos de Asia (Irán, China, India y Taiwan), Europa (Francia, Alemania y Dinamarca) y América (EUA, México y Uruguay) según Bensch *et al.* (2010; 2012), Amirmijani *et al.* (2015) y Gómez-Cornelio *et al.* (2012).

Morfológicamente el aislamiento DETSC02 presenta ramoconidios y conidios un poco más pequeños que los reportados para *C. delicatulum*, aunque con las demás características morfológicas distintivas (Bensch *et al.*, 2012), pero se distingue de las otras especies analizadas por la presencia de conidióforos ramificados y conidios más globosos que los limonifórmes típicos de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*. Así entonces el aislamiento DETSC02 de *C. delicatulum* se agrupa con los obtenidos de Bensch *et al.* (2010), aunque con una clara diferenciación en la base del clado atribuible a las diferencias poblacionales que existen entre los aislamientos europeos (provenientes de Alemania y Dinamarca; Anexo I) con el mexicano. El aislamiento europeo proveniente de *Puccinia bromina* spp. *symphyti-bromarum* (CPC13148), no se encuentra relacionado con el obtenido de *P. horiana*, lo que junto a la topología del árbol, indica que el habito saprófita prevalece en la especie y que ambos aislamientos, podrían ser consecuencia de su capacidad de colonizar lesiones causadas por otros hongos (Bensch *et al.*, 2010; 2012). Afirmación sostenida por el porcentaje de parasitismo en *Puccinia horiana*, así esta especie podría aprovecharse del efecto de las otras especies aisladas, invadiendo de forma

secundaria. O bien alimentarse del tejido vegetal muerto, gracias al daño excesivo en últimos estadios de la epidemia causada por *P. horiana*.

Por otro lado, los aislamientos DETSC1A y DETSC1B, corresponden a *Cladosporium cladosporioides*, una de las especies de hongos más comunes, cosmopolitas y saprófitas que existen, tan es así que su determinación exacta ha llevado a muchos problemas. Morfológicamente nuestros aislamientos coinciden con lo reportado (Bensh *et al.*, 2012), aunque el ancho del conidióforo es más delgado. En cuanto a los dos aislamientos obtenidos, la diferencia radica en la posibilidad de que DETSC1A forme micelio aéreo a los 14 días, que podría estar relacionado con la plasticidad morfológica de las especies de *Cladosporium*.

Originalmente *C. cladosporioides* fue aislada de hojas de invierno de *Hydrangea* sp. y reasignado a partir de aislamientos provenientes de aire encerrado (Bensh *et al.*, 2010), se ha encontrado principalmente en plantas marchitas o como invasor secundario de tejido necrótico, así mismo se ha aislado como endófito, de viento, suelo, alimentos, material de construcción, agua y muchos otros sustratos más (Bensh *et al.*, 2010; 2012). Esta diversidad de sustratos se ven reflejados en las secuencias obtenidas de Bensh *et al.* (2010, Anexo I). En realidad Bensh *et al.* (2010) la circunscriben como un complejo de especies indistinguibles morfológicamente, pero definidas filogenéticamente, por lo que logran determinar 22 nuevas especies dentro de *C. cladosporioides* s. lat., siendo la razón de que se incluyan los linajes 1, 2, 4 y el “core” de la especie en nuestro análisis, con la finalidad de determinar si nuestros aislamientos están relacionados con alguno de los linajes o a lo que se conoce como *C. cladosporioides* s. str. Debido a que lo que Bensh *et al.* (2010) definía como linaje 3, ahora es la especie definida *C. perangustum*. Estos linajes externos, se encuentran más relacionados con *C. delicatulum*, que con *C. cladosporioides* s. str., como ha sido reportado previamente (Bensh *et al.*, 2010, Anexo II), lo que apoya la idea de que *C. cladosporioides* es polifilética, así el linaje 2, se encuentra sólo definido por cepas micofilicas, obtenidas a partir de *Puccinia alli* y *Leptosphaeria* sp. y el linaje 4 por cepas aisladas de plantas de cereza y *Paeonia obovata* (Anexo I).

Los aislamientos DETSC1A y DETSC1B corresponden a *C. cladosporioides* s. str., agrupados junto a *C. tenuissimum*, entonces se podría hablar de la posibilidad de una diferenciación debido a los hábitos de vida, ya que se muestran 3 clados, 2 de ellos bien soportados. El primero de ellos con un valor de 0.67, son aislamientos relacionados a *C. tenuissimum*,

obtenidos a partir de material vegetal y en asociación con chaesmotecios de *Phyllactinia guttata* (Anexo I). El siguiente grupo, con un valor de 0.99, se caracteriza por presentar en su mayoría aislamientos provenientes de material vegetal, incluyendo así a el aislamiento tipo de la especie. Los aislamientos DETSC1A y DETSC1B obtenidos a partir de *P. horiana* se encuentran agrupados, con un valor de 0.99, a un aislamiento (CPC11398) obtenido de *Phragmidium griseum* (Pucciniomycetes). La relación de *C. cladosporioides* con diversos hongos ha sido previamente reportado (Sakagami *et al.*, 1995), así Zhan *et al.* (2014) demostró la existencia de un aislamiento de esta especie parasitando urediosporas de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, lo que confirma la existencia de un grupo (quizá un genotipo) dentro de *C. cladosporioides* capaz de asociarse a diferentes royas. Basados en estos patrones filogenéticos, se puede decir que es posible la presencia de especies crípticas dentro de *C. cladosporioides* s. str., duda que había tratado de subsanarse con el trabajo de Bensch *et al.* (2010), pero que generó mucha incertidumbre sobre la identidad y explicación evolutiva de ésta especie, o bien, que su plasticidad genética es muy amplia y puede aprovechar diversos sustratos, llevando a la formación de razas, como las que se conocen en el antiguo miembro del género: *Passalora fulva* (Day *et al.*, 1953).

Finalmente, el último aislamiento: DETSC03, corresponde a la especie *Cladosporium pseudocladosporioides* recientemente descrita por Bensch *et al.* (2010) debe su nombre a la similitud morfológica que presenta con *C. cladosporioides* s. str., difícil de determinar. El aislamiento DETSC03 presenta conidios en general menos alargados que los reportados, aunque con las demás características morfológicas dentro de la descripción (Bensch *et al.*, 2012). La diferencia clara entre *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, es que el último presenta ramoconidios y conidios más alargados. Originalmente aislada de aire exterior, se ha encontrado en material vegetal y cuerpos fructíferos de hongos, así como a partir de viento, suelo, agua y alimentos (Bensch *et al.*, 2012; Plakthongdee *et al.*, 2013), recientemente se ha encontrado en manchas necróticas de *Rubus* sp. (Amirmijani *et al.*, 2014), epífito en el alga *Asparagopsis taxiformis* (Garzoli *et al.*, 2014), endófito en *Nuphar lutea* (Ellsworth *et al.*, 2013), así y patógeno oportunista de humanos (Sandoval-Denis *et al.*, 2015), diversidad de sustratos que trataron de verse incluidos en los aislamientos utilizados de Bensch *et al.* (2010), aunque Bensch *et al.* (2012) la reconoce solamente como una especie saprófita. Se encuentra ampliamente distribuida, con aislamientos según Bensch *et al.* (2010, 2012), Gómez-Cornelio *et al.*, (2012), Amirmijani *et al.* (2014) y Plakthongdee *et al.*, (2013) en África (Uganda y Sudáfrica), Asia (Irán, Indonesia,

Tailandia y Corea del Sur), Australia, Nueva Zelanda, Europa (Francia, Alemania, Italia, Holanda, Rumania, Rusia, Eslovenia), America (México, EUA, Canadá, Brasil, Chile).

*Cladosporium pseudocladosporioides* está más relacionada con *C. cladosporioides* y es claro que hay una diferenciación importante en tres sub-clados, así el clado más tempranamente divergente le corresponde a DETSC03, agrupado con uno europeo obtenido del helecho *Pteridium aquilinum* (CBS176.82). Bensch *et al.* (2012) menciona la posibilidad de que *C. pseudocladosporioides* en realidad esté conformado por especies crípticas, así la diversidad de hábitos ecológicos, junto con los reportes de diversos hábitos de vida, como saprófito, endófito, epífito, además de patógeno de humanos y de plantas (Bensch *et al.*, 2012; Ellsworth *et al.*, 2013; Amirmijani *et al.*, 2014; Garzoli *et al.*, 2014; Sandoval-Denis *et al.*, 2015) y la distribución de algunos de ellos en el árbol obtenido, apoyan la idea de la presencia de diferentes especies crípticas dentro de *C. pseudocladosporioides*. Es importante mencionar que efectivamente *C. pseudocladosporioides* es una de las especies que son parásitas de *P. horiana*, replicándose los signos observados en campo, por lo que nuestro aislamiento parece ser completamente micofílico, observación que podría repercutir en el análisis de *C. pseudocladosporioides* s. lat.

De manera general en las tres especies encontradas, los patrones filogenéticos observados, hablan de la tendencia a una especialización nutricional clara en grupos como *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, dejando de lado a *C. delicatulum* debido a la poca diversidad de sustratos en donde se ha encontrado. Esta especialización puede deberse a la plasticidad genética, bien conocida a lo largo de los Capnodiales (Crous *et al.*, 2009). Así podríamos decir que aunque *C. delicatulum* no cause los signos observados en campo, podría actuar en conjunto con *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, llegando como invasor secundario. Por ejemplo, Gómez-Cornelio *et al.* (2012) en estudios de sucesión en rocas calizas, encuentran, entre muchas especies de hongos, que *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* colonizan primero el sustrato rocoso, meses después llega y coloniza *C. delicatulum*, aunque son modelos diferentes, se apoya la idea anterior de sucesión y se explica la presencia de *C. delicatulum*.

Por otro lado, la co-ocurrencia de varias especies asociadas a un sólo síntoma, por ejemplo en especies vegetales, es común en géneros como *Mycosphaerella* (Mycosphaerellaceae) y

*Terathosphaeria* (Teratosphaeriaceae; Crous *et al.*, 1998), especies muy cercanas filogenéticamente a *Cladosporium*, también Schubert *et al.* (2007) encuentra dentro del complejo *C. herbarum*, diferentes genotipos coexistiendo en el mismo espacio, determinando que éstos están sometidos a una baja presión de selección y que son mantenidos en el tiempo por las bajas tasas de recombinación de los hifomicetes, lo que aumenta la posibilidad de encontrar diferentes genotipos, ocurriendo en un mismo espacio. Lo que podría ser una explicación a la co-ocurrencia de especies distintas, pertenecientes al mismo complejo taxonómico, a partir de lesiones causadas por *P. horiana*, siendo similar a lo que ocurre con patógenos vegetales que actúan en complejo con varias especies (Crous y Gronewald, 2005).

Dentro de las excepciones al hábito saprófito dentro de *Cladosporium*, se encuentran las 31 especies reportadas como “fungícolas” en la Tabla 2.1., desde las bien definidas ecológicamente como *C. aecidiicola*, hasta las de estatus dudoso como *C. stromatum*. Particularmente, la asociación de *Cladosporium* a diferentes especies de royas (Pucciniomycetes) no es un evento nuevo (Tabla 2.1; Moricca y Assante, com. pers.), aunque sólo en pocas ocasiones se ha reportado y tratado de explicar esta asociación (Moricca *et al.*, 2001; Assante *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 2014), con miras en el control biológico. Ahora bien, en el caso de *Puccinia horiana*, sólo existían reportes de *C. uredinicola* y *C. sphaerospermum* parasitando a ésta roya (Srivastava *et al.* 1985; Sheta, 1996), por lo que las especies encontradas son nuevos reportes de parasitismo en *P. horiana*. En México el reporte de *Cladosporium* sp. carece de sustento taxonómico, ya que aunque es correcta su asignación al género, no fue posible realizar la identificación a especie, nuestra colecta se llevó a cabo en la misma localidad de García-Velasco *et al.* (2005), por lo que podríamos hipotetizar que alguna de estas especies, o el complejo en su totalidad, sustentan los resultados estos autores.

La precisa identificación de las tres especies de *Cladosporium* mediante diversas aproximaciones, así como la relación con sus hábitos de vida, es un auxilio en el soporte del control biológico de la roya blanca del crisantemo. Así mismo ofrece un sustento a su clasificación taxonómica, a la generación de hipótesis respecto a los hábitos nutricionales y a su presencia como un complejo definido de especies con capacidad de incidir en el desarrollo normal de *P. horiana*, con miras claras en su progreso como potenciales agentes de control biológico.

## Conclusiones

Los cuatro aislamientos de *Cladosporium* sp., obtenidos de muestras provenientes de un invernadero comercial de crisantemo dañado con roya blanca, correspondieron a las especies: *Cladosporium delicatulum* (DETSC02), *C. pseudocladosporioides* (DETSC03), *C. cladosporioides* (DETSC1A y DETSCB). Solamente los aislamientos de *C. pseudocladosporioides* y *C. cladosporioides* parasitaron de manera estadísticamente significativa con *Puccinia horiana*.

## Referencias

- Amirmijani, A.R., Khodaparast, S.A. y Zare, R. 2014. Contribution to the identification of *Cladosporium* species in the North of Iran. *Rostaniha*, 15: 133-145.
- Amirmijani, A.R., Khodaparast, S.A. y Zare, R. 2015. Additions to the knowledge of the genus *Cladosporium* in Iran. *Mycologia Iranica* 2: 11-21.
- Assante, G, Maffi, D., Saracchi, M., Farina, G., Moricca, S., Ragazzi, A. 2004. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. *Mycological Research*, 108: 170-182.
- Barbosa, M.A., Michereff, S. y Mora-Aguilera, G. 2006. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem branca do crisântemo. *Summa Phytopathologica*, 32: 57-62.
- Barros, S.T., Oliveira, N., Bastos, S. y Maia, L. 1999. Hyperparasitism of *Cladosporium uredinicola* over *Puccinia puta* on the host *Ipomea fistulosa*. *Mycologist*, 13: 23-24.
- Bensh, K., Groenewald, J.Z., Starink-Willemsse, M., Andersen, B., Sumerell, B.A., Shin, H.D., Dugan, F.M., Schroers, H.J., Braun, U. y Crous. P.W. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Micology*, 67: 1-94.
- Bensh, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. y Crous, P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in mycology*, 72: 1-401.
- Braun, K., Crous, P., Dugan, F., Groenewald, J.Z. y DeHogg, S. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycological Progress* 2:3-18.
- Carbone I. y Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.

- Cooke, M.C. 1876. Some Indian fungi. *Grevillea* 5: 14–17.
- Crous, P.W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of Eucalyptus. *Mycologia Memoir* 21: 1–170.
- Crous, P.W., Groenewald, J.Z. 2005. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. *Australasian Plant Pathology* 34: 463–470.
- Crous, P.W., Braun, U. y Groenewald, J.Z. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Micology*, 58: 1-32
- Crous, P.W., Schoch, C.L., Hyde, K.D., Wood, A.R., Guedian, C., de Hoog, G.S. y Groenewald, J.Z. 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Micology*, 64: 14-47.
- Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z. y Samson, R.A. 2009. *Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series*, 268 p.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- David, J.C. 1997. A contribution o the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. *Mycological papers* 172: 1-57.
- Day, P.R. 1953. Physiologic specialization of *Cladosporium fulvum* in England and wales. *Plant pathology*, 3(2): 35-39.
- de Hoog G.S., Guého E., Masclaux F., Gerrits van den Ende AHG, Kwon-Chung,KJ, McGinnis MR. 1995. Nutritional physiology and taxonomy of human- pathogenic *Cladosporium-Xylohypha* species. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 33: 339–347.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. y Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution* 29: 1969-197.
- Dugan, F., Schubert, K. y Braun, U. 2004. Check-list of *Cladosporium* names. *Schlechtendalia*, 11:1-119.
- Ellsworth, K., Clark, T., Gray, C. y Johnson, J. 2013. Isolation and bioassay screening of medicinal plant endophytes from eastern Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 59: 761-765.
- Falcon, L. y Valera, A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. In: Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre, X. (Eds.). *Ecología Molecular. SEMARNAT*. 499-516 pp.

- García-Velasco, R., Zavaleta-Mejía, E. y Rojas-Martínez, R. 2005. Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. Causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzscvelev). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23: 79-86.
- Garzoli, L., Gnani, G., Varese, G. y Picco, A. 2014. Mycobiota associated with the rhodophyte alien species *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan de Saint-Leon in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology*, 35:1-10.
- Gómez-Cornelio, S., Mendoza-Vega, J., Gaylarde, C., Reyes-Estebanez, M., Morón-Ríos, A., de la Rosa-García, S.C., Ortega-Morales, B. 2012. Succession of fungi colonizing porous and compact limestone exposed to subtropical environments. *Fungal Biology*, 116: 1064-1072.
- Helgason, T., Watson, I. y Young, P. 2003. Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi:Glomeromycota) from actin and elongation factor 1 $\alpha$  sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 229: 127-132.
- Heuchert, B., Braun, U. y Schubert, K. 2005. Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). *Schlechtendalia*, 13:1-78.
- Holcomb, E. 1989. First report of *Cladosporium colocasiae* on Taro in the United States. *Plant Disease* 73: 938.
- Hyde et al. 2013. Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*, 63:1-313.
- Kiss, L. 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science* 59:475-83.
- Krangauz, R.A. 1970. К систематике грибов рода *Cladosporium* Fr. *Trudy Vsesoyuznogo Nachno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii* 29: 5–13.
- Laborda, F. y Maxwell, D.P. 1976. Ultrastructural changes in *Cladosporium cucumerinum* during pathogenesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 22: 394-403.
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.03.
- Morrone, J. 2013. *Sistemática: fundamentos, métodos y aplicaciones*. Facultad de Ciencias, UNAM. 505 p.
- Munsell Soil Color Chart. 1994. Macbeth Division of Kollmorgen instruments Corporation.
- Moricca, S., Ragazzi, A., Mitchelson, K.R. y Assante, G. 2001. Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta. *Phytopathology*, 91: 457-468.

- Moricca, S., Ragazzi, A. y Assante, G. 2005. Biocontrol of rust fungi by *Cladosporium tenuissimum*. en: Pei, M.H. y McCracken, A.R. (eds.). Rust diseases of Willow and poplar. CAB International. 213-219 pp.
- Plakthongdee, S., Cheewangkoon, S. y To-anun, C. 2013. Cladosporioid on monocotyledon plant from Thailand. *Journal of Agricultural Technology*, 9: 943-951.
- Prasil K. y de Hoog, G.S. 1988. Variability in *Cladosporium herbarum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 90:49-54.
- Roger, A., Sandblom, O., Doolittle, F. y Phillipe, H. 1999. An evaluation of elongation factor 1 $\alpha$  as a phylogenetic marker for Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 218-233.
- Sakagami, Y., Sano, A., Hara, O., Mikawa, T. y Marumo, S. 1995. Cladosporol,  $\beta$ -1,3-Glucan Biosynthesis Inhibitor, Isolated from Fungus, *Cladosporium cladosporioides*. *Tetrahedron letters*, 36: 1469-1472.
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D., Martin-Vicente, A., Cano-Lira, J., Wiederhold, N., Guarro, J. y Gené, J. 2015. *Cladosporium* species recovered from clinical samples in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, doi:10.1128/JCM.01482-15.
- Schoch, C., Schoemaker, R.A., Seifert, K., Hambleton, S., Spatafora, J. y Crous, P. 2006. A multigene phylogeny of the Dothiomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 98: 41041-1052.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., Chen, W y Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 6241-6246.
- Schubert, K. y Braun, U. 2004. Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 2. *Cladosporium* species occurring on hosts of the families Bignoniaceae and Orchidaceae. *Sydowia* 56: 296–317.
- Schubert, K., Braun, U. y Molenko, W. 2006. Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 5. Validation and description of new species. *Schlechtendalia*, 14:55-83.
- Schubert, K., Groenewald, J.Z., Braun, U., Dijksterhuis J., Starink, M., Hill, C.F., Zalar, P., de Hoog, G.S. y Crous, P. 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, (Capnodiales) with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology*, 58: 105-156.

- Seifert, K., Morgan Jones, G., Gams, W. y Kendrick, B. 2011. The genera of Hyphomycetes. CBS Biodiversity Series, 9: 1-997.
- Sharma, I.K. y Heather, W.A. 1983. Sensitivity to *Cladosporium* species of the reactions of cultivars of *Populus x euramericana* to races of *Melampsora larici-populina*. Forest Ecology and Management, 7: 49-56.
- Sharma, S., Sharma, R.C. y Mahlotra, R. 2002. Effect of the saprophytic fungi *Alternaria alternata* and *Cladosporium oxysporum* on germination, parasitism and viability of *Melampsora ciliata* urediniospores. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 109: 291-300.
- Sheta, W. 1996. Detection of *Cladosporium uredinicola* in Pustules of Chrysanthemum White Rust (*Puccinia horiana*). Plant Disease, 80: 599.
- Srivastava, A.K., Défago, G. y Kern, H. 1985. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. Phytopathology Z., 114: 73-78.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution:30 2725-2729.
- Voigt, K. y Wöstemeyer, J. 2000. Reliable amplification of actin genes facilitates deep-level phylogeny. Microbiological Research, 155: 179-195.
- Voigt, K. y Wöstemeyer, J. 2001. Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1 genes. Gene, 270: 113-120.
- von Arx J.A. 1983. *Mycosphaerella* and its anamorphs. Proceedings, Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen C, 86: 15-54.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications 18, 315-322.
- Zalar, P., de Hoog, G.S., Schroers, H.J., Crous, P., Groenewald, J.Z. y Gunde-Cimerman. 2007. Phylogeny and ecology of ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from saline environments. Studies in Mycology, 58: 157-183.
- Zhan, G., Tian, Y., Wang, F., Chen, X., Guo, J., Jiao, M., Huang, L., Kang, Z. 2014. A Novel Fungal Hyperparasite of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the Causal Agent of Wheat Stripe Rust. PLoS One, 9: e111484

## CAPÍTULO III

# Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn.

### Introducción

*Cladosporium* sp., es un género comúnmente encontrado en diversos sustratos (Bensh *et al.*, 2012), particularmente en ocasiones en interacción con otros hongos (Tabla 2.1), por lo que se ha explorado como agente de control biológico de algunas enfermedades (Spreafico, 2004; Assante *et al.*, 2005), aunque sólo en pocos casos se conoce el mecanismo de acción particular de éstas especies (Assante *et al.*, 2004). Los mecanismos dentro de las asociaciones micofílicas en su mayoría se engloban dentro del concepto más amplio de antagonismo, en donde la competencia por nutrientes o espacio, lleva al éxito del organismo con mayores ventajas adaptativas (Gabriel y Cook, 1990; Schippers, 1992; Cousteaudier, 1992; Narayanasamy, 2013a). Dentro de este contexto se ubica el concepto de hiperparasitismo (también como una extensión del parasitismo), en donde una especie obtiene nutrientes a costa de otra especie parásita de un organismo diferente (Cook y Baker, 1983; Gabriel y Cook, 1990; Pal y MacSpadden, 2006; Narayanasamy, 2013a). La determinación adecuada de estas interacciones puede tener como consecuencia su aprovechamiento en el control biológico (Burgess, 1998; Butt y Copping, 2000; Whipps, 2001; Whipps y McQuilquén, 2009; Narayanasamy, 2013b) como es el caso de las diversas especies y cepas de *Trichoderma* utilizadas en el control de varias enfermedades (Whipps y Lundsden, 2001; Benítez *et al.*, 2004) o de miembros de *Fusarium* sp. parasitando a *Hemileia vastatrix*, la roya del café (Haddad *et al.*, 2014).

Es por esto, que el presente trabajo, tuvo por objetivo determinar los mecanismos de antagonismo entre los aislamientos de *Cladosporium* identificados previamente contra *Puccinia horiana*, con el fin de determinar su potencial como agentes de control biológico en el manejo de la roya blanca y del cultivo del crisantemo en México.

## Revisión de literatura

### Mecanismos de acción en asociaciones micofilicas de hongos

La asociación de comunidades de hongos en la naturaleza, esta basada en la competencia por recursos nutricionales y espaciales (Jeffries, 1995; Woodward y Boddy, 2008), que se lleva a cabo mediante diversos mecanismos antagónicos con el fin de llevar al reemplazo de una especie por otra (Narayanasamy, 2013a). Estas interacciones pueden llevarse a diferentes niveles: a distancia, al contacto con las hifas o al contacto con el micelio conjunto (Woodward y Boddy, 2008).

El antagonismo a distancia es mediado por metabolitos capaces de difundir en el espacio, como enzimas o compuestos fungicidas y/o fungistáticos (Whipps, 2001; Woodward y Boddy, 2008). Como en algunos hongos causantes de pudriciones forestales que producen y difunden enzimas como: quitinasas, lacasas, fenoloxidasas,  $\beta$ -glucosidasas (Woodward y Boddy, 2008). Así también, *Talaromyces flavus*, produce grandes cantidades de glucosa oxidasa contra *Verticillium dahlie* en *Solanum tuberosum* (Fravel y Roberts, 1991; Stosz *et al.*, 1996).

A nivel hifal se pueden establecer dos vertientes principales de interacción: el parasitismo y la interferencia hifal (Barnett, 1963; Woodward y Boddy, 2008; Narayanasamy, 2013a). El parasitismo esta determinado por un crecimiento y nutrición dentro o alrededor del hongo (Whipps, 2001; Woodward y Boddy, 2008; Benítez *et al.*, 2004; Narayanasamy, 2013a). El hiperparasitismo en este sentido, se refiere al tipo particular de relación, en donde un organismo parásito obtiene nutrientes de otro organismo parásito (Barnett, 1963; Boosalis, 1964; Holt y Hochberg, 1998; Morozov *et al.*, 2007), como en *Ampelomyces* sp. y *Lecanicillium lecanii* que parasitan algunos Erysiphales (Kiss, 2003; Kiss *et al.*, 2004) o de *Conyothirium minitans* parásito de *Sclerotinia* sp. (Whipps *et al.*, 2008; Whipps y McQuilquen, 2009). El micoparasitismo se reconoce como un estado ancestral dentro de algunos grupos taxonómicos, como es el caso de Hypocreaceae y Bionectriaceae, grupos a los que pertenecen *Trichoderma* spp. y *Clonostachya* spp. (Kubicek *et al.*, 2011; Karlsson *et al.*, 2015)

A nivel hifal, las enzimas más importantes son las  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas y proteasas, ya que degradan la pared de otros hongos (Whipps, 2001; Steayert *et al.*, 2003; Narayanasamy,

2013a), actuando de manera sinérgica en cepas de *T. harzianum* y *T. hamatum* contra *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Fusarium* (Jeffries y Young, 1994; Inglis y Kawchuck, 2001), de *Aureobasidium pollulans* contra *Monilinia laxa*, *B. cinerea* y *Penicillium expansum* (Zhang *et al.*, 2010) y de *Meyerozyma carabica* contra *Colletotrichum gloeosporoides* (Bautista-Rosales *et al.*, 2013). Las  $\beta$ -1,3-glucanasas, se dividen en dos tipos: exoglucanasas y endoglucanasas (Reese y Mandels, 1959; Steyeart *et al.*, 2003; Gruber y Seidl-Seiboth, 2012), importantes en la inhibición del desarrollo de *B. cinerea*, *R. solani* y *Phytophthora* sp. por algunas cepas de *Trichoderma* (Benítez *et al.*, 2004; Narayanasami, 2013a), *Coniothyrium minitans* y *Talaromyces flavus* contra *Fusarium equisetii*, *P. ultimum* y *R. solani* (Inglis y Kawchuck, 2001; Martin *et al.*, 2007). Las quitinasas, se dividen en: endoquitinasas, exoquitinasas y 1,4- $\beta$ -acetilglucosaminidasas (Steyeart *et al.*, 2003; Gruber y Seidl-Seiboth, 2012), importantes en cepas de *T. harzianum* contra *Rhizoctonia solani* (Benítez *et al.*, 2004), *T. hamatum* contra *Rhizoctonia*; *Myrothecium verrucaria* y *Gliocladium roseum* contra *Fusarium equisetii* y *Pythium ultimum* (Inglis y Kawchuck, 2001). Las proteasas son las responsables de la degradación de proteínas constitutivas de otros hongos, reportadas en *Trichoderma* sp. contra *F. culmorum* y *R. solani* (Benítez *et al.*, 2004), o de cepas de *T. harzianum* hidrolizando las enzimas clave para la infección de *B. cinerea* en frijol (Elad y Kapat, 1999).

Por otro lado, la interferencia hifal ocurre cuando dos hifas de diferentes especies de hongos entran en contacto, llevando a la muerte celular de la especie susceptible, siendo un mecanismo de reconocimiento a nivel genético, que tiene el objetivo de evitar el entrecruzamiento de dos especies diferentes de hongos (Silar, 2012). La interacción de *Phlebiopsis gigantea* con *Heterobasidion annosum* en especies forestales, esta marcada este mecanismo, así *P. gigantea* es utilizado en la formulación del Rotstop© para controlar la pudrición de la madera causada por *H. annosum* (Ikediugwu, 1976; Silar, 2012).

A nivel micelial, se presentan varios mecanismos con efectos a niveles macroscópicos, como la capacidad de colonización del micelio y la inhibición de ciertas estructuras reproductoras (Woodward y Boddy, 2008). La competencia por nutrientes, puede ser mediante la producción de compuestos que intervienen en la asimilación de N, P o Fe, como en (Benítez *et al.*, 2004; Whipps y McQuilquen, 2009; Whipps, 2001; Woodward y Boddy, 2008), o también por la capacidad de asimilar nutrientes a mayor velocidad, como algunas cepas de *T. harzianum* (Benítez *et al.*, 2004), o de *Cryptococcus laurenti* y *Sporobolomyces roseus* (Filonow, 1998) y de *Meyerozyma caribbica* eficaz competidor de carbohidratos contra *Colletotrichum gloeosporioides*

(Bautista-Rosales, 2013). Igualmente, la modificación de pH, como en el caso de cepas de *Trichoderma*, puede llevar a la inhibición de otros hongos (Benítez *et al.*, 2004). Finalmente, la colonización física de la raíz, por micorrizas como *Glomus* sp. (Torres-Barragán *et al.*, 1996), *Trichoderma* sp. (Whipps, 2001; Benítez *et al.*, 2004) o cepas no patogénicas de *Fusarium* y *Rhizoctonia*, llegan a impedir la colonización de sus contrapartes patogénicas u otros hongos (Whipps y McQuilquen, 2009).

### **Mecanismos de acción en asociaciones micofílicas de *Cladosporium* sp.**

Dentro del género *Cladosporium*, existen pocos casos de análisis detallados de los mecanismos de acción clave en asociaciones micofílicas. Por lo que no para todas las especies contenidas en la Tabla 2.1. se conoce con certeza su papel ecológico, ni los mecanismos que participan en la interacción con diversos hongos. Tal vez la especie más estudiada es *Cladosporium uredinicola*, asociada principalmente a uredias y telias de royas, como *Puccinia recondita*, *Puccinia puta* (Barros *et al.*, 1999), *P. cestri*, *P. henningsii*, *P. violae* (Traquair *et al.*, 1984) y *Cronartium* sp. (Morgan-Jones y McKemy, 1990). Parasita debido a la fuerza mecánica de sus hifas formando una estructura similar a un apresorio, además de la acción de enzimas líticas (Dolinska *et al.*, 2011). En esta especie, Dolinska *et al.* (2011) mostraron una asociación diferencial con la fase del ciclo de vida de algunas royas, parasitando solamente las teliosporas en *Puccinia komarovii*, *Phragmidium potentille*, las aeciosporas en *P. lagenophorae*, las urediniosporas en *P. recondita* y *P. tanacetii*. En *Gymnosporangium cornutum*, *G. sabinae* y *Tranzschelia pruni-spinosae* parasita espermogonios y aeciosporas, finalmente en *P. graminis* parasita aeciosporas y urediniosporas, es decir en estas especies es capaz de parasitar más de una parte de su ciclo de vida. También Barros *et al.* (1999) reporta que esta especie de *Cladosporium* sólo parasita las aeciosporas de *Puccinia puta*.

*Cladosporium tenuissimum* por otro lado, ha sido una especie muy estudiada y controversial en sus hábitos, ya que se conoce parasitando a *Cronartium flaccidum* y *Peridermium pini* (Moricca *et al.*, 1999), aunque Heuchert *et al.* (2005) no la reconoce como tal y sugiere una confusión con *C. uredinicola*, Fisher y Petrini (1992) la reportan como endófito de algunos cultivares de arroz y Zalar *et al.* (2007) la documentan en ambientes hipersalinos, pero con un aislamiento idéntico al reportado por Moricca *et al.* (1999). Actualmente Bensch *et al.* (2012) la incluyen dentro de las especies asociadas a otros hongos, aunque aceptando su carácter más bien como saprófito.

En este caso se conocen varios de sus mecanismos antagonistas (Nasini *et al.*, 2004; Spreafico, 2004; Assante *et al.*, 2005; Moricca *et al.*, 2005). En interacción con *Uromyces appendiculatus* además de la producción de metabolitos secundarios, existe penetración formándose una estructura similar a un apresorio, en conjunto con un proceso enzimático. En interacción con *Cronartium flaccidum* su ciclo de vida se sincroniza con el ciclo de vida de esta roya, alcanzando picos de liberación de conidios cuando la roya se encuentra esporulando (Assante y Moricca, 2010).

*Cladosporium aecidiicola* reduce la germinación de *Melapsora medusae*, pero no por un parasitismo directo, si no por efecto del antagonismo a distancia, produciendo compuestos que inhiben la germinación de sus urediniosporas (Sharma y Heather, 1980). En el caso de *C. gallicola*, Tsuneda y Hiratsuka (1979) detallan la formación de una estructura similar a un apresorio que se adhiere y posteriormente penetra las esporas de *Endocronartium harknessi*. En este caso la acción parece ser al contacto presumiblemente mediado por enzimas líticas. *C. exobasidii*, parasita a *Exobasidium camelliae* var. *gracilis* (Braun, 2001), en este caso se demostró que aunque no parasitaba los basidios/basidiosporas expuestas, pero si inhibía su germinación y les provocaba necrosis, lo que podría ser un estado intermedio entre el antagonismo y el hiperparasitismo (Mims *et al.*, 2007).

En el caso de Erysiphales parasitados *Cladosporium* sp., Kiss (2003) y Dugan y Glawe (2006) mencionan a *Cladosporium* sp. asociado con *Phyllactinia* sp. y *P. guttata*, parasitando sólo las células peniceladas de los chaesmotecios, refiriéndose a un comportamiento saprófito más que parásito, aunque dejando en claro que la dispersión y maduración de ascocarpos se ve disminuida.

Aunque existen reportes de *Cladosporium* asociado a *P. horiana* (Srivastava *et al.*, 1985; García-Velasco *et al.* 2005), no existen estudios que detallen los mecanismos de su interacción, particularmente en México, García-Velasco *et al.* (2005) reportaron una cepa de *Cladosporium* sp. eficaz en el control de *P. horiana*, sin determinarse los mecanismos de acción vinculados a éste reporte, entonces un análisis fino de las especies encontradas en la misma localidad se vuelve necesario, tratando de esclarecer los mecanismos de acción de *Cladosporium* contra la roya blanca del crisantemo.

## Objetivos

Determinar la interacción entre *Cladosporium cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* con *Puccinia horiana*, como potencial para ser utilizados como agentes de control biológico de la roya blanca del crisantemo.

### Objetivos particulares

Mediante aproximaciones histológicas determinar el tipo de asociación entre *Cladosporium* sp. y *P. horiana*

Determinar la utilización de glucanasa y quitinasa como método de acción de los aislamientos de *Cladosporium* sp. contra *P. horiana*.

## Materiales y Métodos

**Colecta.** Hojas sanas y con pústulas de *P. horiana* se recolectaron de plantas de crisantemo cv. Spider en un invernadero comercial en Villa Guerrero, Estado de México, en octubre de 2014. Se desinfestaron con una solución de cloro 3% por 3 minutos y un triple lavado con agua destilada estéril.

**Pruebas de parasitismo *in vitro*.** A partir de colonias en medio PDA 2% (14 días) de los aislamientos: DETSC1A, DETSC1B, DETSC02 y DETSC03 de *Cladosporium* sp., se prepararon suspensiones de  $2.5 \times 10^{-5}$  conidios/mL con agua destilada estéril y 0.01% de Tween20. Cada tratamiento consistió en la inoculación cada uno de los aislamientos antes referidos, en dos hojas de crisantemo con roya blanca, además del control con pústulas de *P. horiana* sólo con agua destilada estéril y un control de hojas sanas sin *P. horiana* inoculadas con cada uno de los aislamientos de *Cladosporium* sp. Cada tratamiento se incubó en cámara húmeda por 36 h a 24°C. Posteriormente, se obtuvieron cuatro pústulas por tratamiento y de los controles, las secciones se fijaron en glutaraldehído-paraformaldehído 3:1 por 12 h, se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales (30%-100%) por una hora cada cambio y se infiltraron gradualmente con LR-White, se montaron en cápsulas de gel con LR-White puro y polimerizaron a 57°C por 12 h. Se realizaron cortes de 1 µm de grosor en un

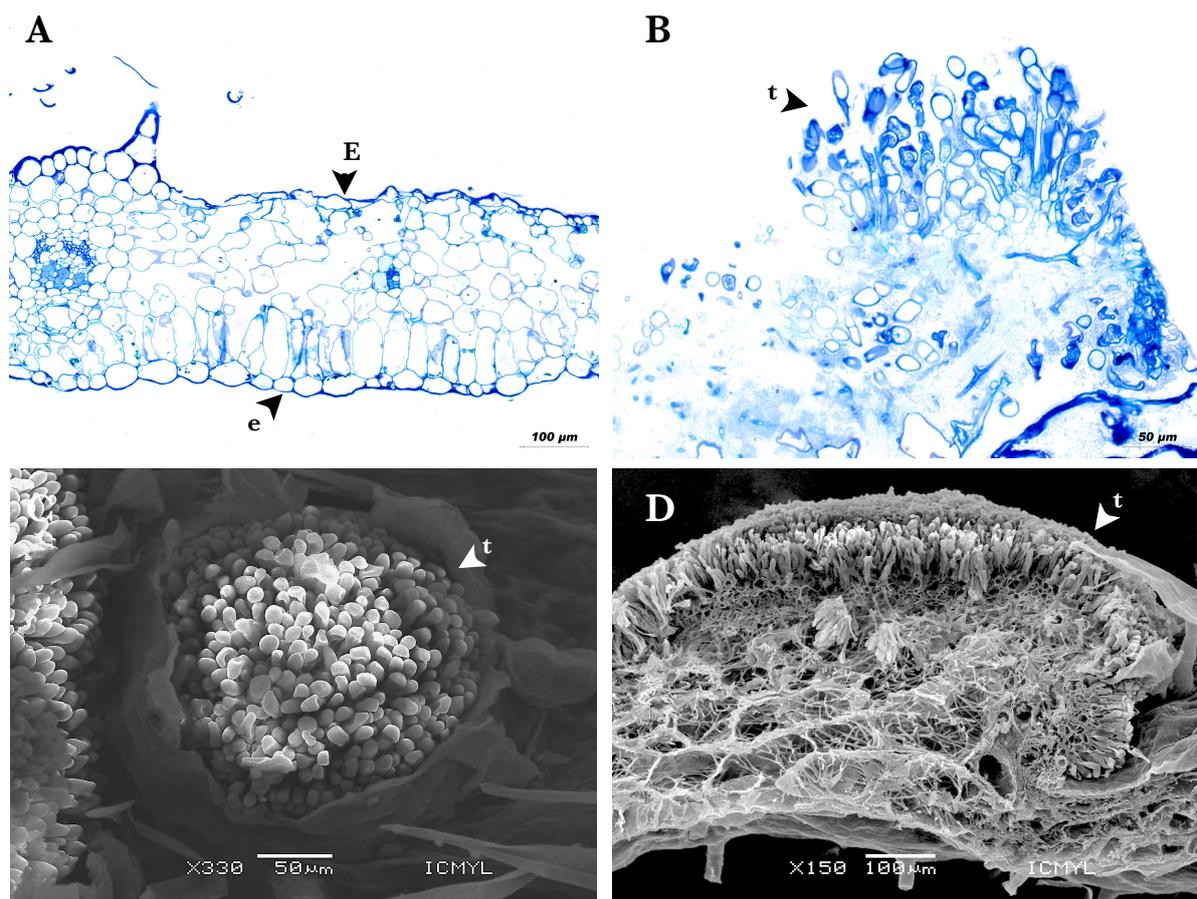
ultramicrotomo Reichert Jung ultra E, se tiñeron con azul de toluidina sobre un portaobjetos y se montaron con Entellan<sup>®</sup>. Por otro lado, se llevaron a cabo observaciones en Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), para esto, pústulas desinfectadas de *P. horiana* se inocularon en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, excepto el control con hojas sanas. Se fijaron cuatro pústulas por tratamiento en glutaraldehído 3% por 12 h, se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales (30%-100%) por una hora cada cambio, se desecaron a punto crítico, montaron sobre una cinta de carbon y cubrieron con oro para finalmente ser observados en MEB a bajo vacío, por las características de la muestra.

**Degradación de quitina y  $\beta$ -1,3-glucanos.** Se utilizó como base un medio bajo en nutrientes (g%: NaNO<sub>3</sub>, 0.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0.05; KCl, 0.05), con diferentes tratamientos suplementados con laminarina 1% (laminarina de *Laminaria digitata*, Sigma Aldrich<sup>®</sup>), quitina coloidal 1%, como control negativo glucosa 1%, como control positivo no se agregó fuente de carbono. La preparación de quitina coloidal se llevó a cabo de la siguiente manera: 10 g de quitina (hojuelas purificadas de cangrejo, Sigma Aldrich<sup>®</sup>) previamente molida finamente, se suspendió en 100 ml de HCl concentrado por 2 horas a 4°C, pasado el tiempo se lavó con una gran cantidad de agua destilada fría, se dejó 24 h a 4°C en agua destilada y se siguió lavando hasta llegar a un pH cercano al neutro, finalmente se obtuvo una pasta gelatinosa. A partir de colonias de los diferentes aislamientos crecidas por 15 días en medio PDA sintético 2% (Bioxon<sup>®</sup>), se obtuvieron discos de 3 mm y se depositaron al centro de cada caja, esto por triplicado con una repetición. Se midió el diámetro de la colonia cada 4 días por 16 días. Al termino del experimento se tomaron fotografías de las colonias.

## Resultados

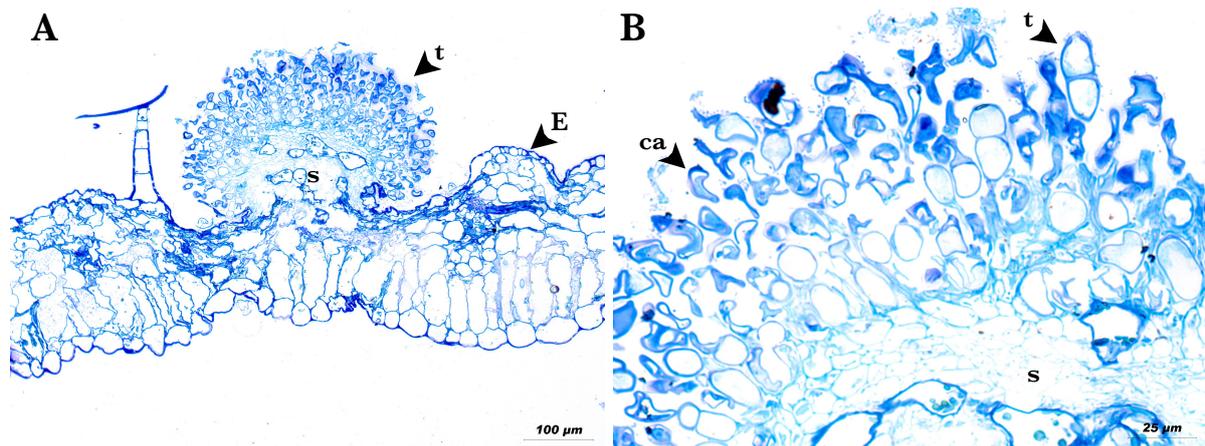
El micelio de *Puccinia horiana* colonizó todo el tejido de la hoja, tanto parénquima en empalizada como tejido esponjoso. En estados avanzados, el tejido esponjoso colapsó completamente, en el sitio donde irrumpe la pústula se encuentra un estroma bien diferenciado de células esporógenas que da origen a las estructuras reproductoras. Las teliosporas son bicelulares, sin ornamentaciones, altamente constreñidas en el centro y oblongo-clavadas. El grosor de la pared se acentúa en el ápice de la espora, decrece en el cuerpo de la espora y en el pedicelo se vuelve aún más delgada (Fig. 3.1; 3.2).

Para confirmar el resultado de parasitismo (capítulo II), se decidió realizar un tratamiento con DETSC02 de *C. delicatulum*. Los resultados fueron negativos, no hubo crecimiento observable de esta especie, ni afectación al tejido foliar, ni al micelio de la roya en las siguientes 48 h. Se observó una ligera alteración en la morfología de las células apicales de las teliosporas (Fig.



**Figura 3.1. Controles positivos y negativos de la interacción entre *Cladosporium* sp. con *P. horiana*.** A) Hoja sin infección por *Puccinia horiana*, ni *C. cladosporioides* C1A\*, B) Pústula de *P. horiana* sin ningún antagonista en LRWhite; C y D) Pústula de *P. horiana* sin ningún antagonista en MEB. \*Aunque sólo se muestra la hoja inoculada con *C. cladosporioides* C1A, ninguna otra cepa/especie de *Cladosporium* causó una alteración en la morfología. E=epidermis abaxial, e=epidermis adaxial, t=teliospora, s=estróma.

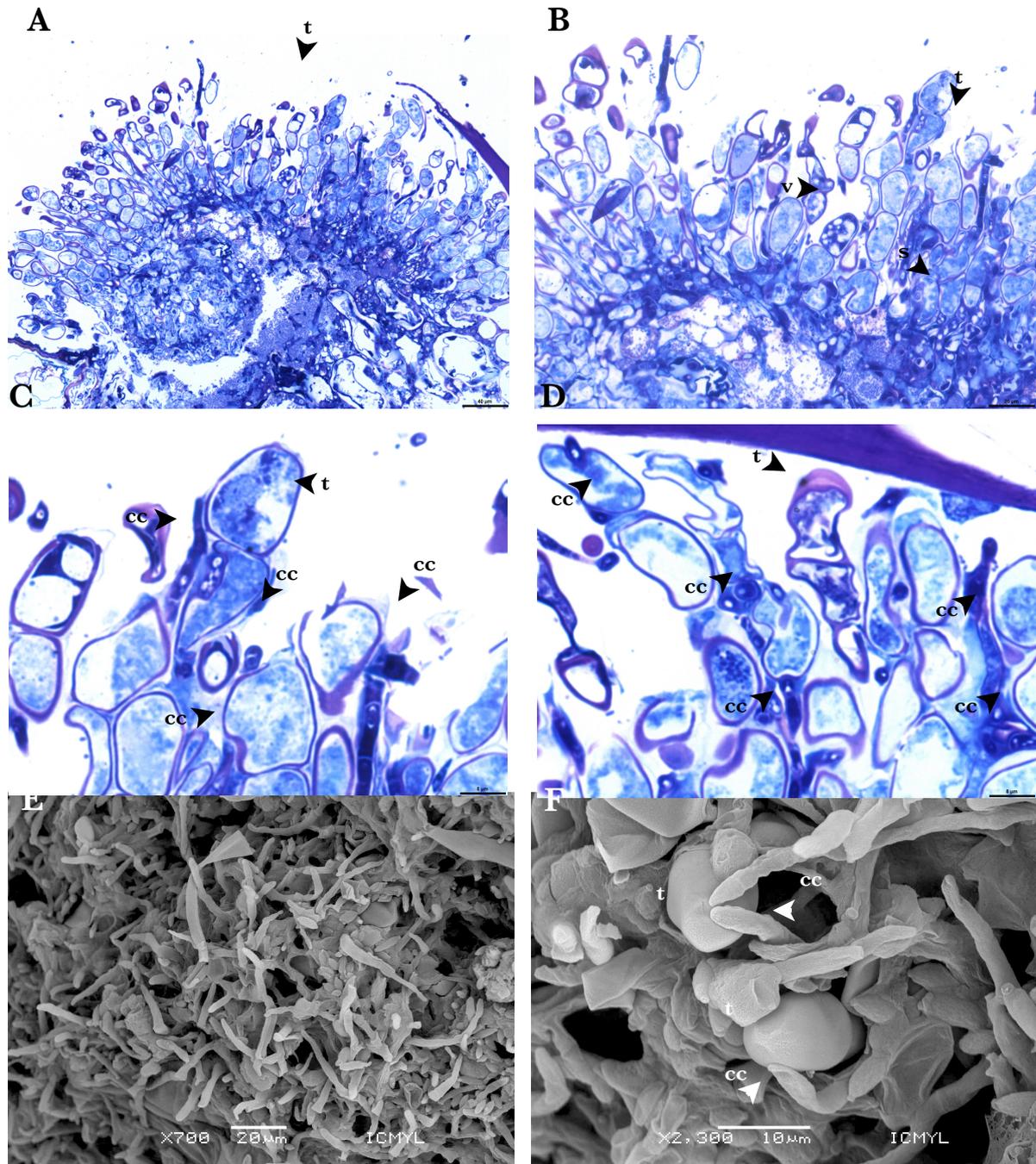
3.2). Teniendo en cuenta éstos resultados, no se realizaron observaciones al MEB. A los 15 días *C. delicatulum* no creció eficientemente en el medio con quitina coloidal, sugiriendo una ausencia de quitinasas. Aunque hubo un buen desarrollo en medio con laminarina 1% (diam:  $41.33 \pm 1.69$  mm), sin diferencias con el medio con glucosa 1% (diam:  $42 \pm 0.81$  mm), lo que sugiere la presencia de  $\beta$ -1,3-glucanasas (Fig. 3.6). Evidencias que podrían soportar la hipótesis de que se trata de un invasor secundario.



**Figura 3.2. Ausencia de antagonismo entre *C. delicatulum* (DETSC02) y *P. horiana*.** A) Imagen panorámica de la morfología de la telia, se observa el tejido esponjoso colapsado; B) Algunas teliosporas se ven afectadas en la morfología de la célula apical. E= epidermis adaxial, s=estroma, t=teliosporas, ca=célula apical.

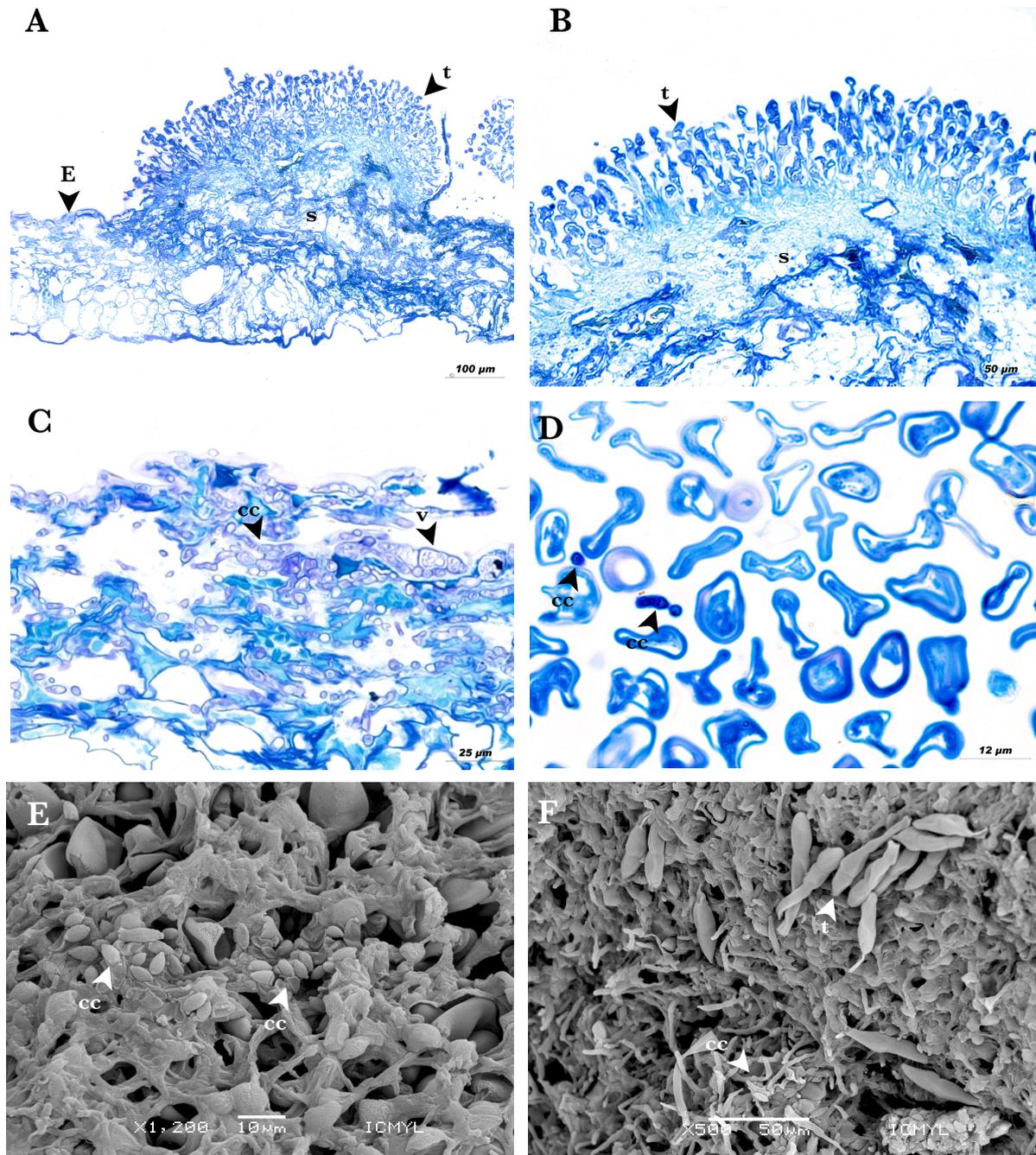
Ambos aislamientos DETSC1A y DETSC1B de *C. cladosporioides* se asocian con *P. horiana* a las 48 h (Fig. 3.3; 3.4), debido a la mayor pigmentación de *Cladosporium*, es sencillo delimitar su interacción, así se encuentra principalmente en el estroma de la roya, creciendo eficientemente y disgregando a las hifas de *P. horiana*, así como sobre la superficie de la telia. Es importante recalcar que el crecimiento de *C. cladosporioides* dentro de la hoja se encuentra delimitado por la colonización de la roya, no se encuentra en tejido vegetal sano. Es posible observar una alta vacuolación en las hifas de *C. cladosporioides*, lo que es un indicio de una alta movilidad de nutrientes a lo largo del micelio de *Cladosporium* (Fig. 3.3; 3.4). En el caso del aislamiento DETSC1A, las teliosporas presentan un daño bastante importante relacionado al crecimiento del hifomicete sobre la telia, aunado al crecimiento asociado al estroma. Las teliosporas se encuentran en ocasiones colapsadas, lo que junto con un citoplasma altamente vacuolado indicio de daño celular, sugiere la presencia de un efector químico producido por *C. cladosporioides*, como causa del daño (Fig. 3.3). Los ápices de las hifas de *Cladosporium* en la parte aérea de *P. horiana*, se encuentran adheridas a la pared del cuerpo de las teliosporas sin llegar a penetrarlas; no obstante su morfología se ve afectada (Fig. 3.3).

El aislamiento DETSC1B se encuentra en mayor medida asociada al estroma de la roya y aunque hay daños en las teliosporas, no hay un crecimiento extensivo sobre éstas, como en el caso de la cepa anterior. Las teliosporas se encuentran colapsadas y con el citoplasma bastante denso, lo que sugiere que el daño provocado en el estroma tiene una repercusión en la parte aérea de *P. horiana* (Fig. 3.4). No se evidenció parasitismo directo de las teliosporas de la roya



**Figura 3.3. Interacción entre *Cladosporium cladosporioides* DETSC1A con *Puccinia horiana*.** A) Imagen panorámica de la morfología de la pústula alterada; B) Organización y morfología de las teliosporas alterada, citoplasma de las teliosporas en ocasiones altamente vacuolado; C) Adhesión de hifas del antagonista contra la pared de la teliospora; D) Alteración morfológica completa de la teliospora en interacción; E) Colonización de *Cladosporium* sobre la superficie de la telia, observación al MEB; F) Adhesión de hifas a la pared de la teliospora, observación al MEB. t=teliospora, s= estroma de *P. horiana*, cc= *C. cladosporioides*, v= vacuolas

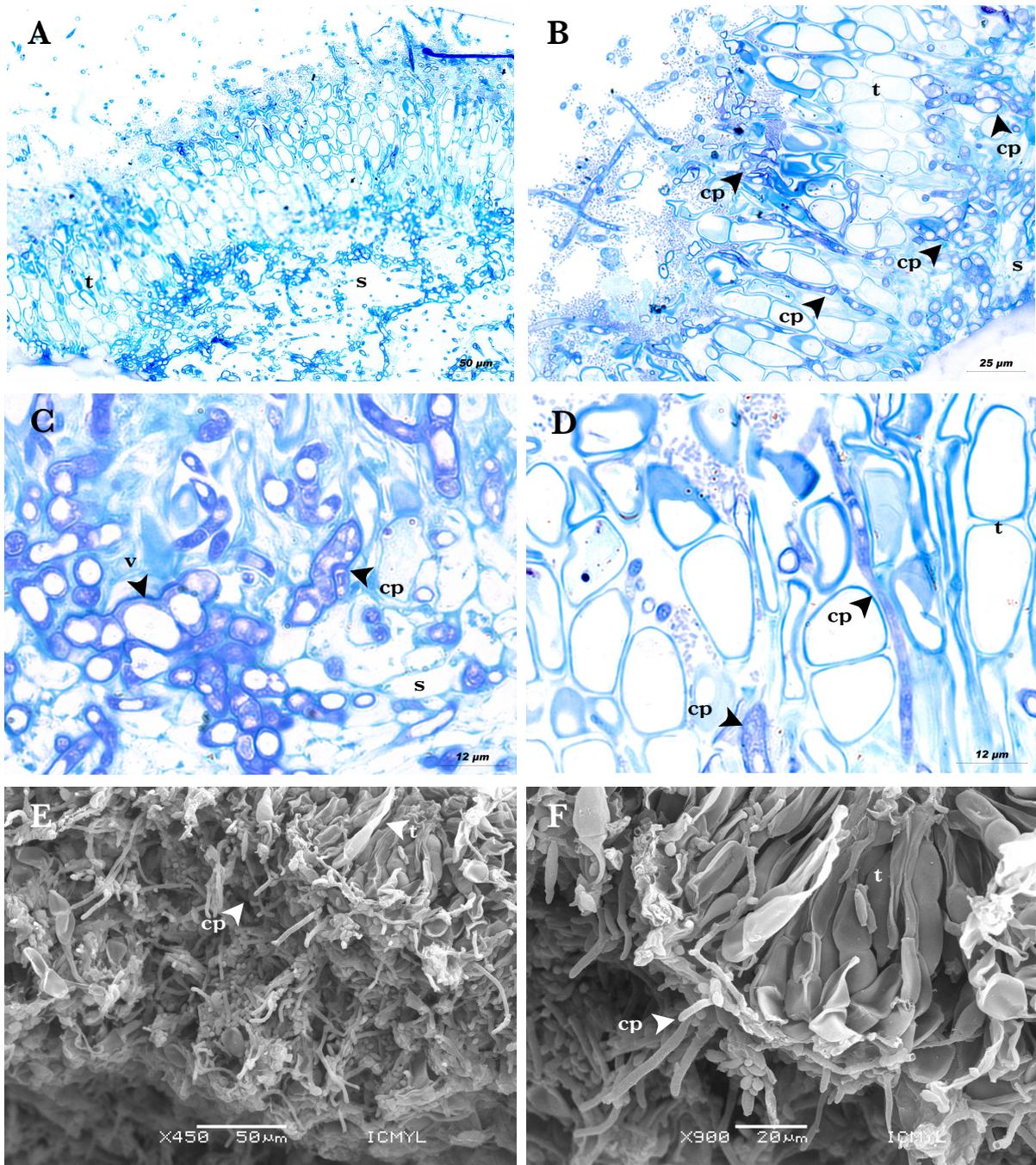
(Fig. 3.4). El crecimiento a los 15 días de ambas cepas de *C. cladosporioides* en el medio con quitina coloidal fue muy pobre similar al control sin ninguna fuente de carbono, esto sugiere la ausencia de quitinasas en el medio. Por otro lado en el caso con sustrato de laminarina 1% (diam: C1A  $42.66 \pm 6.12$  mm, C1B  $49.66 \pm 0.47$  mm) se presenta un buen desarrollo sin diferencias en el medio con glucosa 1% (diam: C1A  $41.33 \pm 2.49$  mm, C1B  $44.66 \pm 0.47$  mm),



**Figura 3.4. Interacción entre *Cladosporium cladosporioides* DETSC1B con *Puccinia horiana*.** A) Imagen panorámica de la morfología alterada de la pústula; B) Organización y morfología alterada de las teliosporas; C) Abundante crecimiento de C1A en asociación al micelio de *P. horiana*; D) Colapso de las teliosporas; E) Colonización de *Cladosporium* en la pústula; F) Acercamiento E= epidermis adaxial, s=estroma, t=teliosporas, cc=*C. cladosporioides*, v=vacuolas.

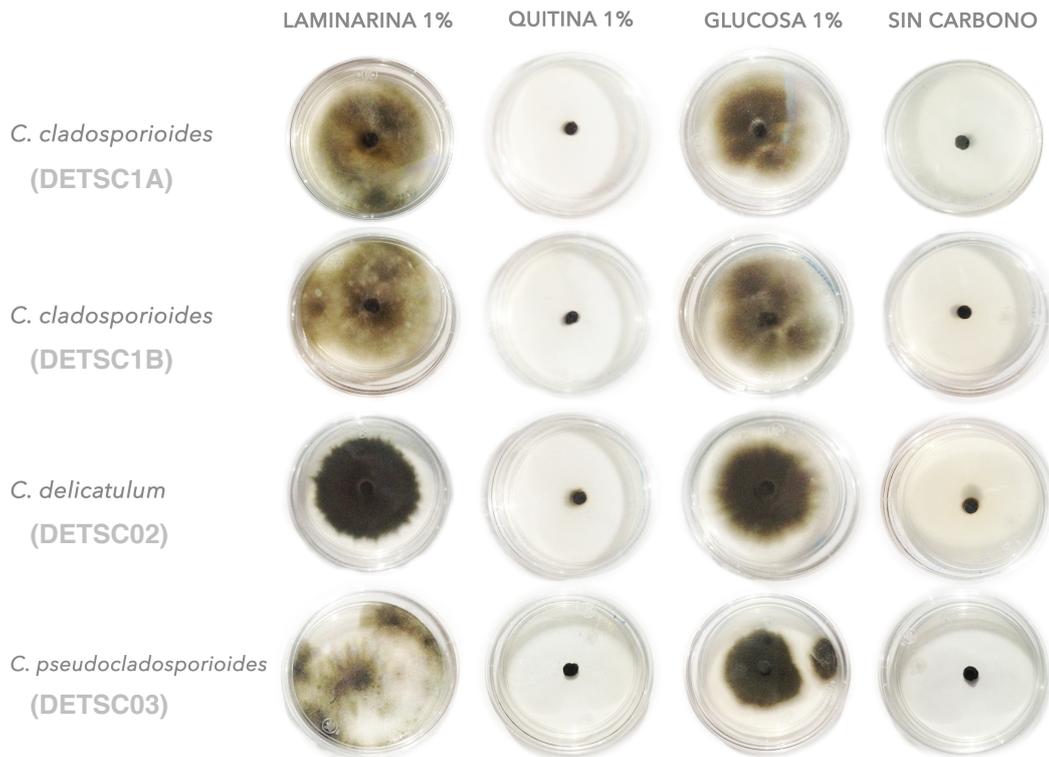
lo que sugiere la presencia de  $\beta$ -1,3-glucanasas (Fig. 3.6). Los resultados hasta ahora encontrados apoyan la idea de que *C. cladosporioides* es efectivamente un agente antagonista de la roya blanca, aunque su acción no es parasítica de manera directa sobre las teliosporas, el daño que se genera en el estroma repercute en la morfología de las esporas, los indicios demuestran que otros agentes no detectados en el análisis histológico, como metabolitos secundarios (sinérgicamente con participación de  $\beta$ -1,3-glucanasas) pueden ser los responsables de ésta alteración morfológica de *P. horiana*.

Finalmente, *Cladosporium pseudocladosporioides* a las 48 h se encuentra también íntimamente asociado a *P. horiana*, al igual que las cepas de *C. cladosporioides*, el crecimiento del micelio se observa completamente asociado al de la roya blanca, disgregándolo. No existe afectación del ejido sano de la hoja. De igual manera las hifas de *C. pseudocladosporioides* se encuentran altamente vacuoladas, indicativo de una alta actividad metabólica en ellas (Fig. 3.4). En el caso de las teliosporas, no hay penetración por hifas de *C. pseudocladosporioides*, su morfología no se ve alterada como en el caso de las expuestas a las cepas de *C. cladosporioides* (Fig. 3.3; 3.4), las hifas y conidióforos crecen entre las teliosporas o sobre éstas, en ocasiones la alteración puede llevar a un colapso de la estructura de la teliospora (Fig. 3.4). A las 48 h en MEB podemos observar una buena colonización de las hifas en superficie de la telia, así como crecimiento en el estroma y entre las teliosporas, en ocasiones ésta asociación tiene como consecuencia un colapso de la teliospora; sin embargo la causa no es una penetración directa de *C. pseudocladosporioides* (Fig. 3.4). El crecimiento de *C. pseudocladosporioides* en el medio con quitina coloidal fue muy escaso, indicando la probable ausencia de quitinasas. Así en el caso del medio con laminarina 1% (diam:  $32.66 \pm 3.29$  mm), se presenta un mejor crecimiento similar en diámetro con glucosa 1% (diam:  $36 \pm 4.32$  mm), aunque con menor esporulación de la colonia, lo que sugiere la presencia de  $\beta$ -1,3-glucanasas (Fig. 3.6; 3.7). En el caso de ésta especie, los resultados hasta ahora presentados indican que efectivamente es una especie antagonista de *Puccinia horiana*, aunque su acción no es física sobre las teliosporas, por lo que otros agentes, como metabolitos secundarios, enzimas ( $\beta$ -1,3-glucanasas), o la interacción con las otras especies encontradas en asociación con *P. horiana*, podrían ser las claves en la interacción con la roya blanca del crisantemo.

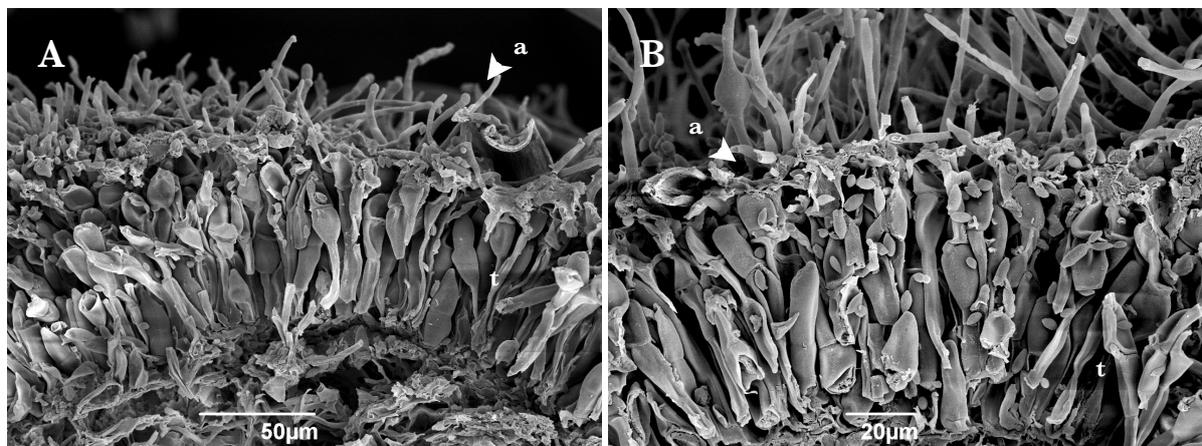


**Figura 3.5. Interacción entre *Cladosporium pseudocladosporioides* (DETSC03) y *Puccinia horiana*.** A) Panorámica de la telia en asociación con el antagonista, ausencia de estroma; B) Crecimiento de *C. pseudocladosporioides* entre y sobre las teliosporas, así como en el estroma de la telia; C) Alta vacuolación de las hifas asociadas al estroma de *P. horiana*; D) Estructuras de *C. pseudocladosporioides* sin penetrar las teliosporas; E) Apariencia de la telia en asociación con el antagonista, vista a MEB; F) Crecimiento entre y por encima de las teliosporas visto en MEB. s= estroma, t=teliospora, v=vacuolas, cp= *C. pseudocladosporioides*.

Las alteraciones observadas en la colecta inicial en invernadero coinciden con las generadas por *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* (Fig. 3.7), por lo que aunado al porcentaje de asociación reportado en el capítulo II, podemos deducir que ambas especies actúan alterando el desarrollo de *P. horiana* y que es probable que por sus capacidades enzimáticas *C. delicatulum* sea un invasor secundario.



**Figura 3.6. Crecimiento de los diferentes aislamientos de *Cladosporium* sp. en agar suplementado con diferentes fuentes de carbono a los 15 días en oscuridad. Como control negativo se utilizó glucosa 1% y como control positivo el medio sin ninguna otra fuente de carbono. La quitina 1% se refiere a quitina coloidal 1% detallada en los métodos.**



**Figura 3.7. Micrografías electrónicas de pústulas de *P. horiana* obtenidas de un invernadero comercial en Villa Guerrero, Estado de México. Se muestra el crecimiento del antagonista (morfología de *Cladosporium* sp.) en la primera colecta, hifas y conidióforos creciendo sobre teliosporas dañadas de *P. horiana*. a=antagonista, t=teliosporas**

## Discusión

La morfología de *Puccinia horiana*, corresponde con lo reportado por Leyva-Mir *et al.* (2001), García-Velasco *et al.* (2002); Bonde *et al.* (2015) y O'Keefe *et al.* (2015), la colonización se dio abundantemente en los espacios intercelulares, por debajo de las teliosporas se encuentra una agregación diferenciada de hifas, correspondiendo a las células esporógenas o simplemente estroma y en estados avanzados se colapsa el tejido esponjoso.

Es claro que *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* no son hiperparásitas de las teliosporas, ya que no existe una penetración de estas estructuras, como si ocurre en el caso de *C. aecidiicola* (Sharma y Heather, 1980), *C. tenuissimum* (Assante *et al.*, 2004), *C. gallicola* (Tsuneda y Hiratsuka, 1979) o *C. uredinicola* (Traquair *et al.*, 1984) o en los casos particulares de *C. uredinicola* contra *P. horiana* (Srivastava *et al.*, 1985). Las características morfológicas de las telias afectadas, en la asociación con ambas especies de *Cladosporium*, coinciden hasta cierto punto con lo reportado por García-Velasco *et al.* (2005), colonizando entre las esporas y sobre éstas, aunque la penetración de las teliosporas reportada por el autor no fue posible observarse. Es muy probable que alguna de las dos especies encontradas en este trabajo, sea la especie que trabajaron García-Velasco *et al.* (2005), ya que se obtuvieron del mismo sitio de colecta. Si bien es cierto que no se asocian de manera expresa con la parte aérea, es claro que la región estromática o de células esporógenas se encuentra altamente dañada. Pocas especies de *Cladosporium* se conocen con éste habito particular de asociación, como *C. phylophyllum*, *C. exobasidii* y *Cladosporium epichloës* (Heuchert *et al.*, 2005). Sólo existe el reporte detallado de Mims *et al.* (2007), de *Cladosporium* sp. asociado al himenio (células esporógenas) de *Exobasidium camelliae* var. *gracilis*, aunque no penetra las basidiosporas si causa un daño importante, morfología que concuerda con la interacción de *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* y *P. horiana*.

Esta asociación física diferencial de ambas especies de *Cladosporium*., sólo con la región de *P. horiana* al interior de la hoja, puede deberse a las diferencias estructurales y químicas entre la pared celular de las teliosporas con las propias del micelio y células esporógenas (Chong *et al.*, 1985; Deising *et al.*, 1996; Ruiz-Herrera, 2012). De manera general, la pared fúngica está compuesta en mayor proporción de  $\beta$ -glucanos, que funcionan como una matriz que soporta fibras de quitina en menor proporción (Bartnicki-García, 1968; Bowman y Free, 2006; Ruiz-

Herrera, 2012). En el caso de royas, las paredes celulares de las hifas vegetativas poseen una menor proporción de quitina (Freytag y Medgen, 1991; Deising *et al.*, 1996), estructuralmente esta pared presenta 4 estratos, 3 de ellos con abundantes polisacáridos y glicoproteínas, sólo uno de ellos compuesto de quitina en *P. graminis* (Chong *et al.*, 1985), los mismos se encuentran también en las células esporógenas (Harder, 1984). En cambio, las estructuras reproductoras como las teliosporas de *P. coronata* f. sp. *avenae* poseen 6 estratos en la pared (Harder, 1977; Littlefield y Heath, 1979; Mengden, 1984) y las urediosporas de *P. graminis* f.sp. *tritici* presentan 5 estratos (Harder *et al.*, 1986). Las teliosporas, son las que presentan la pared más gruesa, comparada con las otras formas durante en el ciclo de vida de las royas (Littlefield y Heath, 1979). La composición de ésta pared es más compleja, ya que presenta una alta proporción de glucanos, glicoproteínas, quitina, residuos de glucosamina y una alta cantidad de melanina (Joppien *et al.*, 1972; Littlefield y Heath, 1979; Harder *et al.*, 1986; Mengden, 1984). Esta complejidad estructural, así como las diferencias en composición química entre la pared celular de las teliosporas, las células esporógenas y el micelio vegetativo, puede ser un determinante en la asociación de las especies de *Cladosporium cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* con *P. horiana*, razón por la cual existe preferencia en relación con estas regiones de la roya.

La ausencia de crecimiento de las tres especies en medio con quitina coloidal, nos refiere a la probable ausencia de quitinasa, enzima responsable de la degradación de quitina. Esta ausencia de la enzima, ha sido también reportada en especies hiperparásitas del género, como *C. tenuissimum* (Spreafico, 2003; Assante *et al.*, 2004). En todos los casos, sólo hubo crecimiento en el sustrato con laminarina. La laminarina es un polisacárido lineal, compuesto por unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosas, unidos en posición 1-3 (Connell *et al.*, 1950; Peat *et al.*, 1958), un símil a los  $\beta$ -glucanos de la pared de los hongos. Las enzimas que degradan este compuesto son las  $\beta$ -glucanasas, en realidad se sabe que puede ser un complejo de enzimas, tanto exoglucanasas como endoglucanasas (Chesters y Bulls, 1963; Fleming *et al.*, 1963). Se puede inferir la presencia de  $\beta$ -glucanasas producidas por las tres especies, ya que efectivamente hay un buen desarrollo en el medio sólido con sólo esa fuente de carbono, siendo entonces la enzima probablemente responsable de la asociación de las especies de *Cladosporium* con *P. horiana*. La presencia de glucanasas, ha sido demostrada en *C. tenuissimum* (Spreafico, 2004; Assante *et al.*, 2004), lo que ha llevado a la conclusión de que éstas enzimas, junto con la presencia de ciertos metabolitos secundarios son los responsables de la acción

contra *Uromyces appendiculatus*. En un futuro tendría que llevarse a cabo la identificación del tipo particular de  $\beta$ -glucanasa, su proporción y su actividad, logrando esclarecer el papel de este grupo de enzimas en el antagonismo de estas especies de *Cladosporium*. Así entonces, aunque la actividad quitinolítica éste ausente, la obtención de nutrientes se ve compensada por la acción de  $\beta$ -glucanasas, suficientes para degradar la pared celular del micelio y las células esporógenas de *P. horiana* e insuficiente para penetrar la pared de las teliosporas, aunque cómo lo menciona Bull y Chesters (1966), la utilización de sólo un mecanismo, como lo es la producción de  $\beta$ -glucanasas, es poco probable en este tipo de interacciones, por lo que otros mecanismos deben participar en ésta interacción.

Por otro lado, tomando en consideración que la única diferencia ontogénica entre la formación de teliosporas y urediosporas en *P. coronata* f. sp. *avenae*, es que en el primer caso, las células esporógenas almacenan y translocan una alta cantidad de glucógeno (Harder, 1977; Harder, 1984), pudiera ser que las altas cantidades de éste polímero, sea uno de los determinantes en la asociación de *Cladosporium* a las células esporógenas, pero se desconoce a detalle su presencia en *P. horiana*. Se reconoce también la presencia de glucógeno acompañado de lípidos en el micelio vegetativo de las royas (Bracker, 1967; Littlefield y Heath, 1979), región a la que se asocian también ambas especies de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*. La presencia de grandes vacuolas bien definidas está relacionada con la translocación de nutrientes a lo largo del micelio (Darrah *et al.*, 2006; Fricker *et al.*, 2008; Casadevall *et al.*, 2009). Al observar ésta morfología en el micelio de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* asociado a las hifas vegetativas y a las células esporógenas de *P. horiana*, se puede pensar que efectivamente existe una translocación de nutrientes de las estructuras de la roya a las hifas de *Cladosporium*. De igual manera, la presencia de éste tipo de vacuolas ha sido relacionada con el almacenamiento, biosíntesis y transporte de compuestos secundarios, como en el caso de *Aspergillus parasiticus* (Chanda *et al.*, 2009). La liberación y difusión de éste tipo de compuestos, podría corresponder con las alteraciones morfológicas de las teliosporas, ya que una teliospora madura de cualquier roya, esta acompañada en general de un citoplasma denso y bien definido, desaparición de vacuolas, almacenamiento de aceites y la formación de un sólo núcleo (Mengden, 1984), en cambio se observa una morfología en ocasiones con paredes colapsadas, coagulación del citoplasma y alta vacuolación.

En un ensayo preliminar (datos no mostrados), utilizando los filtrados del medio de cultivo en donde se creció *Cladosporium* sp. se obtuvo una disminución en la germinación de las teliosporas, esto junto con los datos morfológicos de la alteración de las teliosporas, en donde no existe penetración, apoya la idea de que el antagonismo de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* esta mediada a distancia, por metabolitos capaces de difundir. Estos metabolitos, podrían ser los que inciden en el colapso de las teliosporas en contacto con las especies de *Cladosporium* aisladas, la utilización de éste tipo de moléculas con funciones antagónicas ha sido también reportada en otras especies de *Cladosporium* contra diversos hongos (Omar y Heather, 1979; Sharma y Heather, 1980; 1978; Moricca *et al.*, 2001, 2005; Assante *et al.*, 2004).

Por lo cuál la interacción entre *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* es efectivamente antagónica con el desarrollo de *P. horiana*, de manera necrotrófica y que además se da a distancia, con la participación activa de glucanasas y compuestos probablemente de origen secundario que afectan de manera directa las células esporógenas, el micelio vegetativo y de manera indirecta la morfología de las teliosporas, con consecuencias en la formación de basidiosporas. Este antagonismo se encuentra basado en las características de éstas especies saprófitas, ya que por ejemplo *Cladosporium* spp. ha sido reportado colonizando las células pediceladas de los chaesmotecios de *Phyllactinia* spp., afectando la adhesión de éstas estructuras a diferentes sustratos, entonces al no parasitar los chaesmotecios o las hifas vegetativas no puede ser entonces clasificado como micoparásito, aunque es claro que ésta interacción implica una supresión de la maduración de ascosporas y la dispersión de chaesmotecios (Raghavendra y Pavgi, 1978; Kiss, 2003). Caso similar a la ausencia de micoparasitismo encontrado entre *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* y *P. horiana*.

Podríamos estar hablando entonces, que los signos observados en campo, son debido a un complejo de especies pertenecientes a *Cladosporium*, dos de ellas antagonistas directas y una más, probable antagonista indirecta. El conjunto de varias especies coexistiendo, aprovechando un nicho y en este caso, produciendo un mismo signo/síntoma, ha sido reportada con anterioridad en organismos capaces de causar enfermedades en plantas, como *Fusarium* sp. (O'Donnell *et al.*, 2000; 2004) y *Mycosphaerella* sp. (Crous *et al.*, 1998; Crous y Gronewald, 2005).

*C. cladosporioides* es una de las especies más estudiadas dentro del género y aunque es un habitante común del filoplano (Dix y Webster, 1995; Bensch *et al.*, 2010), se ha encontrado en asociación con diferentes royas (Moricca y Assante, com. pers.), recientemente ha sido reportada como hiperparásita de urediosporas de *P. striiformis* f. sp. *tritici*, teniendo un efecto importante en la reducción de producción y viabilidad de éstas esporas (Zhan *et al.*, 2014), aunque también existen reportes de su asociación con otros hongos (Bensch *et al.*, 2010), como *Erysiphe cichoracearum* (Kiss, 2003), *Venturia inequalis* (Köhl *et al.*, 2008), *Botrytis fabae* (Jackson *et al.*, 1997) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Boland y Hunter, 1988). La reciente reasignación de *C. pseudocladosporioides* y sus problemas taxonómicos (Bensch *et al.*, 2012; 2010), hace complicado determinar si existen o no reportes previos de asociación a otros hongos debido a su confusión con *C. cladosporioides*, por lo que éste sería el primer reporte claro sobre su biología en relación a *P. horiana*. Respecto al papel de *C. delicatulum* como se ha estado mencionando, podría ser el de un invasor secundario, efectivamente capaz de degradar  $\beta$ -glucanos, pero sin capacidad de participar activamente en la colonización de las telias de la roya blanca, es decir aprovechándose del daño causado por *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*. En realidad no existen reportes sobre la biología de ésta especie, por lo que su papel como invasor secundario sólo ha sido sustentado por Gómez-Cornelio *et al.* (2012) y Bensch *et al.* (2012; 2010).

Las características del cultivo del crisantemo hacen complicado el manejo de la roya blanca, ya que se sobrelapan diferentes ciclos de cultivo con la finalidad de obtener una mayor producción, además de la capacidad de *P. horiana* de sobrevivir en plantas voluntarias o en residuos de cosecha (Bonde *et al.*, 2013; O'Keefe *et al.*, 2012). A este nivel, al llevarse a cabo la colonización primaria de *P. horiana* en el tejido sano del crisantemo y a la par el complejo de *Cladosporium* incidiendo en la formación de teliosporas, la producción de inóculo secundario se ve diezmada. La presencia de *Cladosporium* spp. en el filoplano, ha sido asociada a una reducción en la cantidad de inóculo secundario, causado por diferentes niveles de antagonismo como en el caso de *Phyllactinia* (Raghavendra y Pavgi, 1978; Kiss, 2003), *Melampsora larici-populina* (Omar y Heather, 1979; Sharma y Heather, 1978; 1980), *Cronartium flaccidum*, *Peridermium pini* (Moricca *et al.*, 2001), *Uromyces appendiculatus* (Assante *et al.*, 2004), *P. striiformis* f. sp. *tritici* (Zhan *et al.*, 2014) y *P. horiana* (García-Velasco *et al.*, 2005), ofreciendo niveles de incidencia de la enfermedad bajos.

El control biológico de las royas ha sido bastante complejo debido a la biología de éste grupo de organismos y a la complejidad de las enfermedades en partes aéreas (Kuhlman *et al.*, 1978; Fokkema, 1978; Blakeman y Fokkema, 1982; Dix y Webster, 1995; Moricca *et al.*, 2001), por lo que aunque se han propuesto varios agentes de control, como *Tuberculina* spp., *Verticillium* spp., *Cladosporium* spp., *Sphaerellopsis philum*, *Scytalidium uredinicola* (Moricca y Ragazzi, 2008), pocos han superado la aplicación comercial requiere (Kuhlman *et al.*, 1978; Mengden, 1981). Estos organismos, afectan principalmente las esporas de las royas. Siguiendo la biología de las royas, esto se convierte al mismo tiempo en una desventaja, ya que dentro de la hoja el patógeno sigue intacto (Fokkema, 1978; Blakeman y Fokkema, 1982), esta es una de las razones por la que el control biológico de royas (así como de muchas otras enfermedades foliares) se vuelve todo un reto. En este sentido, los aislamientos de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* cobran mayor relevancia, ya que su principal daño físico se lleva a cabo en las estructuras de *P. horiana* al interior de la hoja, lo que podría sugerir una buena efectividad en la reducción de inóculo de la roya en campo.

Estos aislamientos del complejo de *Cladosporium* sp., cumplen con la mayoría con características de agentes de control biológico de royas y enfermedades foliares (Blakeman y Fokkema, 1982; Moricca y Ragazzi, 2008), por ejemplo no son altamente especializados, se encuentran de manera natural en interacción con *P. horiana*, pueden persistir como saprófitos, tienen una manera de propagación efectiva, son fáciles de cultivar *in vitro*, resisten las condiciones del filoplano, etc. Pero por otro lado, no se encuentran exentos de los problemas clásicos, en los agentes de control biológico de enfermedades al ser analizados en condiciones comerciales, por lo que un análisis exhaustivo con éste fin se vuelve completamente necesario, con la finalidad de ofrecer soporte a ésta alternativa más en el manejo de ésta importante enfermedad del crisantemo.

## Conclusiones

De los cuatro aislamientos encontrados en asociación con la roya blanca del crisantemo, solamente *C. cladosporioides* (C1A; C1B) y *C. pseudocladosporioides*, son antagonistas de *Puccinia horiana*. Todos los aislamientos tienen la capacidad de producir  $\beta$ -glucanasas, caso contrario con la producción de quitinasas, por lo que ésta enzima podría ser clave en la interacción con *P. horiana*. En el caso de *C. delicatulum*, se sugiere como un actor secundario en la interacción.

Existe un marcado daño en las teliosporas sin existir contacto entre las hifas de *C. cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* y la roya, lo que sugiere la presencia de metabolitos tóxicos capaces de difundir.

## Referencias

- Assante, G, Maffi, D., Saracchi, M., Farina, G., Moricca, S., Ragazzi, A. 2004. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. *Mycological Research*, 108: 170-182.
- Assante, G., Moricca, S., Ragazzi, A., Moretti, M., Sarachi, M. y Torraca, G. 2005. Integrazione di caratteri molecolari, micro-morfologici e chemiotassonomici per la caratterizzazione di *Cladosporium tenuissimum*, iperparassita di agenti di ruggine. *Micologia Italiana*, XXXIV: 31-39.
- Assante, G., y Moricca, S. 2010. The multiple weapons of the plurivorous rust hyperparasite *Cladosporium tenuissimum*, *Phytopathologia mediterranea*, Convegno, 9789529930265, Convegno-Firenze, p. 433.
- Barnett, H.L. 1963. The nature of mycoparasitism by fungi. *Annual review of Microbiology*, 17:1-14.
- Bartnicki-García, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*, 22: 87-108.
- Barros, S.T., Oliveira, N., Bastos, S. y Maia, L. 1999. Hyperparasitism of *Cladosporium uredinicola* over *Puccinia puti* on the host *Ipomea fistulosa*. *Mycologist*, 13: 3-24.
- Bautista-Rosales, P.U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvares, N.A., y Ragazzo-Sánchez, J. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the

- control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control* 65: 293-301.
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M.C. y Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- Bensh, K., Groenewald, J.Z., Starink-Willemsse, M., Andersen, B., Sumerell, B.A., Shin, H.D., Dugan, F.M., Schroers, H.J., Braun, U. y Crous. P.W. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Micology*, 67: 1-94.
- Bensh, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. y Crous, P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in mycology*, 72: 1-401.
- Blakeman, J.P. y Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20: 167-192.
- Boland, G.J. y Hunter, J.E. 1988. Influence of *Alternaria alternata* and *Cladosporium cladosporioides* on white mold of bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10: 172-177.
- Bonde, M. R., Palmer, C. L., Luster, D. G., Nester, S. E., Revell, J. M. y Berner, D. K. 2013. Sporulation capacity and longevity of *Puccinia horiana* teliospores in infected chrysanthemum leaves. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2013-0823-01-RS.
- Bonde, M.R., Murphy, C.A., Bauchan, G.R., Luster, D.G., Palmer, C.L., Nester, S.E., Revell, J.M. y Berner, D.K. 2015. Evidence for Systemic Infection by *Puccinia horiana*, Causal Agent of Chrysanthemum White Rust, in Chrysanthemum. *Phytopathology*, 105: 91-98.
- Boosalis, M.G. 1964. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology*, 2: 363-376.
- Bowman, S. y Free, S. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28: 799-808.
- Bracker, C.E. 1967. Ultrastructure of Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 343-372.
- Braun, U. 2001. *Cladosporium exoasci*, *C. exobasidii* and some allied species. *Schlechtendalia*, 7: 53-58.
- Bull, A. y Chesters, C.G.C. 1966. The biochemistry of laminarin and the nature of laminarinase. en: Nord, F. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 28: 326-364.
- Burges, H.D. 1998. *Formulation of microbial pesticides*. Boston: Kluwer Academic Publishers. 383 p.

- Butt, T.M. y Copping, L. 2000. Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook* 11: 186-191.
- Casadevall, A., Nosanchuk, J., Williamson, P. y Rodrigues, M. 2009. Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends in Microbiology*, 17: 158-162.
- Chanda, A., Roze, L., Kang, S., Artymovich, K., Hicks, G., Raikhel, N., Calvo, A. y Linz, J. 2009. A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 19533-19538.
- Chesters, C.G.C. y Bull, A.T. 1963. The Enzymic Degradation of Laminarin. 2. The multicomponent nature of fungal laminarinases. *Biochemistry Journal*, 86: 31-38.
- Chong, J., Harder, D.E. y Rohringer, R. 1985. Cytochemical studies on *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in a compatible wheat host. I. Walls of intercellular hyphal cells and haustorium mother cells. *Canadian Journal of Botany*, 63: 1713-1724.
- Connell, J.J., Hirst, E.L. y Percival, E.G.V. 1959. The Constitution of Laminarin. Part I. An Investigation on Laminarin isolated from *Laminaria cloustoni*. *Journal of the Chemical Society*: 3494-3500.
- Cook, R.J. y Baker, K. 1983. The nature and practice of biological control of Plant pathogens. APS Press. 539 p.
- Couteaudier, Y. 1992. Competition for carbon in soil and rhizosphere, a mechanism involved in biological control of *Fusarium* wilts. en: Tijamos, E.C., Papavizas, G.C. y Cook, J. (eds.). *Biological control of Plant Diseases, progress and challenges for the future*. 99-104 pp.
- Crous, P.W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of Eucalyptus. *Mycologia Memoir* 21: 1-170.
- Crous, P.W., Groenewald, J.Z. 2005. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. *Australasian Plant Pathology* 34: 463-470.
- Darrah, P.R., Tlalka, M., Ashford, A., Watkinson, S.C. y Fricker, M.D. 2006. The Vacuole System Is a Significant Intracellular Pathway for Longitudinal Solute Transport in Basidiomycete Fungi. *Eukaryotic cells*, 5: 1111-1125.
- Deising, H., Heiler, S., Rauscher, M., Xu, H. y Mendgen, K. 1996. Cellular aspects of rust infection structure differentiation: spore adhesion and fungal morphogenesis. en: Nicole, M. y Gianinazzi, V. (eds). *Histology, ultrastructure and molecular cytology of Plant Microorganisms Interactions*. Kluwer Academic Publishers. 135-156 pp.
- Dix, N.J. y Webster, J. 1995. *Fungal Ecology*. 549 p.

- Dolińska, T.M. , Bartkowska, A. y Schollenberger, M. 2011. Light and scanning microscope observations of *Cladosporium uredinicola* growth on rust fungi. *Phytopathologia*, 61: 37-44.
- Dugan, F. M., and D. A. Glawe. 2006. *Phyllactinia guttata* is a host for *Cladosporium uredinicola* in Washington State. *Pacific Northwest Fungi* 1: 1-5. DOI: 10.2509/pnwf.2006.001.001.
- Elad, Y. y Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177-189.
- Filonow, A.B. 1998. Yeast reduce the stimulatory effect of acetate esters from apple on the germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 1555-1565.
- Fravel, D.R. y Roberts, D.P. 1991. *In situ* Evidence for the Role of Glucose Oxidase in the Biocontrol of *Verticillium* Wilt by *Talaromyces flavus*, *Biocontrol, Science and Technology*, 1: 91-99.
- Freytag, S. y Mendgen, K. 1991. Surface carbohydrates and cell wall structure of in vitro-induced uredospore infection structures of *Uromyces riciae-fabae* before and after treatment with enzymes and alkali. *Protoplasma*, 161: 94-103.
- Fricker, M.D., Lee, J.A., Bebber, D.P., Tlalka, M., Hynes, J., Darrah, P.R., Watkinson, S.C. y Boddy, L. 2008. Imaging complex nutrient dynamics in mycelial networks. *Journal of Microscopy*, 231: 317-331.
- Fleming, M., Manners, D.J. y Masson, A.J. The enzymatic degradation of laminarin. *Proceedings of the Biochemical Society*. 34-33.
- Fokkema, N.J. 1978. Fungal antagonisms in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89: 115-142.
- Gabriel, C. y Cook, J. 1990. Biological control: the need for a new scientific framework. *Bioscience*, 40: 204-206.
- García-Velasco, R., Ochoa-Martínez, D.L., Zavaleta-Mejía, E., Mora-Aguilera, G. y Gaytan-Acuña, A. 2002. Características Morfológicas de Basidiosporas de *Puccinia horiana* Henn. en *Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Polaris. *Revistas Mexicana de Fitopatología*, 20: 213-215.
- García-Velasco, R., Zavaleta-Mejía, E. y Rojas-Martínez, R. 2005. Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. Causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzcvelev). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23: 79-86.
- Gómez-Cornelio, S., Mendoza-Vega, J., Gaylarde, C., Reyes-Estebanez, M., Morón-Ríos, A., de la Rosa- García, S.C., Ortega-Morales, B. 2012. Succession of fungi colonizing

- porous and compact limestone exposed to subtropical environments. *Fungal Biology*, 116: 1064-1072.
- Gruber, S. y Seidl-Seiboth, V. 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, 158: 26-34.
- Haddad, F., Saraiva, R., Mizubuti, E., Romeiro, R. y Maffia, L. 2014. Isolation and selection of *Hemileia vastatrix* antagonists. *European Journal of Plant Pathology*, 139: 763-772.
- Harder, D.E. 1977. Electron microscopy of teliospore formation in *Puccinia coronata avenae*. *Physiological Plant Pathology*, 10: 21-28.
- Harder, D.E. 1984. Developmental ultrastructure of hyphae and spores. en: Bushnell, W. y Roelfs, A. *The cereal rusts, Vol. I. Origins, specificity, structure and physiology*. Academic Press. 333- 369 pp.
- Harder, D.E., Chong, J., Rohringer, R. y Kim, W.K. 1986. Structure and cytochemistry of the walls of urediospores, germ tubes, and appressoria of *Puccinia graminis tritici*. *Canadian Journal of Botany*, 64: 476-485.
- Heuchert, B., Braun, U. y Schubert, K. 2005. Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). *Schlechtendalia*, 13:1-78.
- Holt, R. y Hochberg, M. 1998. The Coexistence of Competing Parasites. Part II—Hyperparasitism and Food Chain Dynamics. *Journal of Theoretical Biology*, 193: 485-495.
- Ikediegwu, F.E.O. 1976. The interface in hyphal interference by *Peniophora gigantea* against *Heterobasidium annosum*. *Transactions of British Mycological Society*, 66:291.
- Inglis, G.D. y Kawchuck, L.M. 2001. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 60-70.
- Jackson, A., Walters, D. y Marshall, G. 1997. Antagonistic Interactions between the Foliar Pathogen *Botrytis fabae* and Isolates of *Penicillium brevicompactum* and *Cladosporium cladosporioides* on Faba Beans. *Biological Control*, 8: 97-106.
- Jeffries, P. y Young, T.W.K. 1994. *Interfungal parasitic relationships*. Wallingford, UK: CAB International. 296 p.
- Jeffries, P. 1995. Biology and ecology of mycoparasitism. *Canadian Journal of Botany*, 73: S1284-S1290.

- Joppien, S., Burger, A. y Reisener, H.J. 1972. Untersuchungen fiber den chemischen Aufbau von Sporen- und Keimschlauchw/inden der Uredosporen des Weizenrostes (*Puccinia graminis* var. *tritici*). Archives of Microbiology, 82: 337-352.
- Karlsson, M. *et al.* 2015. Insights on the Evolution of Mycoparasitism from the Genome of *Clonostachys rosea*. Genome Biology Evolution, 7: 465-480.
- Kiss, L. 2003. A review of fungal antagonist of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. Pest management Science, 59: 475-483.
- Kiss, L., Russell, C., Szentiványi, O., Xu, X., y Jeffries, P. 2004. Biology and Biocontrol Potential of *Ampelomyces* Mycoparasites, Natural Antagonists of Powdery Mildew Fungi. Biocontrol science and technology, 14: 635-651.
- Köhl, J., Molhoek, W., Groenenboom-de Haas, L., Goossen-van de Geijn, H., Eiben, U. 2008. *Cladosporium cladosporioides* H39: A new antagonist for biological control of apple scab. ENDURE International conference. Oral Presentations.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., ... y Salamov, A. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. Genome Biology, 12:R40.
- Kuhlman, E.G., Matthews, F.R., Tillerson, H.P. 1978. Efficacy of *Darluka filum* for biological control of *Cronartium fusiforme* and *C. strobilinum*. Phytopathology 68: 507-511.
- Leyva-Mir, S.G., Lora-Trejo, I., Cárdenas-Soriano, E. y Valdovinos-Ponce, G. 2001. Patogénesis de la Roya Blanca *Puccinia horiana* Henn. en una Variedad Susceptible de Crisantemo [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Hemsl.]. Revista Mexicana de Fitopatología, 19:191-196.
- Littlefield, L. y Heath, M. 1979. Ultrastructure of rust fungi. Academic Press. 277 p.
- Martin, K., McDougall, B., McIlroy, S., Jayus, Chen, J. y Seviour, R. 2007, Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal b -(1,3)- and b-(1,6)- glucanases. FEMS Microbiology Reviews, 31: 168-192.
- Mengden, K. 1984. Development and physiology of teliospores. en: Bushnell, W. y Roelfs, A. The cereal rusts, Vol. I. Origins, specificity, structure and physiology. Academic Press. 375-398 pp.
- Mims, C.W., Hanlin, R.T. y Richardson, E.A. 2007. Light- and electron-microscopic observations of *Cladosporium* sp. growing on basidia of *Exobasidium camelliae* var. *gracilis*. Canadian Journal of Botany, 85: 76-82.

- Moricca, S., Ragazzi, A. y Mitchelson, K.R. 1999. Molecular and conventional detection and identification of *Cladosporium tenuissimum* on two-needle pine rust aeciospores. *Canadian Journal of Botany*, 77: 339-347.
- Moricca, S., Ragazzi, A., Mitchelson, K.R. y Assante, G. 2001. Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta. *Phytopathology*, 91: 457-468.
- Moricca, S., Ragazzi, A. y Assante, G. 2005. Biocontrol of rust fungi by *Cladosporium tenuissimum*. en: Pei, M.H. y McCracken, A.R. (eds.). *Rust diseases of Willow and poplar*. CAB International: 213-219.
- Moricca, S. y Ragazzi, A. 2008. Biological and Integrated means to control rusts diseases. en: Ciancio, A. y Mukerji, K.G. *Integrated Management of Diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria*. Springer. 303-332.
- Morgan-Jones, G., & McKemy, J. M. 1990. Studies in the genus *Cladosporium* sensu lato: I. Concerning *Cladosporium uredinicola*, occurring on telial columns of *Cronartium quercuum* and other hosts. *Mycotaxon*, 39, 185-202.
- Morozov, Y., Robin, C. y Franc, A. 2007. A simple model for the dynamics of a host-parasite-hyperparasite interaction. *Journal of Theoretical Biology*, 249: 246-253.
- Narayanasamy, P. 2013 a). *Biological management of diseases of crops. Vol I: Characteristics of Biological Control Agents*. Springer. 673 p.
- Narayanasamy, P. 2013 b). *Biological management of diseases of crops. Vol II: Integration of Biological control strategies with crop disease management systems*. Springer. 364 p.
- Nasini, G., Arnone, A., Assante, G., Bava, A., Moricca, S. y Ragazzi, A. 2004. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi. *Phytochemistry*, 65: 2107-2111.
- O'Donell, K., Nirenberg, H., Aoki, T. y Cigelnik, E. 2000. A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41: 61-78.
- O'Donell, K., Ward, T., Geiser, D., Kistler, C. y Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 600-623.

- O'Keefe, G. y Davis, D.D. 2012. First Confirmed Report that *Puccinia horiana*, Causal Agent of Chrysanthemum White Rust, Can Overwinter in Pennsylvania. *Plant Disease*, 96: 1381.
- O'Keefe, G. y Davis, D. 2015. Morphology of *Puccinia horiana*, causal agent of chrysanthemum white rust, sampled from naturally infected plants. *Plant Disease*, doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0239-RE>.
- Omar, M. y Heather, W.A. 1979. Effect of saprophytic phylloplane fungi on germination and development of *Melampsora larici-populina*. *Transactions of the Brytish Mycological Society*, 72: 225-231.
- Pal, K.K. y MacSpadden, B. 2006. Biological control of plant pathogens. The plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Peat, S., Whelan, W.J. y Lawley, H.G. 1958. The structure of Laminarin. Part I. The main polymeric linkage. *Journal of the Chemical Society*: 724-728.
- Raghavendra Rao, N.N. y Pavgi, M.S. 1978. Two mycoparasites on powdery mildews. *Sydowia*, 30, 145-147.
- Reese, E. y Mandels, M. 1959.  $\beta$ -D-glucanases in fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 5: 173-185.
- Ruiz-Herrera, J. 2012. *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly*. 2nd edition. CRC Press. 203 p.
- Schippers, B. 1992. Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. en: Tijamos, E.C., Papavizas, G.C. y Cook, J. (eds.). *Biological control of Plant Diseases, progress and challenges for the future*. Springer Science+Business media. 21-34 pp.
- Sharma, J.K. y Heather, W.A. 1978. Parasitism of uredospores of *Melampsora larici-populina* Kleb. by *Cladosporium* sp. *European Journal of Forestal Pathology*, 8: 48-54.
- Sharma, J.K. y Heather, W.A. 1980. Effect of *Cladosporium aecidiicola* Thum. on the viability of urediniospores of *Melampsora medusae* Thum. in storage. *European Journal of Forestal Pathology*, 10: 360-364.
- Silar, P. 2012. Hyphal Interference: Self Versus Non-self Fungal Recognition and Hyphal Death. en: Witzany, G. (ed.). *Biocommunication of Fungi*. Springer. 155-170 pp.
- Spreafico, D. 2004. Indagine su *Cladosporium tenuissimum* Cooke e cladosporoli nel biocontrollo di *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, agente della ruggine del fagiolo. Tesi di

- Laurea (Tesis de Licenciatura). Facoltà di Agraria, Università degli studi di Milano. 99 p.
- Srivastava, A.K., Défago, G. y Kern, H. 1985. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. *Phytopathology Z.*, 114: 73-78.
- Steayert, J.M., Ridway, H.J., Elad, Y. y Stewart, A. 2003. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31: 281-291.
- Stosz, S., Fravel, D. y Roberts, D. In Vitro Analysis of the Role of Glucose Oxidase from *Talaromyces flavus* in Biocontrol of the Plant Pathogen *Verticillium dahliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3183–3186.
- Torres-Barragán, A., Zavaleta-Mejía. E., González-Chávez, C. y Ferrera-Cerrato, R. 1996. The use of arbuscular mycorrhizae to control onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) under field conditions. *Mycorrhiza*, 6: 53-257.
- Traquair, J., Meloche, R.B., Jarvis, W.R. y Baker, K.W. 1984. Hyperparasitism of *Puccinia violae* by *Cladosporium uredinicola*. *Canadian Journal of Botany*, 62: 181-184.
- Tsuneda, A. y Hiratsuka, Y. 1979. Mode of parasitism of a mycoparasite, *Cladosporium gallicola*, on western gall rust *Endocronartum harknessii*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1:31-36.
- Whipps, R. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
- Whipps J.M. y Lumsden R.D. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. en: Butt T, Jackson C, Magan N, eds. *Fungal biocontrol agents—progress, problems and potential*. Wallingford: CAB International. 390 p.
- Whipps, J.M., Sreenivasaprasad, S., Muthumeenakshi, S., Rogers, C.W. y Challen, M.P. 2008. Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 323-330.
- Whipps, J.M. y McQuilken, M.P. 2009. Biological control agents in plant disease control. en: Walters, D. (ed.). *Disease control in crops, biological and environmentally friendly approaches*. Wiley-Blackwell. 27-61 pp.
- Woodward, S. y Boddy, L. 2008. Interactions between Saprotrophic Fungi. en: Boddy L., Frankland J.C. y van West, P. *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. Elsevier. pp. 123-139.

- Zalar, P., de Hoog, G.S., Schroers, H.J., Crous, P., Groenewald, J.Z. y Gunde-Cimerman. 2007. Phylogeny and ecology of ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from saline environments. *Studies in Mycology*, 58: 157-183.
- Zhan, G., Tian, Y., Wang, F., Chen, X., Guo, J., Jiao, M., Huang, L., Kang, Z. 2014. A Novel Fungal Hyperparasite of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the Causal Agent of Wheat Stripe Rust. *PLoS One*, 9: e111484.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A. y Gullino, M.L. 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control*, 54: 172-180.

## Capítulo IV

# Actividad de los metabolitos secundarios de especies de *Cladosporium* antagonistas de *Puccinia horiana* Henn.

### Introducción

Los metabolitos secundarios han sido por mucho tiempo tema de interés, producidos por casi todos los grandes grupos de organismos. Son desde el punto de vista biológico indispensables para el desarrollo de estructuras, para la sincronización de ciclos de vida o de patrones de apareamiento y pueden conferir alguna ventaja adaptativa, por ejemplo aprovechando su función alelopática, insecticida o fungicida (Harborne, 1973; Keller *et al.*, 2005; Hanson, 2008; Teichert y Nowrousian, 2011). Nuestro estilo de vida como seres humanos, no podría ser entendido sin el estudio y aprovechamiento de éstos compuestos (Hanson, 2003; Keller *et al.*, 2005). Actualmente, cobran mayor importancia al ser útiles en tratamientos para enfermedades humanas como contra diversas enfermedades y plagas en la agricultura, en forma de agroquímicos o como control biológico no tradicional (Gómez-Rodríguez y Zavaleta-Mejía, 2001; Wedge y Smith, 2006; Hanson, 2008).

Se han encontrado diversas especies del género *Cladosporium* micoparásitas de otros hongos, en la mayoría de los casos se han propuesto compuestos secundarios clave en la interacción entre los dos organismos fúngicos, por ejemplo en el caso de *C. tenuissimum* (Nasini *et al.*, 2004). Por lo anterior y las alteraciones morfológicas determinadas, se decidió evaluar la actividad de extractos orgánicos de las especies aisladas de *Cladosporium* antagonistas de *Puccinia horiana*, con la finalidad de determinar si éstos inciden en la germinación de las teliosporas de la roya blanca del crisantemo.

## Revisión de literatura

Los metabolitos secundarios son por lo general moléculas de bajo peso molecular, restringidos a grupos particulares de organismos, bioactivos en algunos casos y no se encuentran como intermediarios en el metabolismo primario, aunque sus precursores provienen de éste (Hanson, 2003; Keller *et al.*, 2005; Dewick, 2009; Gerke y Braus, 2014). Se clasifican debido a su similitud estructural y por sus rutas de biosíntesis, siendo en algunos casos compartidas. Los hongos producen en la mayoría de los casos terpenos, compuestos nitrogenados o derivados de aminoácidos (como los alcaloides y los péptidos no ribosomales) y de manera muy importante policétidos (Keller *et al.*, 2005; Hanson, 2008; Teichert y Nowrousian, 2011).

Los terpenos son estructuras constituidas de unidades de isopreno y sintetizados por la vía del ácido mevalónico, en consecuencia estos compuestos se clasifican dependiendo del número de carbonos que los conforman (Harborne, 1973; Keller *et al.*, 2005; Hanson, 2008). Como el ácido giberélico de *Gibberella fujikuroi* (Hanson, 2003) y la ofiobolina A de *Helminthosporium maydis* (Dewick, 2009). Los compuestos nitrogenados, están caracterizados por poseer átomos de nitrógeno en sus estructuras (Dewick, 2009), destacan en importancia los péptidos no ribosomales y los alcaloides (Keller *et al.*, 2005; Teichert y Nowrousian, 2011). Los péptidos no ribosomales, son derivados de aminoácidos no proteínogénicos (Hanson, 2003), como el precursor del anillo  $\beta$ -láctamico de la isopenicilina N en *Penicillium* (Keller *et al.*, 2005). Dentro de los alcaloides, los hongos producen alcaloides indólicos, en su mayoría derivados del triptofano y del difosfato de dimetilalilo, tales como la ergotamina y el ácido lisérgico de *Claviceps* (Keller *et al.*, 2005). Sin embargo, el grupo más importante es el de los policétidos, se caracterizan por poseer grupos carbonilo y metilo de manera alternada (Baerson y Rimaldo, 2007; Hanson, 2008; Teichert y Nowrousian, 2011) y por su biosíntesis a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y metilmalonil-CoA (Keller *et al.*, 2005; Baerson y Rimaldo, 2007). Los policétidos se clasifican dependiendo del número de acetatos que formen la cadena, así existen tri-, tetra- o pentacétidos, etc., que a su vez pueden formar compuestos aromáticos, quinonas, pironas y lactonas (Hanson, 2008). La enzima responsable de su síntesis es la policétido sintasa (PKS), esta familia de proteínas de gran importancia se divide en 3 grupos (PKS I-III), caracterizados por la complejidad de sus dominios catalíticos y la estructura de los productos obtenidos (Keller *et al.*, 2005; Baerson y Rimaldo, 2007). En hongos sólo se encuentra la PKS I y la PKS III (Cox, 2007; Teichert y Nowrousian, 2011).

## **Función de los metabolitos secundarios en hongos**

Aunque no se ha asignado una función clara para todos los metabolitos secundarios en los hongos, se mencionan muchas hipótesis, entre ellas que son reguladores del desarrollo o de diferenciación celular, principalmente en la esporulación (i.e. el ácido linoléico), que son componentes esenciales de las esporas (i.e. la melanina) o simplemente que son toxinas producidas en el momento de la formación de esporas (Demain y Fang, 2000; Calvo *et al.* 2002; Gerke y Braus, 2014), como el caso de la zearalenona de *Fusarium graminearum*, que induce la esporulación, y activa la formación de peritecios (Calvo *et al.*, 2002), o la butirólactona I de *Aspergillus terreus*, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas que induce esporulación y aumenta la producción de lovastatina (Calvo *et al.*, 2002). Por otro lado, no hay que dejar de lado la función de los metabolitos secundarios como factores de virulencia (Calvo *et al.*, 2002). Como la T-toxina de *Cochliobolus heterostrophus*, agente causal del tizón de la hoja de maíz, así la raza T virulenta produce este policétido, en cambio la raza O no lo produce y no es virulenta (Teichert y Nowrousian, 2011; Kono *et al.*, 1980), igualmente existen otros casos, como la cercosporina de *Cercospora* o las melaninas de muchos hongos, con la misma función (Teichert y Nowrousian, 2011).

Particularmente, el caso de los policétidos, se les han conferido funciones de respuesta al estrés: como protección contra luz UV, inhibidores del crecimiento de otros organismos (reguladores del desarrollo) o como factores de virulencia (Keller *et al.*, 2005; Baerson y Rimaldo, 2007; Ehlrich, 2007). Muchos de estos compuestos han tenido impacto benéfico en el ser humano, ya que se les ha encontrado actividad antibiótica o terapéutica en 1% de las 5,000-10,000 estructuras conocidas, como la lovastatina (hipocolesterolémico), la doxorubicina (anticancerígeno) o la tetraciclina (antibiótico), tanto que alrededor del 20% de los fármacos empleados actualmente pertenecen a este grupo estructural (Rimado y Baerson, 2007); aunque también existen estructuras altamente tóxicas, como las micotoxinas: zearealona, fumonisinas, aflatoxinas y T-toxinas (Baerson y Rimaldo, 2007; Cox, 2007; Zhu *et al.*, 2008). Por lo cual es considerado como uno de los grupos de compuestos naturales más importante para los seres humanos (Zhu *et al.*, 2008).

## Química de *Cladosporium*

Dentro del género *Cladosporium s.lat.*, se han analizado sus metabolitos secundarios desde mediados del siglo pasado, aunque con el problema de que en la mayoría de los reportes se reporta sólo el género (i.e. *Cladosporium* sp.), por lo que su conocimiento particular dentro de las especies del género es limitado. Actualmente se conocen alrededor de 130 estructuras diferentes aisladas de éste género, aunque Frisvad (2015) reconoció 113 sólo como exometabolitos de *Cladosporium*.

Entre los policétidos, uno de los primeros en ser aislados y ampliamente estudiado es la cladosporina (=asperentina; Fig. 4.1A), aislada de *C. cladosporoides* a la par de *Aspergillus*, *Eutorium*, y *Chaetomium*, razón por la cual su sinónimo es asperentina (Scott *et al.*, 1971). A este compuesto se le ha reportado actividad antifúngica (Scott *et al.*, 1971), insecticida (Grove y Pople, 1981), bactericida (Anke, 1978), reguladora del crecimiento en plantas (Springer *et al.*, 1981) y anti inflamatoria en pulmón de ratón (Miller *et al.*, 2010). Hoepfner *et al.* (2012) reporta por primera vez el modo de acción de la cladosporina contra *Plasmodium falciparum*, el cual es inhibiendo su lisil-tRNA sintetasa citosólica. Jacyno *et al.* (1993) reportó la presencia de un isómero de la cladosporina en *C. cladosporoides*: la isocladosporina, con actividad inhibitoria del crecimiento de coleoptilos metilados de trigo. Recientemente se ha probado la efectividad de la cladosporina e isocladosporina frente a *Colletotrichum gloesporoides*, *C. acutatum*, *C. fragariae*, *Phomopsis obscurans* y *P. viticola*, según Wang *et al.* (2013), mismos que encuentran una nueva estructura de la misma familia: la 5-hidroxiasperentina. Actualmente debido a sus características estructurales y su actividad se ha intentado con éxito la síntesis artificial de la cladosporina e isocladosporina (Zheng *et al.*, 2012; Mohapatra *et al.*, 2013).

Igualmente, dentro de los policétidos se encuentra la familia del cladosporol, originalmente el cladosporol A (Fig. 4.1B) se aisló de *C. cladosporoides* (Sakagami *et al.*, 1985), posteriormente Nasini *et al.* (2004) reportan otras 4 estructuras nombradas B-E aisladas de *C. tenuissimum*. Son considerados como inhibidores de la producción de  $\beta$ -1,3 glucanos (Sakagami *et al.*, 1985), inhibidores de la germinación de urediosporas de *Uromyces appendiculatus*, aeciosporas de *Cronartium flaccidum* y *Peridermium pini* (Moricca *et al.*, 2001; Nasini *et al.*, 2004; Moricca *et al.*, 2005), inhibidores del crecimiento micelial de *Alternaria alternata*, *Helmintosporium teres*, *Phytophthora capsici*, *P. cinnamomi*, *P. erytroseptica* y *P. nicotianae* (Strefaco, 2004; Assante *et al.*,

2005). Actualmente ha sido intenso el estudio del cladosporol A como modulador de p21<sup>waf1/cip1</sup> un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, que lleva a la célula a un arresto en la fase G1 del ciclo celular, siendo un prometedor anticancerígeno (Zurlo *et al.*, 2013; 2014).

Otros policétidos aislados de *Cladosporium* sp. son el grupo de los cladosporidos (A-D; Fig. 4.1D), compuestos que inhiben el desarrollo micelial de *Aspergillus fumigatus* (Hosoe *et al.*, 2000; 2001). Los cladospolidos (Fig. 4.1E), presentan alrededor de 5 estructuras diferentes (Fuji *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2010). Aunque fueron aislados de *C. tenuissimum* y otro miembro de *Cladosporium* no identificado, se ha propuesto su función como reguladores del crecimiento en plantas, ya que los cladospolidos A-C inhiben la elongación del tallo, siendo el cladospolido C un inhibidor de la síntesis de giberelinas (Fuji *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2013). Así mismo, el cladospolido D inhibe el desarrollo de *Pyricularia oryzae* y *Mucor racemosus* (Zhang *et al.*, 2001), el cladospolido E inhibe a *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Staphylococcus aureus* (Gao *et al.*, 2010). Se han encontrado otras estructuras similares a los cladospolidos, como las estructuras aisladas de *C. tenuissimum* reportadas por Dai *et al.* (2006). Al igual que otros metabolitos se ha planteado la síntesis artificial de este grupo de compuestos (Mori y Maemoto, 1987; Reddy *et al.*, 2013).

De igual manera uno de los grupos más estudiados por su implicación médica son las calfoquinas (Fig. 4.1C), estructuralmente englobadas dentro de las perilenequinonas, aisladas de *C. cladosporoides*. Se han reportado cinco diferentes estructuras (A-I), con una alta afinidad a la proteína cinasa C (PKC; Iida *et al.*, 1989; Morgan *et al.*, 2009). La calfoquina C es la única que ha mostrado actividad contra *Streptococcus faecalis* y una mayor inhibición de la PKC a concentraciones muy bajas, también en la calfoquina D (Kobayashi *et al.*, 1989a, 1989b; Morgan *et al.*, 2009). Se ha reportado también una fuerte actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas en el caso de la calfoquina C (Kobayashi *et al.*, 1989b). Al igual que otros metabolitos y por su importancia tanto química como terapéutica, se ha planteado su síntesis artificial (Morgan *et al.*, 2009). Relacionado con lo anterior, Arnone *et al.* (1989; 1988) reportan estructuras muy similares a las calfoquinas aisladas de *C. cladosporoides* y *C. cucumerinum*, compuestos a los que nombran cladocromos (Fig. 4.1J), nombrados como A, B, D y E. En muchas ocasiones se han interpretado como sinónimos de las calfoquinas, pero es claro que aunque las diferencias son minúsculas no son los mismos compuestos, hipótesis reforzada por los mismos. Se ha pensado que presentan una actividad fitotóxica (Weiss *et al.*, 1987). Williams

*et al.* (2008) analizando a *C. cladosporoides*, agregando un inhibidor de la deacetilasa de histonas, es decir agregando un modificador epigenético, producen dos nuevas estructuras de cladocromos, los F y G, aunado a los ya conocidos A, B, D, E y calfofostina B, siendo el primer caso en donde se aislan de un sólo hongo todas estas perilenequinonas. Finalmente dentro del grupo de las perilenequinonas se encuentra el fleicocromo, aislado de *C. phlei* y *C. cladosporoides* (Yoshihara *et al.*, 1975; Arnone *et al.*, 1989). Se le ha conferido una actividad fitotóxica contra *Phleum pratense* (Yoshihara *et al.*, 1975) y frente a líneas celulares cancerígenas (Morgan *et al.*, 2009). Las perilenequinonas, son fotosensibles y tienen la capacidad de producir radicales de oxígeno que por su acumulación llevan a muerte celular, la cual se considera como otra vía posible de acción, además de la inhibición de PKC, gracias a esto se les ha considerado moléculas promisorias en cáncer (Morgan *et al.*, 2009).

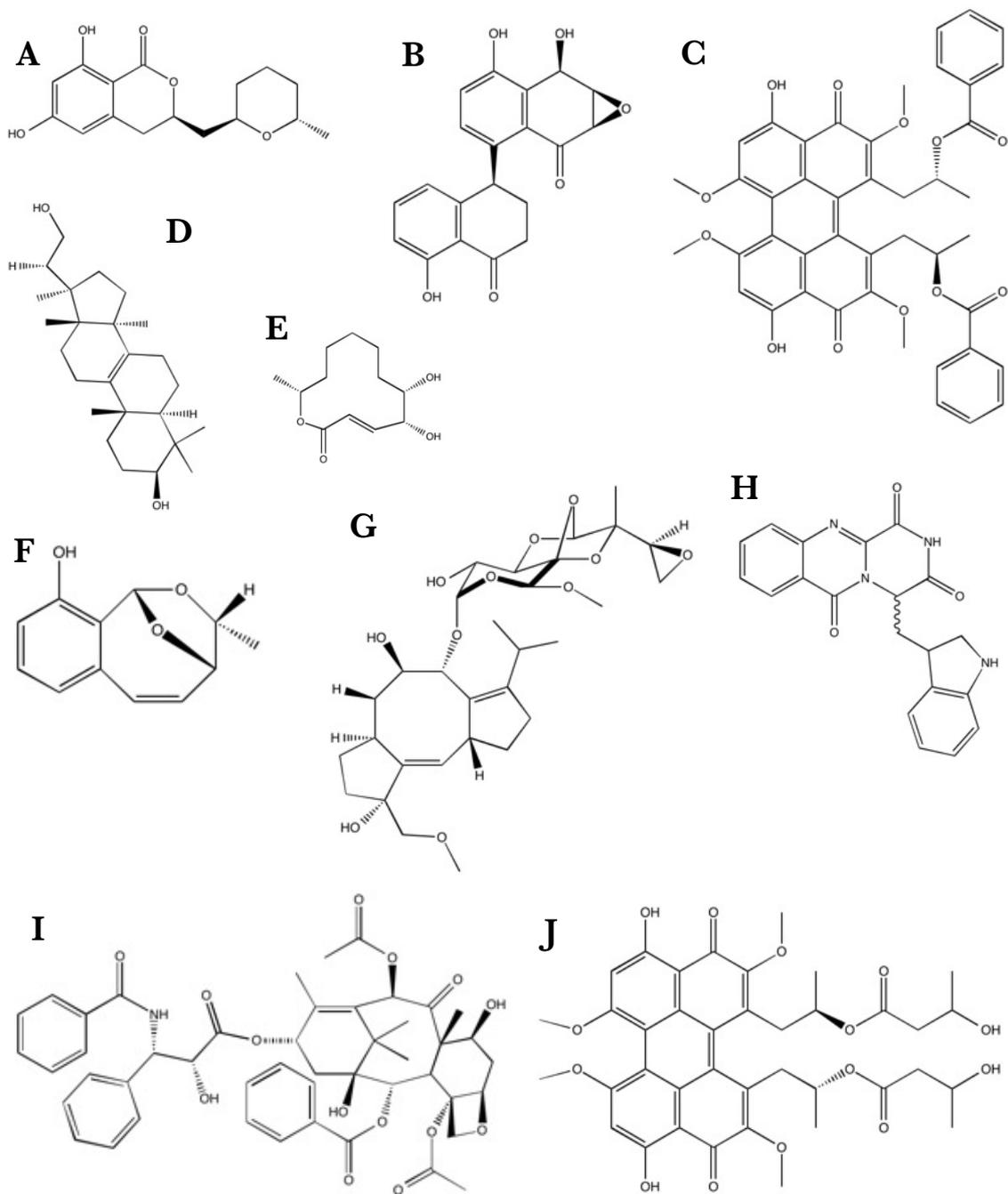
Existen otro grupo de metabolitos aislados por Wrigley *et al.* (2001) a partir de *C. cladosporoides* con forma estructural reducida de Benzo(j) 3-fluorantenonas, 4 estructuras muy similares a la bulgarodina y bulgareina de *Bulgaria inquinans*, siendo fuertes inhibidores de la tirosina cinasa. Bouillant *et al.* (1981) reporta a la micosporina 2 aislada de *C. herbarum*, en común con otros hongos como *Septoria nodorum*, *Botrytis cinerea* y *Stereum hirsutum*. Gokul Raj *et al.* (2015) confirman la presencia de paclitaxel (Fig. 4.1I) en *C. oxysporum*, evaluando su eficacia contra bacterias Gram- y Gram+, así como contra una línea celular de cáncer de colon, ofreciendo esta cepa como alternativa para la producción de este importante anticancerígeno. Otros compuestos mas se han aislado, como los dépsidos de *C. uredinicola* bacteriostáticos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (Soman de Medeiros *et al.*, 2011). Höller *et al.* (2002) reporta una serie de policétidos aislados de *Cladosporium* sp., algunos de ellos reportados anteriormente en *Alternaria*, con actividad bactericida, particularmente el ácido 3-deoxi-isocracínico y la 7-hidroxi3-(2,3-dihidroxibutil)-1(3H)-isobenzofuranona contra *Bacillus subtilis* y el cladoacetal A contra *Bacillus aureus*, además de la macrosporina y el altersolanol A.

Dentro de toda esta gama de compuestos, muchos han sido aislados de ambientes marinos, por ejemplo Ding *et al.* (2008) reportan a un miembro de *Cladosporium* sp. asociado a un estadio particular del ciclo de vida del alga roja *Porphyra yezoensis*, reportando alrededor de 13 metabolitos nuevos para el género con actividad antimicrobiana, otorgando la mayor actividad al ácido fenilacético y al ácido L-β feniláctico. Gesner, *et al.* (2005) reportó a otro

miembro de *Cladosporium* sp. aislado de la esponja *Niphates rowi*, obteniendo 3 diferentes compuestos, dos pandangolidos y el iso-cladospolido B. Smith *et al.* (2000) en un hongo aislado de una esponja, probablemente perteneciente al género *Cladosporium*, reportaba ya el iso-cladospolido B, seco-patulolido C, y los pangolidos 1-2, como componentes principales de sus extractos crudos, pero sin mostrar actividad frente a bacterias Gram- y Gram+. Este último grupo de compuestos, los pandagolidos aislados de *C. herbarum* y similares a los cladospolidos, han sido probados contra bacterias Gram- y Gram+, pero no muestran actividad inhibitoria significativa (Jadulco *et al.*, 2001).

Existen otros grupos u otros compuestos no englobados dentro de los policétidos, no tan comunes en *Cladosporium*. Tal es el caso de los derivados del ácido furancarboxílico reportados por Jacyno *et al.* (2001) en *C. herbarum*, compuestos con actividad inhibitoria de *B. subtilis* o *S. aureus*. Así mismo, la herbarina A-B y el ácido herbárico de *C. herbarum*, con actividad frente a *Artemia salina*, la citreoviridina A con una actividad contra *Spodoptera littoralis* (Jadulco *et al.*, 2002). De igual manera las tres oxilipinas obtenidas por Williams *et al.* (2008) a partir de *C. cladosporioides*. Las cotileninas (Fig. 4.1G), promotoras del desarrollo de los cotiledones de *Brassica campestris* (Sassa, 1971; Sassa y Togashi, 1973; Sassa *et al.*, 1975). Dentro de los alcaloides se han encontrado diversas estructuras, aunque no es el grupo mejor representado de metabolitos secundarios dentro de *Cladosporium*, se ha encontrado el ácido nicotínico o la N-acetilriptamina (Ding *et al.*, 2008), la oxogliantripina (14S; Fig. 4.1H), norquinadolina, deoxinortriptoquivalina, deoxitriptoquivalina, triptoquivalina y la quivadolina B, eficaces anti-virales del virus AH1N1 (Peng *et al.*, 2013). Finalmente se encuentran las cladosinas en *C. sphaerospermum*, con seis diferentes estructuras. Sólo la cladosina C es activa contra el virus de la influenza AH1N1 (Wu *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015).

Debido a las alteraciones morfológicas de las teliosporas de *Puccinia horiana* en interacción a distancia con *Cladosporium cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, se determinó el efecto inhibitorio de la germinación de *P. horiana*. Así los metabolitos secundarios (particularmente los policétidos), podrían ser moléculas clave en el antagonismo de ambas especies de *Cladosporium* contra *P. horiana*.



**Figura 4.1. Estructuras representativas de metabolitos secundarios aislados de *Cladosporium* sp.** A) cladosporina; B) cladosporol A; C) calfoestina A; D) cladosporido A; E) cladospolido A; F) cladoacetal A; G) cotilenina A; H) oxigliantripina; I) paclitaxel; J) cladocromo A.

## Objetivos

Determinar si los extractos orgánicos obtenidos de *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium pseudocladosporioides* inhiben la germinación de las teliosporas de *Puccinia horiana*.

### Particulares

Determinar el mejor medio de cultivo para la producción de compuestos secundarios de ambas especies de *Cladosporium*

Utilizando a *Botrytis cinerea* como un modelo, determinar el efecto en el desarrollo de los metabolitos secundarios de ambas especies de *Cladosporium*

## Materiales y Métodos

**Obtención de los extractos orgánicos de *Cladosporium*.** Se cultivó *C. cladosporioides* (aislamientos DETSC1A y DETSC1B) y *C. pseudocladosporioides* en dos medios líquidos nutritivos diferentes, el primero: PDB (Papa-Dextrosa), preparado con 20 g de papa comercial y 20 g/L<sup>-1</sup> de glucosa; el segundo (medio CL) se encuentra detallado en el Cuadro 4.1. En ambos medios se crecieron las dos especies por 14 días, 150 rpm de agitación y temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una triple extracción con AcOEt/MeOH 99:1, se filtró, pasó por un embudo de separación, secó con MgSO<sub>4</sub> y rotavaporó, obteniendo así el extracto crudo que se secó con en vacío y finalmente se peso para comparar el rendimiento entre los dos medios nutritivos.

**Fraccionamiento de los extractos orgánicos.** El extracto seco obtenido a partir de medio CL de los diferentes aislamientos de *Cladosporium*, se fraccionó por medio de cromatografía en capa delgada preparativa, en placas de 20 × 20 cm de silica con 5 mm de espesor, aplicando 100 mg de extracto crudo por placa. Como fase móvil se utilizó Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>/MeOH 15:1. Posteriormente, las placas se revisaron en una lámpara de luz UV a 352 nm, se marcaron las fracciones de interés, que se revelaban a esa longitud de onda y finalmente se obtuvieron con una espátula, lavando con Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>/MeOH 99:1. Las fracciones se colectaron y secaron con N<sub>2</sub>.

**Cuadro 4.1.** Medio de cultivo (CL) utilizado para la producción de los extractos orgánicos de *Cladosporium cladosporioides* (DETSC1A y DETSC1B) y *C. pseudocladosporioides* (DETSC03).

**Chen et al., 2009 (Medio CL)**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Glucosa	1%
Sacarosa	2%
Harína de soya	0.25%
Extracto de levadura	0.05%
Sulfato de Magnesio	0.03%
Fosfato monopotásico	0.035%
Fosfato dipotásico	0.056%
Vitamina B1	10 mg/l
Tricloruro de Fierro	2 mg/l
Sulfato de Zinc	2.5 mg/l
Ioduro de potásio	0.7 mg/l
Ácido bórico	1.4 mg/l

pH 6.8

**Actividad biológica contra *Puccinia horiana*.** Se preparó una suspensión de  $1.5 \times 10^4$  teliosporas/mL de *P. horiana*, en la concentración final del experimento. Se probó la actividad de los extractos orgánicos y las fracciones obtenidas, disueltos en DMSO a una concentración de 33.3 mg/mL. En el caso de los extractos crudos se probaron tres concentraciones diferentes disueltas en agua destilada estéril, con una concentración máxima de 0.3% DMSO, para las fracciones orgánicas de cada extracto se utilizaron cuatro concentraciones con las mismas características. En una micro-placa de 96 pozos, se tomaron 50  $\mu$ l de las diferentes fracciones diluidas en agua destilada estéril y 50  $\mu$ l de la suspensión de teliosporas por pozo, cada concentración por triplicado. Se incubó por 48 h a 22°C, con un fotoperiodo de 12 h. Pasado el tiempo se contó el número de teliosporas germinadas y no germinadas.

Se calculó el % de inhibición de la germinación, mediante la siguiente fórmula:

$$\%IG = [(\%G \text{ control} - \%G \text{ tratamiento}) / \%G \text{ control}] \times 100$$

En donde: %G control= porcentaje de germinación en el control sólo con agua destilada y

%G tratamiento= porcentaje de germinación en el tratamiento con el extracto orgánico o fracción del mismo.

**Actividad biológica contra *Botrytis cinerea* como modelo.** Se siguió la metodología de Raposo *et al.* (1995). Para tal fin, se preparó una suspensión de conidios (agua destilada estéril y 15% de glicerol) a una concentración final de  $10^4$  conidios/mL de las cepas BC117 y BC120, disponibles en la Universidad de Milán, Italia. Las fracciones orgánicas se disolvieron en DMSO a una concentración de 33.3 mg/ml, las concentraciones se ajustaron sin sobrepasar 0.3% DMSO dentro del medio líquido. El medio utilizado fue PDB 2X (Papa-Dextrosa) en donde se ajustaron las concentraciones, así mismo este medio fue utilizado como control positivo y como control positivo adicional se utilizó PDB2X+0.3%DMSO, para comparar el efecto del DMSO. Como control negativo se utilizó Boscalid<sup>©</sup> a una concentración de 200 µg/ml. En una micro-placa de 96 pozos, se tomaron 50 µl de las diferentes fracciones disueltas en PDB2X y 50 µl de la suspensión de conidios por pozo, inmediatamente después se tomó una primera medición de absorbancia empleando un lector de microplacas con un filtro a 492 nm, la placa se incubó por 72 h a 20°C y pasado el tiempo se volvió a tomar la lectura de absorbancia. Se realizaron dos réplicas del experimento.

Para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento se siguió la siguiente fórmula:

$$\%IC = [(At_x - At_0) \text{ no tratados}] - [(At_x - At_0) \text{ tratados}] / [(At_x - At_0) \text{ no tratados}] \times 100$$

En donde:  $At_0$  = Lectura del pozo al tiempo 0,  $At_x$  = Lectura del pozo al tiempo x.

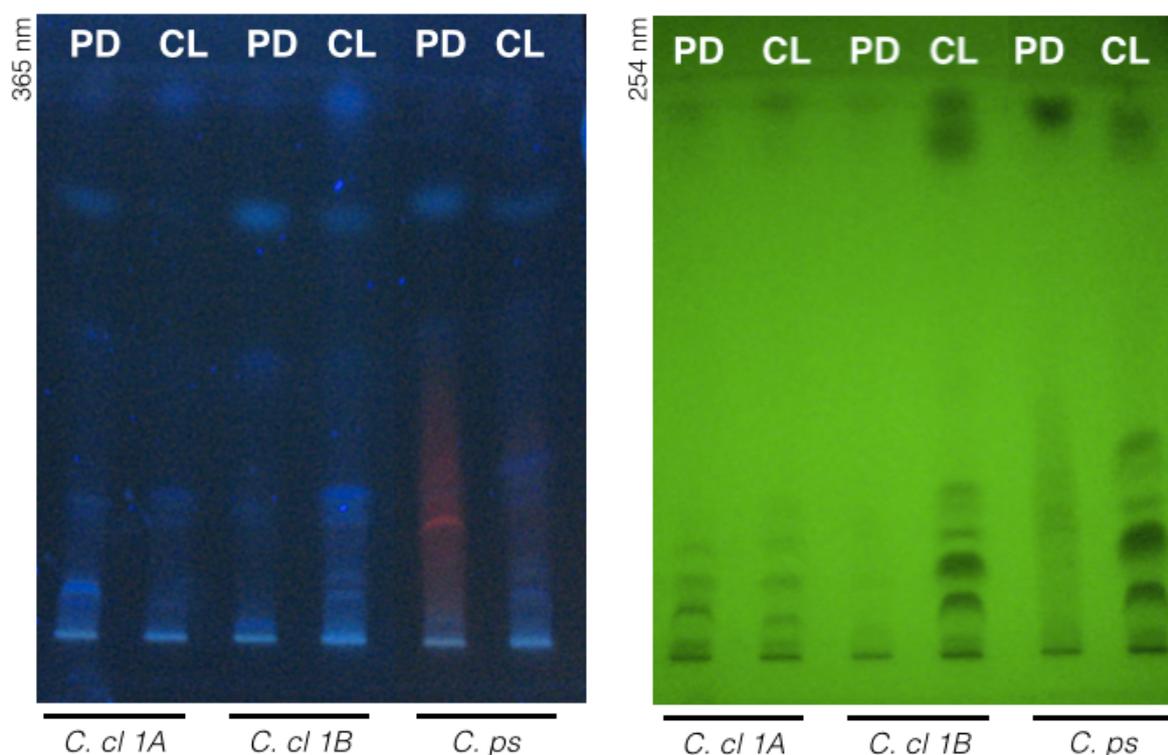
**Análisis de datos.** Se calculó la  $CI_{50}$  para cada fracción, a las 24 h en el caso de *B. cinerea* y a las 48 h en el caso de *Puccinia horiana*, debido a las características de los resultados, utilizando una regresión Probit (Finney, 1971) en SPSS Statistics 21.0<sup>©</sup>. Los resultados del porcentaje de inhibición y  $CI_{50}$  fueron analizados estadísticamente por medio de una ANOVA de una vía. Para conocer sus asunciones, la distribución normal fue verificada con la prueba de Shapiro-Wilk [ $P > 0.05$ ] y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene [ $P > 0.05$ ]. Las diferencias entre las medias se calcularon con la prueba post hoc Ryan-Einot-Gabriel-Welch, basada en una prueba de F [ $P > 0.05$ ]. Todos los análisis se realizaron en SPSS Statistics 21.0<sup>©</sup>.

## Resultados

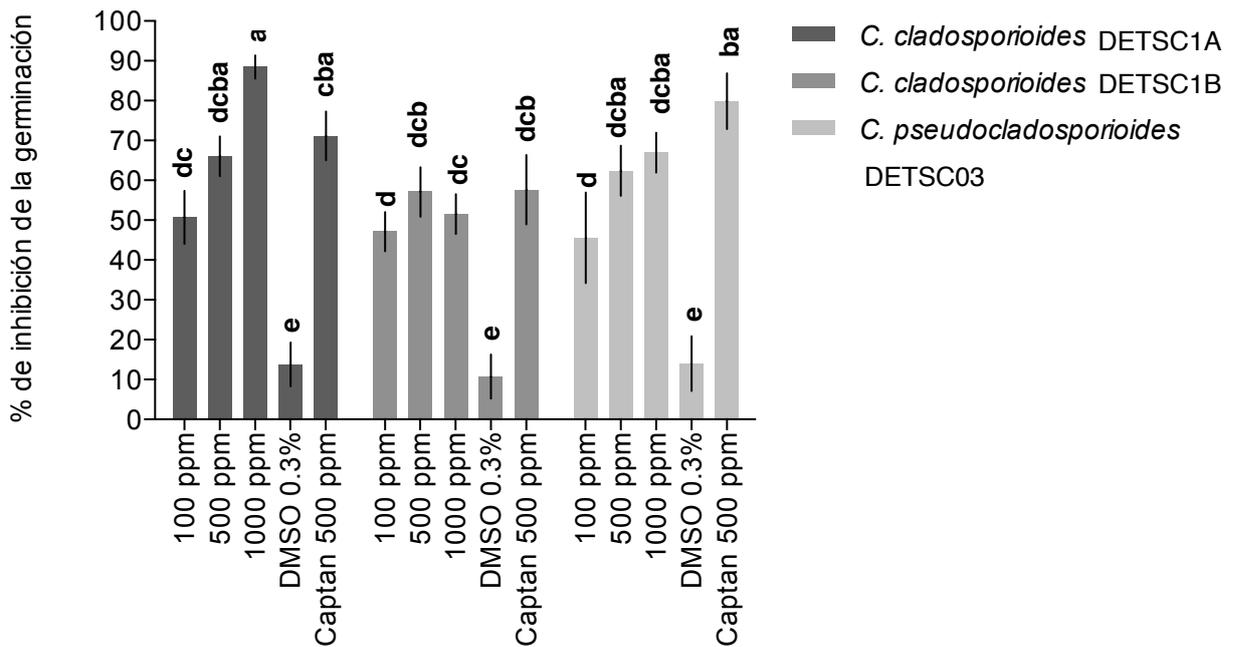
Se obtuvieron los extractos orgánicos de AcOEt/MeOH de ambas especies, los rendimientos encontrados se encuentran en el Cuadro. 4.2. El mejor medio de cultivo para la producción de metabolitos secundarios en *Cladosporium* fue el medio CL (Chen *et al.*,2009), comparando con el medio PD. Así mismo, la especie que produjo mayor cantidad de extracto orgánico fue *C. pseudocladosporioides*, seguido del aislamiento DETSC1B de *C. cladosporioides*, aunque con una estrecha diferencia con el aislamiento DETSC1A de la misma especie. Recordando que la diferenciación de estos aislamientos surge por la morfología de la colonia, detallada en el capítulo II.

**Cuadro 4.2. Rendimiento de los extractos orgánicos de las diferentes especies/cepas de *Cladosporium* a partir de 1L de medio de cultivo líquido.** PD= papa-dextrosa; CL= medio detallado en el Cuadro 4.1

Medio	<i>C. cladosporioides</i> 1A	<i>C. cladosporioides</i> 1B	<i>C. pseudocladosporioides</i>
PD	0.1375 g	0.1172 g	0.2255 g
CL	0.1239 g	0.1395 g	0.3016 g



**Figura 4.2. Cromatografía en capa delgada de los diferentes extractos orgánicos de *Cladosporium* con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1 como fase móvil.** Comparación de los diferentes perfiles cromatográficos observados a dos longitudes de onda. Se aplicó 10 µl a una concentración de 2 mg/ml en cada carril. C.cl. 1A= DETSC1A; C.cl 1B= DETSC1B; C.ps=DETSC03. PD y CL, son los dos medios diferentes



**Figura 4.3. Inhibición de la germinación de las teliosporas de *Puccinia horiana* a las 48 h, con los extractos orgánicos obtenidos a partir de medio CL, de los diferentes aislamientos de *Cladosporium*.** Se calculó una ANOVA de una vía, con una comparación poshoc, letras iguales indican no diferencias significativas a  $P < 0.05$  (REGW- $F$  test).

Los resultados obtenidos en la cromatografía en capa delgada, evidenciaron una diferencia cualitativa y cuantitativa entre el extracto producido en medio CL y en medio PD. Los perfiles con mayor complejidad en todos los casos pertenecen a los extractos orgánicos obtenidos a partir de medio CL. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las pruebas en la inhibición de la germinación de las teliosporas se desarrollaron solo con los extractos a partir de medio CL.

La actividad a las 48 h se vio reflejada en una inhibición de la germinación de alrededor del 50%, aún en los casos en donde las concentraciones más bajas no tuvieron muy buena actividad (Fig. 4.3). El mejor porcentaje de inhibición lo presenta la concentración de 1000 ppm de *C. cladosporioides* DETSC1A, llegando a alrededor del 90% de inhibición, cercanos a la inhibición causada por el fungicida a 500 ppm en los ensayos de *C. cladosporioides* DETSC1A y *C. pseudocladosporioides* ((DETSC03; Fig. 4.3). Es claro que existe una diferencia en actividad respecto a los dos aislamientos de *C. cladosporioides*, así en el aislamiento DETSC1B, todas las concentraciones alcanzan un porcentaje de inhibición entre el 50% y el 60%, muy similar a lo encontrado con el fungicida a una concentración de 500 ppm en ese mismo ensayo. Por lo cual, la concentración más alta (1000 ppm) es similar estadísticamente a la concentración más baja de DETSC1A, observación que pudiera estar basada en las

diferencias en complejidad y cantidad de los extractos obtenidos de cada uno de los aislamientos, sugiriendo que el extracto de DETSC1B es el que presenta menor actividad inhibitoria de la germinación en teliosporas de *P. horiana* (Fig. 4.3). Finalmente, *C. pseudocladosporioides* (DETSC03) presenta una inhibición de la germinación por arriba del 60% en sus concentraciones más altas (500 y 1000 ppm), similares estadísticamente a la concentración de 500 ppm de *C. cladosporioides* DETSC1A. Este extracto fue el segundo más efectivo en inhibir la germinación de las teliosporas (Fig. 4.3).

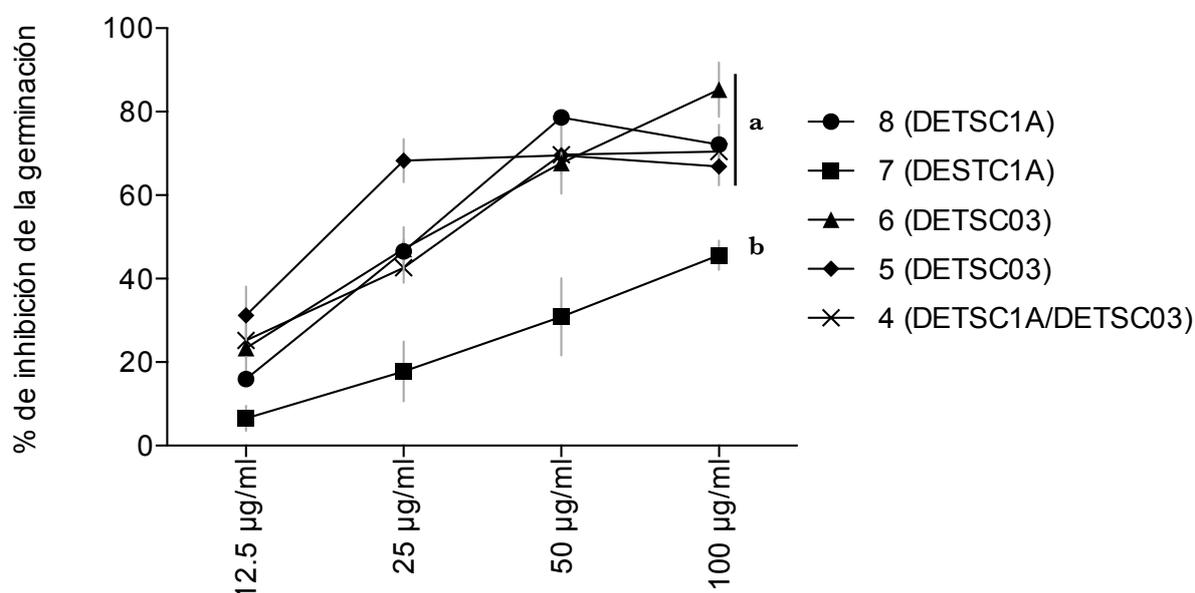
Posteriormente, se llevó a cabo un fraccionamiento de los extractos de *C. cladosporioides* DETSC1A y *C. pseudocladosporioides* (DETSC03), los más activos, obteniéndose los rendimientos totales del Cuadro 4.3. Las fracciones 2 y 4 de ambas especies, resultaron ser las mismas mediante CCD, por lo que se optó por utilizar aquellas en mayor cantidad, es decir las de *C. pseudocladosporioides* (DETSC03). Con estas fracciones se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la germinación en teliosporas, del total de fracciones obtenidas, sólo 5 mostraron actividad, es por esto que a continuación sólo se muestran los resultados de las fracciones 4, 5, 6, 7 y 8 (Cuadro 4.3; Fig. 4.4) de ambas especies de *Cladosporium*.

**Cuadro 4.3. Rendimiento del total de las fracciones obtenidas a partir de los diferentes extractos orgánicos (600 mg) de ambas especies de *Cladosporium*. C1A= *C. cladosporioides* DETSC1A; Cps= *C. pseudocladosporioides* DETSC03.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Cps</b>	11 mg	8 mg	8.5 mg	38.5 mg	10.5 mg	16.5 mg	-	-	-
<b>C1A</b>	-	6 mg	-	19 mg	-	-	15 mg	17 mg	5 mg

A partir de las fracciones obtenidas, se muestra una acción inhibitoria de la germinación en las teliosporas de *P. horiana* (Fig. 4.4), con la cual se pudo calcular la CI<sub>50</sub> (Cuadro 4.4). La fracción menos efectiva pertenece a la fracción 7 de *C. cladosporioides* DETSC1A, mostrando a una inhibición de hasta el 40%, resultados muy bajos, por lo que su CI<sub>50</sub> es relativamente alta, y estadísticamente diferente a la de las demás fracciones (Cuadro 4.4). Las fracciones 5 y 6 exclusivamente de *C. pseudocladosporioides* (DETSC03), la 8 de *C. cladosporioides* DETSC1A y la 4 de ambas especies, fueron las más efectivas, no encontrándose diferencias significativas a la concentración más alta de 100 mg/mL (Fig. 4.4), ni en las CI<sub>50</sub> (Cuadro 4.4). La fracción 4 y 8 de *C. cladosporioides* DETSC1A con inhibiciones entre el 70 y el 80%, parecen ser la clave de la actividad de los extractos orgánicos (Fig. 4.4), ambas en mayor proporción dentro del extracto (Cuadro. 4.3), aunque no se descarta que su interacción entre ellas, o ya sea con otros compuestos dentro del extracto sean las responsables de la inhibición encontrada a 1000 ppm de ese extracto orgánico (Fig. 4.4). Así mismo las CI<sub>50</sub> tienen valores bajos cercanos a 30 mg/mL, lo que habla de una buena efectividad (Cuadro 4.4). En el caso de *C. pseudocladosporioides*

(DETSC03), las fracciones 4, 5 y 6, las tres en mayor proporción dentro del extracto (Cuadro 4.3), presentan valores de inhibición entre el 60 y el 80% (Fig. 4.4), hipótesis sustentada por los valores de  $CI_{50}$ , entre 19.8 y 28.5 mg/mL (Cuadro 4.4), fracciones que parecen ser las que le otorgan la actividad dentro del extracto orgánico de ésta especie (Fig. 4.3).



**Figura 4.4. Inhibición de la germinación de las teliosporas de *Puccinia horiana* a las 48h, en contacto con diferentes fracciones obtenidas a partir de los extractos orgánicos de los aislamientos de *Cladosporium* spp.** Se calculó una ANOVA, sólo para las concentraciones más altas (100 mg/ml), letras diferentes implican diferencias significativas a  $P < 0.05$  (REGW- $F$  test). No hubo diferencias significativas entre el tratamiento con  $H_2O$  y el tratamiento  $H_2O+DMSO$  0.3%, el porcentaje de germinación fue por arriba del 80%, como control positivo se utilizó Captan a 100 µg/ml, en donde la inhibición fue por arriba del 80%. DETSC03= *C. pseudocladosporioides*, DETSC1A= *C. cladosporioides*.

Por otro lado, al ser *P. horiana* un patógeno obligado no es posible evaluar el efecto de las fracciones de los extractos orgánicos en la formación de micelio, por lo cual optamos por el modelo de *Botrytis cinerea*, evaluando en este caso la inhibición del desarrollo micelial, cada 24h por 72h. En *B. cinerea*, los compuestos antes mencionados tienen un efecto contrastante en comparación con la germinación de teliosporas de *P. horiana*. A las 24 h existe una inhibición por arriba del 60% con las fracciones 5 y 6 de *C. pseudocladosporioides* (DETSC03), así como con la 7 de *C. cladosporioides* DETSC1A, siendo la fracción 6 la más activa a 200 µg/ml con casi un 100% de inhibición (Fig. 4.5A), en cambio las fracciones 8 de *C. cladosporioides* DETSC1A y fracción 4 de ambas especies, muestran los valores más bajos de inhibición alrededor del 20%, con las concentraciones más altas de 200 µg/ml. A las 48 h, las fracciones 8 y 7 de *C. cladosporioides* DETSC1A pierden casi por completo su actividad, las 5 y 6

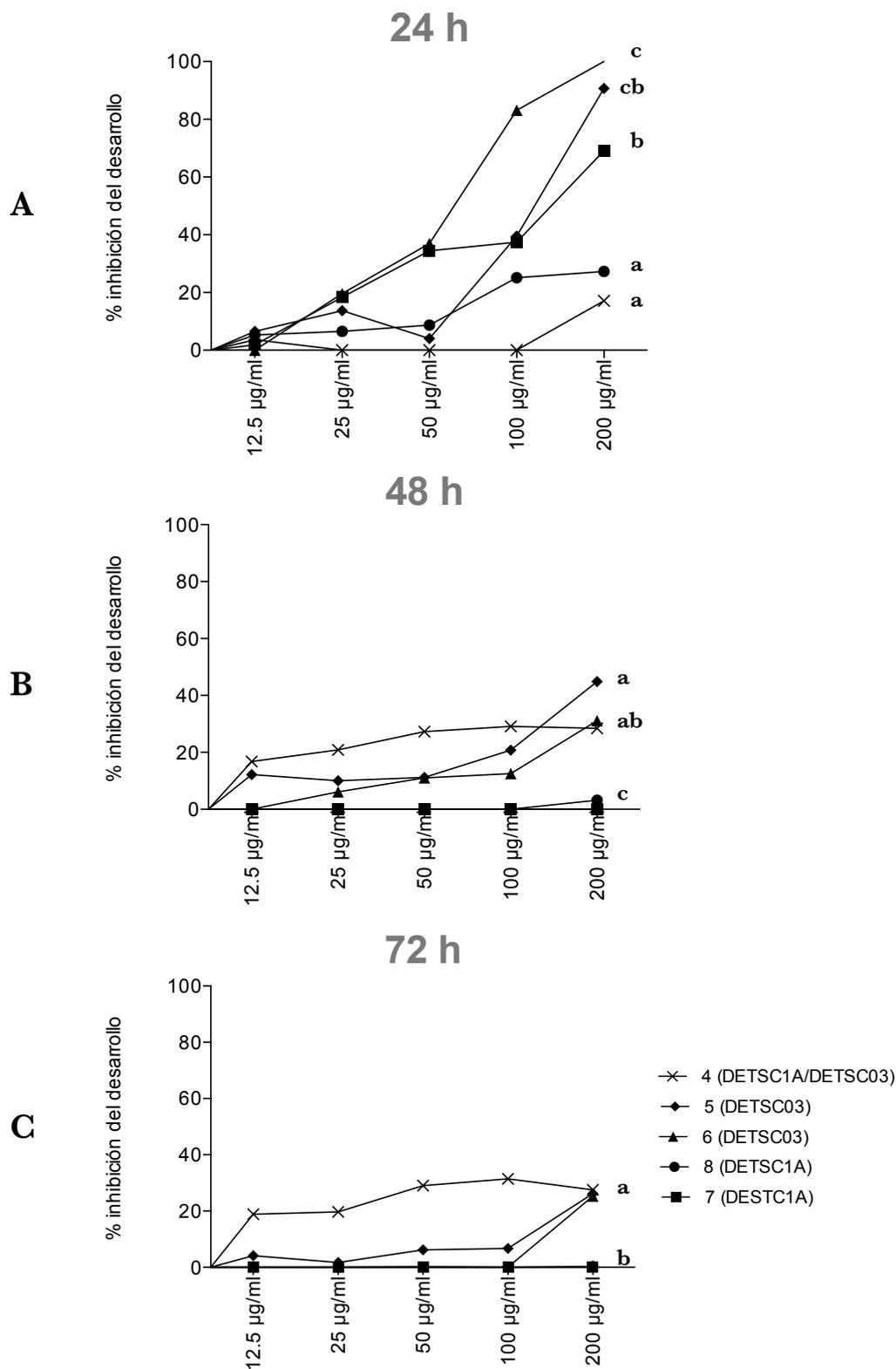
disminuyen la inhibición a 40%, una merma importante en actividad inhibitoria, así como la fracción 4 de ambas especies repunta en alrededor de 30% de inhibición (Fig. 4.5B).

Finalmente, a las 72 h, las fracciones 7 y 8 de *C. cladosporioides* DETSC1A han perdido por completo su actividad, la 5 y 6 de *C. pseudocladosporioides* (DETSC03) conservan actividad a la concentración más alta, observándose solamente un 20% de inhibición, de las 48 a las 72 h existe casi la mitad de pérdida de actividad en éstas fracciones (Fig. 4.5C). La fracción 4 presente en ambas especies, mantiene la actividad de las 48 h de obteniéndose alrededor del 30% de inhibición. En ambos tiempos las cuatro concentraciones presentan una actividad muy similar. La actividad inhibitoria de esta fracción comienza después de las 24 h, manteniéndose en valores bajos (Fig. 4.5).

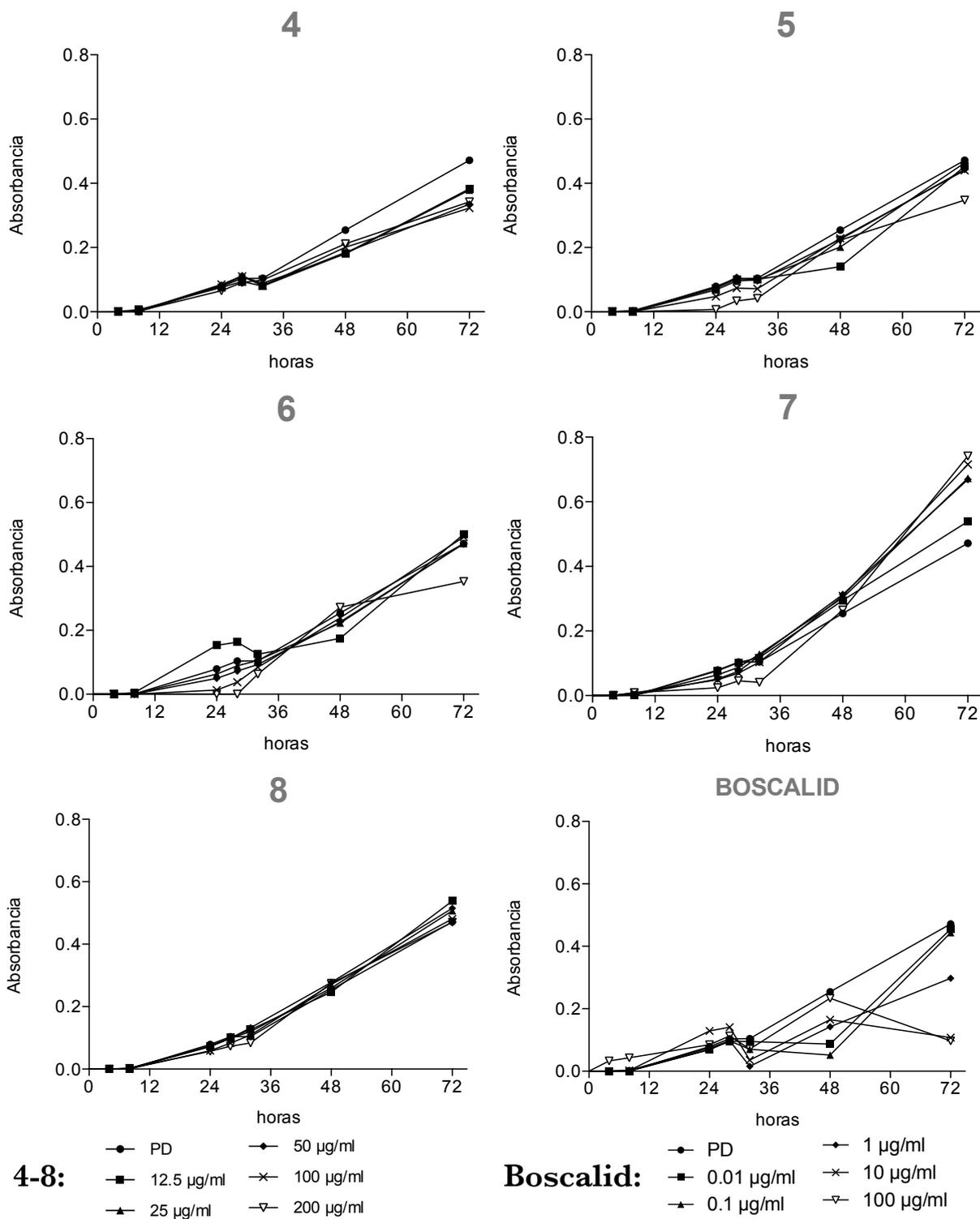
Al encontrarse una mejor actividad inhibitoria del desarrollo micelial a las 24h, el cálculo de la  $CI_{50}$  se realizó a ese tiempo. Los valores más bajos, entre 47 y 71  $\mu\text{g/ml}$  se obtuvieron con las fracciones 5 de *C. pseudocladosporioides* (DETSC03) y 8 de *C. cladosporioides* DETSC1A, respectivamente (Cuadro 4.4). En los otros casos, las fracciones tienen  $CI_{50}$  bastante elevadas, aunque estas diferencias son débiles (Cuadro 4.4). Las diferencias en el efecto de éstas fracciones se pueden observar en la Fig. 4.6, en donde se muestra la curva de desarrollo. En contacto con las fracciones menos activas a las 24 h se muestra una disminución en el desarrollo, pasado ese tiempo el desarrollo se torna de manera normal, exceptuando el caso de la fracción 7 que pareciera estimula el crecimiento, aunque esta aseveración tendría que ser analizada a mayor detalle.

**Cuadro 4.4.  $CI_{50}$  de las cinco diferentes fracciones obtenidas de ambas especies de *Cladosporium*, en contacto con diferentes *P. horiana* y *B. cinerea*.** En el caso de *Botrytis cinerea* se refiere a la  $CI_{50}$  inhibitoria del desarrollo micelial, en el caso de *P. horiana* se refiere a la  $CI_{50}$  inhibitoria de la germinación de las teliosporas. Letras diferentes dentro de *P. horiana*, implican diferencias significativas a  $P < 0.05$  (REGW-F test), lo mismo en el caso de *B. cinerea* a  $P < 0.1$  (REGW-F test)

Fracción	<i>B. cinerea</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>P. horiana</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Especie
4	288.631 <b>ac</b>	29.73 <b>b</b>	<i>C. pseudocladosporioides</i> / <i>C. cladosporioides</i>
5	47.34 <b>a</b>	19.845 <b>b</b>	<i>C. pseudocladosporioides</i>
6	277.64 <b>ac</b>	28.581 <b>b</b>	<i>C. pseudocladosporioides</i>
7	760.47 <b>c</b>	113.001 <b>a</b>	<i>C. cladosporioides</i>
8	61.78 <b>a</b>	31.612 <b>b</b>	<i>C. cladosporioides</i>



**Figura 4.5. Inhibición del desarrollo de *Botrytis cinerea*, en contacto con cinco fracciones de *C. cladosporioides* DETSC1A y *C. pseudocladosporioides* (DETSC03). Se calculó una ANOVA de una vía, letras diferentes implican diferencias significativas a  $P < 0.05$  (REGW- $F$  test) a la máxima concentración (200 µg/ml). No hubo diferencias significativas entre el tratamiento con H<sub>2</sub>O y el tratamiento H<sub>2</sub>O+DMSO 0.3% y 0.6%. Como control positivo se utilizó Boscalid a las mismas concentraciones de las fracciones utilizadas.**



**Figura 4.6. Crecimiento de *Botrytis cinerea* expresado en valores de absorbancia a 492 nm.** Los números sobre las gráficas (1-8) corresponden a las fracciones a la que fue expuesto *B. cinerea*. Se muestra el comportamiento del control con Boscalid a diferentes concentraciones.

Por lo cual la actividad de las fracciones obtenidas está en función del tiempo de exposición, lo que sugiere una afectación parcial de los conidios de *B. cinerea* causando un retraso en la germinación y desarrollo, pero sin tener un efecto fungicida sobre este hongo modelo.

## Discusión

La biosíntesis de metabolitos secundarios está influenciada en gran medida por las características ambientales, como las fuentes de nitrógeno, de carbono, la temperatura y la luz (Hanson, 2008; Rohlf, *et al.* 2009). Estas propiedades ambientales se modifican de manera artificial mediante medios nutritivos de cultivo. Así, el cultivo de ambas especies de *Cladosporium* se realizó en un medio nutritivo líquido bastante complejo (Cuadro 4.1), con el cual Chen *et al.* (2009) creciendo *Alternaria alternata* var. *monosporus*, obtuvieron rendimientos de 2 g a partir de 200 ml de medio de cultivo, por lo que se sugiere el uso de éste medio como un buen sustrato para la obtención de compuestos secundarios, particularmente policétidos similares al cladosporol, moléculas reportadas en el género *Cladosporium*. Los componentes de éste medio, como una amplia fuente de carbono y una extensa distribución de macronutrientes y micronutrientes, son participantes activos en la formación de biomasa, una de las razones del aumento en el rendimiento con éste medio (Lilly y Barnett, 1951; Jones y Jennings, 1965; Jennings, 1995; Hanson, 2008; Walker y White, 2011). Así mismo la presencia de tiamina (vitamina B1), factor del desarrollo en hongos, siendo cofactor importante de las enzimas que participan en el metabolismo del carbono (Lilly y Barnett, 1951; Jennings, 1995) y su derivado, el pirofosfato de tiamina es el cofactor de la piruvato deshidrogenasa, enzima clave junto con la dihidrolipoil transacetilasa y deshidrogenasa, en la biosíntesis de la acetil-CoA a partir del ácido pirúvico, producto final de la glucólisis dentro del metabolismo del carbono (Herbert, 1981; Nelson y Cox, 2008). La acetil-CoA, junto con la malonil-CoA (producida por la acetil-CoA carboxilasa), son los precursores en la biosíntesis de los policétidos (Baerson y Rimando, 2007; Schueman y Hertweck, 2009), así mismo puede participar en la formación de compuestos heterocíclicos en agua de manera artificial (Liu *et al.*, 2012). En consecuencia, una buena cantidad de carbohidratos, más una serie de macro- y micronutrientes que estimulan el metabolismo del carbono, así como otras vías metabólicas con incidencia en el desarrollo micelial, junto con la tiamina que participa en el metabolismo del carbono y que promueve la formación de los precursores de policétidos, podría ser la explicación a las diferencias en complejidad y rendimiento de los extractos orgánicos, entre el medio nutritivo propuesto por Chen *et al.* (2009) y el medio de papa-dextrosa, sugiriéndose el primero como un sustrato nutritivo efectivo para la producción de policétidos y compuestos de origen similar en hongos.

En su mayoría se han aislado solamente policétidos a partir de *Cladosporium* sp., con excepción de algunos alcaloides y terpenos (Ding *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2014; Frisvad, 2015). Los policétidos de manera general se obtienen mediante extracción orgánica con acetato de etilo, en combinación con algún solvente de mayor polaridad como el metanol, por lo cual, podemos pensar que la complejidad de los extractos orgánicos de las especies *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, tiene su origen dentro del grupo de los policétidos. Aun así, la única aseveración particular dentro de la dilucidación química de estas especies, es que no producen cladosporol ni ninguno de sus derivados (Rojas-Martínez *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015). Rojas-Martínez *et al.* (2015) mencionan que la interacción de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, no produce malformaciones hifales en *Phytophthora acerina* y *P. ramorum*, relacionado con la ausencia de compuestos inhibitorios de la síntesis de  $\beta$ -glucanos (Fukushima *et al.*, 1993; Sakagami *et al.*, 1995), aunque disminuye el diámetro de las colonias de los oomicetos, restringe su crecimiento e induce drásticamente la formación y aborción de estructuras reproductoras. La ausencia de cladosporol, habla de la plasticidad genética dentro del complejo *C. cladosporioides*, ya que ésta molécula fue aislada por primera ocasión a partir de ésta especie (Sakagami *et al.*, 1995; Assante *et al.*, 2006), posteriormente a partir de *C. tenuissimum*, especie muy cercana (Bensh *et al.*, 2010; 2012; Fig. 2.3), se lograron aislar 4 estructuras similares al cladosporol (Nasini *et al.*, 2004; Assante *et al.*, 2005), en contraste estos compuestos están ausentes en *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* aislados en México, en asociación con *P. horiana*. Esta plasticidad genética se ha reportado en otras especies del género, como *C. herbarum* (Schubert *et al.*, 2007).

La producción de metabolitos secundarios, se encuentra claramente determinada por las características ambientales (Hanson, 2008; Rohlf, *et al.* 2009), así las condiciones de aislamiento *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* en pústulas de *P. horiana*, a partir de crisantemo en producción comercial intensiva, son muy particulares en comparación con las reportadas para los demás aislamientos reportados en la literatura, por lo que estas características ambientales definitivamente podrían influir en la complejidad de compuestos secundarios producidos por ambas especies. En *Cladosporium* aunque se conoce una amplia diversidad estructural de policétidos (Frisvad, 2015), en muy pocas ocasiones se reporta el nombre de la especie que los produce, llegando solamente a referirse como *Cladosporium* sp., esto aunque aumenta el conocimiento del género, no lo hace así para las especies particulares dentro del mismo. Por ejemplo Silber *et al.* (2014) purifican cinco estructuras de maletinina,

con actividad antibacteriana y fungicida; no obstante la incapacidad de diferenciar entre *C. cladosporioides*, *C. uredinicola* y *C. pseudocladosporioides*, el reporte solo llega a *Cladosporium* sp. o bien, el ejemplo de García-Velasco *et al.* (2005), en donde encuentran altos niveles de control de la roya blanca del crisantemo y se postula la posibilidad de que ésta cepa actué mediante el efecto de sus metabolitos secundarios, sin llegar a identificar la especie, quedando el reporte como *Cladosporium* sp.

*Cladosporium cladosporioides* es una de las especies comunmente aislada, a partir de una gran diversidad de sustratos (Bensh *et al.*, 2010; 2012). Debido a ésta característica, a sus metabolitos secundarios se les han conferido una serie de actividades como fungicida (Pandey *et al.*, 1993; Chalfoun, 2010; Wang *et al.*, 2013), bactericida (Sette *et al.*, 2006), inductores del desarrollo (Mori y Maemoto, 1987; Paul y Park, 2013), anticancerígena (Kobayashi *et al.*, 1989a,b) y antiprotozoarios (Hoepfner *et al.*, 2012), lo que ha tenido impacto en su utilización como agente de control biológico, por ejemplo en bayas de café (Chalfoun, 2010). Reportes que apoyan la actividad demostrada en esta investigación. En cuanto a *C. pseudocladosporioides*, su reciente determinación y la controversia en su clasificación (Bensh *et al.*, 2010; 2012), aunado a la falta de reportes sobre su biología hace complicado su análisis dentro de la literatura existente. En el único reporte de actividad biológica, Ellsworth *et al.* (2013) la encontró como endófita de *Nuphar lutea*, evaluó su actividad, demostrando la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en  $12.4 \pm 0.8\%$  a las 24h (200 µg/ml de medio nutritivo filtrado). Datos que contrastan con la actividad reportada en el presente trabajo contra *P. horiana*, ya que los valores de la inhibición en el extracto crudo entre las concentraciones de 100 ppm y 500 ppm, reflejan una inhibición del 50-60% a las 48 h. Por lo que probablemente, la actividad de los compuestos producidos por esta especie esté restringida a modelos fúngicos.

Los metabolitos secundarios, como piezas clave en la interacción de especies de *Cladosporium* con diversas royas se ha propuesto en gran parte de los reportes de antagonismo, como en *C. gallicola*, contra *Endocronartium harknessii* (Tsuneda y Hiratsuka, 1979); *C. uredinicola* contra *P. violae* (Traquair *et al.*, 1984), *P. puta* (Barros *et al.*, 1999) y *Cronartium fusiforme* (Morgan-Jones y McKemy, 1990); *Cladosporium* sp. contra *Melampsora larici-populina* (Omar y Heather, 1979); *C. aecidiicola* contra *Melampsora medusae* (Sharma y Heather, 1980); *C. tenuissimum* contra *Cronartium flaccidum* y *Peridermium pini* (Moricca *et al.*, 2001; 2005) y *Cladosporium* sp. contra *P. horiana*

(García-Velasco *et al.*, 2005), en todos los casos con un impacto en la producción, maduración y germinación de las esporas. El porcentaje de inhibición de la germinación entre 60 y 90% en teliosporas de *P. horiana* con los extractos orgánicos y con las fracciones, coinciden entre sí, lo que apoya la idea de que efectivamente éstas fracciones obtenidas, son las responsables de la actividad de los extractos orgánicos de ambas especies, así como factores clave en las alteraciones morfológicas de *P. horiana*. De manera contrastante, al evaluar el desarrollo de *B. cinerea*, a las 24 h se muestra un buen efecto, para posteriormente a las 48h y 72 h esta inhibición decrecer. En este caso, esta inhibición podría deberse a las características genéticas de *B. cinerea* para contender con moléculas fungicidas (Raposo *et al.*, 1996; Leroux *et al.*, 2002; Kretschmer *et al.*, 2009; Vercesi *et al.*, 2014), también a la poca afinidad de éstas moléculas al sitio de acción, ya sea por ausencia de regiones particulares dentro de las estructuras químicas, o finalmente por mutaciones en las moléculas receptoras (Cui *et al.*, 2002; Leroux *et al.*, 2002), lo que hablaría también de poca especificidad hacia *B. cinera* y en consecuencia, de metabolitos con un espectro de actividad reducido.

Se conocen algunos blancos de acción de los metabolitos secundarios aislados de *Cladosporium* sp., como  $\beta$ -glucanasas constitutivas (Sakagami *et al.*, 1995), tirosina cinasas C (Wrigley *et al.*, 2001; Assante *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2009), lisil-tRNA-sintetasas (Hoepfner *et al.*, 2012) y moléculas que influyen en la vía de la  $\beta$ -catenina (Zurlo *et al.*, 2013; 2014), todas ellas con consecuencias en el desarrollo (Spreafico, 2004; Assante *et al.*, 2005; Moricca *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013). Los mecanismos de desarrollo hifal, así como los de diferenciación en estructuras reproductoras, se encuentran controlados por redes genéticas de activación diferentes (Ye, 2005; Boyce y Adrianpoulos, 2006, Shaw y Hoch, 2007). Las diferencias entre los resultados en la germinación de teliosporas de *P. horiana* y crecimiento micelial de *B. cinerea*, así como las encontradas en *Phytophthora* (Rojas-Martínez *et al.*, 2015) podrían ser explicadas con base en estas diferencias en los mecanismos de diferenciación y desarrollo. Probablemente los metabolitos secundarios de ambas especies de *Cladosporium* se encuentren adaptados a un sitio de reconocimiento particular dentro de la regulación de la germinación de teliosporas y producción de basidiosporas en royas, e igualmente es posible que el efecto sea momentáneo.

La utilización de forma directa o indirecta de metabolitos secundarios en el manejo de enfermedades, ha sido propuesta por varios autores, de manera indirecta la incorporación al

suelo de diversos residuos vegetales con actividad antimicrobiana y alelopática (Anaya, 2006), como de *Tagetes erecta* para el control de *Alternaria solani* (Gómez-Rodríguez y Zavaleta-Mejía, 2001; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2003); igualmente la incorporación de residuos de los géneros *Crotolaria*, *Tagetes* y *Ricinus*, para el control de nematodos (Kokalis-Burele y Rodríguez-Kábana, 2006), así como la utilización de diversos agentes en el control de enfermedades en postcosecha (Barkai-Golan, 2001) o de forma directa, utilizando extractos orgánicos vegetales para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en enfermedades en postcosecha de papaya (Baños-Guevara *et al.*, 2004).

En cambio, las enfermedades a nivel foliar, tienen una dinámica particular, por esta razón su manejo se torna en ocasiones bastante complejo (Fokkema, 1978; Blakeman y Fokkema, 1982). Debido a la complejidad en la utilización de organismos vivos en el control biológico clásico (Whipps y Lumsden, 2001; Fravel, 2005), la utilización de extractos orgánicos de *Cladosporium* (o bien filtrados del cultivo a gran escala), como un método de control biológico no tradicional, podría contribuir al manejo de la enfermedad dentro de un manejo integrado del cultivo (Gaytán-Acuña *et al.*, 2005). La asociación de especies saprófitas a patógenos foliares, ha sido reportada por varios autores (Omar y Heather, 1979; Pandey *et al.*, 1993; Chalfoun, 2010). Así, en el caso de la asociación física de ambas especies de *Cladosporium* con *P. horiana*, podría tener un impacto negativo en la formación de inoculo secundario (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1996; García-Velasco *et al.*, 2005; Bonde *et al.*, 2013), pero en cambio la utilización de extractos orgánicos o filtrados de *Cladosporium*, podría tener un impacto en el inoculo primario y en la tasa de infección, es decir alterando el inicio y desarrollo de la epidemia (Nutter, 2007). La exploración de ambos escenarios, tomando en cuenta la epidemiología de *P. horiana*, son factores a tomarse en consideración, de manera que el manejo sea efectivo. De igual manera, al ser un conjunto complejo de diferentes moléculas, el desarrollo de resistencia es difícil de surgir y podría comenzar la disminución en la utilización de grandes cantidades de fungicidas, ayudando a disminuir los efectos ambientales y a la salud que esto acarrea en la regiones de producción florícola mexicana (Huerta, 2000; Anaya, 2006). Pero no todo es tan sencillo, por eso el estudio en una siguiente fase en condiciones de invernadero se vuelve necesario, para poder así materializar la utilización de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, como en los casos de éxito en control biológico con cepas de *Cladosporium* sp. en cafeto y manzano (Köhl *et al.*, 2008; Chalfoun, 2010), surgiendo una alternativa en el manejo de la roya blanca del crisantemo.

## Conclusiones

Existe una producción diferencial de metabolitos secundarios de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, con respecto al medio de cultivo utilizado. Con base en los rendimientos y complejidad de los extractos, se sugiere el medio de Chen *et al.* (2009) como el óptimo para la producción de metabolitos secundarios. Es muy probable que la composición de los extractos orgánicos se encuentre basada en compuestos de origen policétido.

Los extractos orgánicos a partir del aislamiento DETSC1A de *C. cladosporioides*, presentan altos valores de inhibición de la germinación de teliosporas en *P. horiana*, comparada con el aislamiento DETSC1B, siendo ésta última la menos efectiva. Los extractos de *C. pseudocladosporioides* muestran una inhibición efectiva en la germinación de *P. horiana*.

Se obtuvieron 9 fracciones a partir de extractos orgánicos de AcOEt/MeOH 99:1 de ambas especies, las fracciones activas fueron la 4 y 8 de *C. cladosporioides* DETSC1A y las 4, 5, 6 de *C. pseudocladosporioides* (DETSC03), responsables de la actividad inhibitoria de la germinación de teliosporas de *P. horiana*.

Respecto a *B. cinerea*, aunque se presentan actividades excelentes a las 24h, su efectividad decrece con el tiempo, por lo cual parte la idea de una naturaleza fungistática más que fungicida, de los metabolitos de ambas especies de *Cladosporium*.

La utilización de extractos orgánicos o filtrados de medio de cultivo de ambas especies de *Cladosporium*, podría ser un método eficaz para la reducción de inóculo de *P. horiana*, teniendo un impacto en el manejo de la roya blanca del crisantemo.

## Referencias

- Anaya, A.L. 2006. Allelopathic organisms and molecular promising bioregulators for the control of plant diseases, weeds, and other pests. In: Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases. Inderjit y Mukerji, K.G.(eds.). Springer. 31-78 pp.
- Anke, H., Zahner, H. y Konig, W. A. 1978. Metabolic products of microorganisms. 170. On the antibiotic activity of cladosporin. *Archives of Microbiology*, 116: 253–257.
- Arnone, A., Assante, g., di Modugno, v., Merlini, l. y Nasini, g. 1988. perylenequinones from cucumber seedlings infected with *Cladosporium cucumerinum*. *Phytochemistry*, 27: 1675-1678.
- Arnone, A., assante, g., merlini, l. y nasini, g. 1989. Structure and stereochemistry of cladochrome d and e, novel perylenequinone pigments from *Cladosporium cladosporioides*. *Gazzeta Chimica Italiana*, 119: 557-559.
- Assante, G., Moricca, S., Ragazzi, A., Moretti, M., Sarachi, M. y Torraca, G. 2005. Integrazione di caratteri molecolari, micro-morfologici e chemiotassonomici per la caratterizzazione di *Cladosporium tenuissimum*, iperparassita di agenti di ruggine. *Micologia Italiana*, XXXIV: 31-39.
- Assante, G., Bava, A. y Nasini, G. 2006. Enhancement of a pentacyclic tyrosine kinase inhibitor production in *Cladosporium* cf. *cladosporioides* by Cladosporol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 718-721.
- Baerson, S. y Rimando, A. 2007. Polyketides: Biosynthesis, Biological Activity, and Genetic Engineering. ACS Symposium series. 96 p.
- Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest diseases in fruits and vegetables, development and control. Elsevier. 418 p.
- Baños-Guevara, P.E., Zavaleta-Mejía, E., Colinas-León, M., Luna-Romero, I., Gutiérrez-Alonso, J. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloesporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22: 198-205
- Barros, S.T., Oliveira, N., Bastos, S. y Maia, L. 1999. Hyperparasitism of *Cladosporium uredinicola* over *Puccinia puta* on the host *Ipomea fistulosa*. *Mycologist*, 13(1): 3-24.
- Bensh, K., Groenewald, J.Z., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Sumerell., B.A., Shin, H.D., Dugan, F.M., Schroers, H.J., Braun, U. y Crous. P.W. 2010. Species and

- ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Micology*, 67: 1-94.
- Bensh, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. y Crous, P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in mycology*, 72: 1-401.
- Blakeman, J.P. y Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20: 167-192.
- Bonde, M. R., Palmer, C. L., Luster, D. G., Nester, S. E., Revell, J. M. y Berner, D. K. 2013. Sporulation capacity and longevity of *Puccinia horiana* teliospores in infected chrysanthemum leaves. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2013-0823-01-RS.
- Boyce, K.J. y Adrianopoulos, A. 2006. Morphogenesis: Control of Cell Types and Shape. In: *Growth, Differentiation and sexuality*, 2nd edition. The Mycota I. Kües, U. y Fisher, R. (eds.). Springer. 3-20 pp.
- Boulliant, M.L., Pittet, J.L., Bernillon, J., Favre-Bondin, J. y Arpin, N. 1981. Mycosporins from *Ascochyta pisi*, *Cladosporium herbarum* and *Septoria nodorum*. *Phytochemistry*, 20: 2705-2707.
- Calvo, M., Wilson, R.A., Bok, J.W. y Keller, N. 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Reviews*, 66: 447-459.
- Chalfoun, S.M. 2010. Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective. *Ciência e Agrotecnologia*, 34: 1071-1085.
- Chen, J. Qiu, X., Wang, R., Duan, L., Chen, S., Luo, J. & Kong, L. 2009. Inhibition of human gastric carcinoma cell growth in vitro and in vivo by cladospore isolated from the paclitaxel-producing strain *Alternaria alternata* var. *monosporus*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 32:2072-2074.
- Cox, R. 2007. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Organic Biomolecular Chemistry*, 5: 2010-2026.
- Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L., Weeds, P. L., y Templeton, M. D. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology*, 36: 187-198.
- Dai, H.Q., Kang, Q.J., Li, G.H. y Shen, Y. 2006. Three New Polyketide Metabolites from the Endophytic Fungal Strain *Cladosporium tenuissimum* LR463 of *Maytenus hookeri*. *Helvetica Chimica Acta*, 89: 527-531.

- Demain, A.L. y Fang, A. 2000. The Natural Functions of Secondary Metabolites. In: Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology v. 69. Scheper, T. (Ed.). 2-39 pp.
- Dewick, P.M. 2009. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach 3rd Edition. Wiley. 539 p.
- Ding, L., Qin, S., Funchao, L., Chi, X., and Laatsch, H. 2008. Isolation, Antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* . associated with red alga *Porphyra yezoensis*. Current Microbiology 56: 229-235.
- Ehlich, K.C. 2007. Polyketide biosynthesis in fungi. ACS Symposium series, 995: 68-80.
- Ellswort, K., Clark, T., Gray, C. y Johnson, J. 2013. Isolation and bioassay screening of medicinal plant endophytes from eastern Canada. Canadian Journal of Microbiology, 59: 761-765.
- Finney, D. J. (1971). Probit Analysis: 3d Ed. Cambridge University Press.
- Fokkema, N.J. 1978. Fungal antagonisms in the phyllosphere. Annals of Applied Biology, 89: 115-142. Gabriel, C. y Cook, J. 1990. Biological control: the need for a ew scientific framework. Bioscience, 40: 204-206.
- Fravel, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 43: 337-359.
- Frisvad, J. 2015. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. Frontiers in Microbiology, 55: 1-7.
- Fuji, Y; Fukuda, A; Hamasaki, T; Ichimoto, I; Nakajima, H. Twelve-membered lactones produced by *Cladosporium tenuissimum* and the plant growth retardant activity of cladospolide B. Phytochemistry 1995, 40, 1443–1446.
- Fukushima, Y., Sakagami, Y. y Marumo, S. 1993. Beta-Glucan biosynthesis inhibitors isolated from fungi as hyphal malformation inducer. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 3: 1219-1222.
- García-Velasco, R., Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, R., Leyva-Mir, S., Simpson, J., Fuentes-Dávila, G. 2005. Antagonismo *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendrathera grandiflora* Tzvelev). Revista mexicana de Fitopatología, 23,1: 79-86.
- Gao, C., Nong, X., Qi, S., Luo, M., Zhang, S., y Xiong, H. 2010. A new nine-membered lactone from a marine fungus *Cladosporium* sp. F14. Chinese Chemical Letters, 21: 1355-1357.

- Gaytán-Acuña, A., Ochoa-Martínez, D., García-Velasco, R., Zavaleta-Mejía, E. y Mora-Aguilera, G. 2006. Producción y calidad comercial de flor de crisantemo. *Terra Latinoamericana*, 24: 541-548.
- Gerke, J. y Braus, G. 2014. Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. *Applied Microbiological Biotechnology*, 98: 8443-8455.
- Gesner, S., Cohen, N., Ilan, M., Yarden, O., Carmeli, S. 2005. Pandangolide 1a, a metabolite of the sponge-associated fungus *Cladosporium* sp., and the absolute stereochemistry of pandangolide 1 and iso-cladospolide B. *Journal of Natural Products*, 68:1350-1353.
- Gokul Raj, K., Manikandan, R., Arulvasu, C. y Pandi, M. 2015. Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular spectroscopy*, 138: 667-674.
- Gómez-Rodríguez, O. y Zavaleta-Mejía, E. 2001. La asociación de cultivos una estrategia más para el manejo de enfermedades, en particular con *Tagetes* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19: 94-99.
- Gómez-Rodríguez, O., Zavaleta-Mejía, E., González-Hernández, V.A., Livera-Muñoz, M. y Cárdenas-Soriano, E. 2003. Allelopathy and microclimatic modification of intercropping with margidold on tomato early blight disease development. *Field Crops Research*, 83: 27-34.
- Grove, J.F. y Pople, M. 1981. The insecticidal activity of some fungal dihydrosocoumarins. *Mycopathologia*, 76: 65-67.
- Hanson, J.R. 2003. *Natural Products: The Secondary Metabolites*. RSC Publishing. 148 p.
- Hanson, J.R. 2008. *The chemistry of fungi*. RSC Publishing. 221 p.
- Harborne, J.B. 1973. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer. 278 p.
- Herbert, R.B. 1981. *The biosynthesis of secondary metabolites*. Chapman and Hall. 171 p.
- Hoepfner, D. et al. 2012. Selective and specific inhibition of the *Plasmodium falciparum* Lysil-tRNA synthetase by the fungal secondary metabolite cladosporin. *Cell Host & Microbe* 11: 654-663.
- Höller, U., Gloer, J., Wicklow, D. 2002. Biological active polyketide metabolites from an undetermined fungicolous hyphomycete resembling *Cladosporium*. *Journal of Natural Products*, 65: 876-882.

- Hosoe, T., Okada, H., Itabashi, T., Nosawa, K., Okada, K., Campos-Takaki, G., Fukushima, K., Miyaji, M. y Kawai, K. 2000. A new pentarnolanostane derivative, cladosporide A, as a characteristic agent against *Aspergillus fumigatus*, isolated from *Cladosporium* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48: 1412-1426.
- Hosoe, T. Okamoto, S., Nosawa, K. y Kawai, K.C. 2001. New pentarnolanostane derivatives, cladosporide B-D, as characteristic antifungal agents against *Aspergillus fumigatus*, isolated from *Cladosporium* sp. *The journal of antibiotics*, 54: 747-750.
- Huerta, R. A. 2000. Diagnóstico agroecológico del cultivo de crisantemo en Texcoco, Méx. y propuestas de manejo para el control de plagas. Tesis de Maestría, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México.
- Iida, T., Kobayashi, E., Yoshida, M. y Sano, H. 1989. Calphostins, novel and specific inhibitors of protein kinase C, II. Chemical structures. *The journal of Antibiotics*, XLII: 1475-1481.
- Jacyno, J.M., Harwood, J., Cutler, H. y Kyoung-Lee, M. 1993. Isocladosporin, a biologically active isomer of cladosporin from *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Natural Products*, 56: 1397-1401.
- Jadulco, R., Proksh, P., Wray, V., Sudarsono, Berg, A., Gräfe, U. 2001. New Macrolides and Furan Carboxylic Acid Derivative from the Sponge-Derived Fungus *Cladosporium herbarum*. *Journal of Natural Products*, 64: 527-530.
- Jadulco, R., Brauers, G., Edrada, A., Ebel, R., Wray, V., Sudarsono y Krosh, P. 2002. New Metabolites from Sponge-Derived Fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. *Journal of Natural Products*, 65: 730-733.
- Jennings, D.H. 1995. *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge University Press. 640 p.
- Jones, E.B.G. y Jennings, D.H. 1965. The effect of cations on the growth of fungi. *New Phytologist*, 64: 86-100.
- Keller, N.P., Turner, G. y Bennett, J.W. 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 937-947.
- A) Kobayashi, E., Ando, K., Nakano, H., Iida, T., Ohno, H., Morimoto, M., Tamayoki, T. 1989. Calphostins (Ucn-1028), Novel And Specific Inhibitors Of Protein Kinase C I. Fermentation, Isolation, Physico-Chemical Properties And Biological Activities. *The Journal Of Antibiotics*, Xlii: 1470-1474.
- B) Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. Y Tamaoki, T. 1989. Calphostin C (Dcn-1028C), A Novel Microbial Compound, Is A Highly Potent And Specific Inhibitor

- Of Protein Kinase C. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 159: 548-553.
- Köhl, J., Molhoek, W., Groenenboom-de Haas, L., Goossen-van de Geijn, H., Eiben, U. 2008. *Cladosporium cladosporioides* H39: A new antagonist for biological control of apple scab. ENDURE International conference. Oral Presentations.
- Kokalis-Burelle, N. y Rodríguez-Kábana, R. 2006. Allelochemicals and biopesticides for management of plant-parasitic nematodes. In: *Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases*. Inderjit y Mukerji, K.G.(eds.). Springer. 15-29 pp.
- Kono, Y., Takeuchi, S., Kawarada, A., Daly, J., y Knoche, H. 1980. Studies on the host-specific pathotoxins produced by *Helminthosporium maydis* race T. *Agricultural Biological Chemistry*, 4:2613-2622.
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D. y Hahn, M. 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathology*, 5: e1000696.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., y Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest management science*, 58: 876-888.
- Lilly, V.G. y Barnett, H. 1951. *Physiology of the Fungi*. McGraw Hill. 464 p.
- Liu, J., Lei, M., & Hu, L. (2012). Thiamine hydrochloride (VB 1): an efficient promoter for the one-pot synthesis of benzo [4, 5] imidazo [1, 2-a] pyrimidine and [1, 2, 4] triazolo [1, 5-a] pyrimidine derivatives in water medium. *Green Chemistry*, 14(3), 840-846.
- Miller, J.D., Sun, M., Gilyan, A., Roy, J. y Rand, T.G. 2010. Inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs induced by low molecular weight compounds from fungi from the built environment. *Chemico-Biological Interactions*, 183: 113-124.
- Mohapatra, D., Maity, S., Rao, S., Yadav, S. y Sridar, B. 2013. An Efficient Formal Total Synthesis of Cladosporin. *European Journal of organic Chemistry*, 1: 2859-2863.
- Morgan-Jones, G., & McKemy, J. M. (1990). Studies in the genus *Cladosporium* sensu lato: I. Concerning *Cladosporium uredinicola*, occurring on telial columns of *Cronartium quercuum* and other hosts. *Mycotaxon*, 39, 185-202.
- Morgan, B., Dey, S., Johnson, S., Kozlowski, M. 2009. Design, Synthesis, and Investigation of Protein Kinase C Inhibitors: Total Syntheses of (+)-Calphostin D, (+)- Phleichrome,

- Cercosporin and New Photoactive Perylenequinones. *Journal of the American Chemical Society*, 131: 9413-9425.
- Mori, K. y Maemoto, S. 1987. Synthesis of (2E,4R,5S,11R)-(-)-Cladospolide A, a Phytotoxic Macrolide from *Cladosporium cladosporioides*. *Annals of Chemistry*, 1: 863-869.
- Moricca, S., Ragazzi, A., Mitchelson, K.R. y Assante, G. 2001. Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta. *Phytopathology*, 91: 457-468.
- Moricca, S., Ragazzi, A. y Assante, G. 2005. Biocontrol of rust fungi by *Cladosporium tenuissimum*. en: Pei, M.H. y McCracken, A.R. (eds.). *Rust diseases of Willow and poplar*. CAB International: 213-219.
- Nasini, G., Arnone, A., Assante, G., Bava, A., Moricca, S. and Ragazzi, A. 2004. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum* a hyperparasite of rust fungi. *Phytochemistry*: 2107-2111.
- Nelson, D. y Cox, M. 2008. *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 5th edition. W.H. Freeman. 1100 p.
- Nowrousian M., 2009. A novel polyketide biosynthesis gene cluster is involved in fruiting body morphogenesis in the filamentous fungi *Sordaria macrospora* and *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, 55: 185–198.
- Nutter, F. 2007. The role of plant disease epidemiology in developing successful integrate disease management programs. In: *General Concepts in Integrated Pest and Disease Management*. Ciancio, A. y Mukerji, K. G.(eds.). 45-79 pp.
- Omar, M. y Heather, W.A. 1979. Effect of saprophytic phylloplane fungi on germination and development of *Melampsora larici-populina*. *Transactions of the British Mycological Society*, 72(2): 225-231.
- Pandey, R.R., Arora, D.K. y Dubey, R.C. 1993. Antagonistic interactions between fungal pathogens and phylloplane fungi of guava. *Mycopathologia*, 124: 31-39.
- Paul, D. y Park, K.S. 2013. Identification of Volatiles Produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a Fungal Biocontrol Agent That Promotes Plant Growth. *Sensors*, 13: 13969-13977.
- Peng, J., Lin, T., Wang, W., Xin, Z., Zhu, T., Gu, Q., Li, D. 2013. Antiviral Alkaloids Produced by the Mangrove-Derived Fungus *Cladosporium* sp. PJX-41. *Journal of Natural Products*, 76: 1133-1140.

- Raposo, R., Colgan, R., Delcan, J., Melgarejo, P. 1995. Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 79(3): 294-296.
- Raposo, A., Delcan, J., Gomez, V. y Melgarejo, P. 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology*, 45: 497-505.
- Reddy, C., Suman, D. y Rao, N.N. 2013. Alkyne-Mediated Approach for Total Syntheses of Cladosporides A, B, C and iso-Cladosporide B. *European Journal of Organic Chemistry*, 1: 3786-3796.
- Rodríguez-Navarro, J.A., Zavaleta-Mejía, E. y Alatorre-Rojas, R. 1996. Epidemiología y manejo de la roya blanca (*Puccinia horiana* P. Henn.) del crisantemo (*Dendrathera grandiflora* Tzvelev). *Fitopatología*, 31(2): 122-132.
- Rohlf, M., Trienens, M., Fohgrub, U. y Kempken, F. 2009. Evolutionary and Ecological Interactions of mould and insects. en: Esser, K., Anke, T. y Weber, D. (eds.). *The mycota XV: Physiology and Genetics*. Springer. 133-152 pp.
- Rojas-Martínez, R.I., Torres, D.E., Ginetti, B. y Moricca, S. 2015. Antagonismo in vitro de *Cladosporium* sp. sobre dos especies de *Phytophthora*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33: S125.
- Sakagami, Y., Sano, A., Hara, O., Mikawa, T. and Marumo, S. 1995. Cladosporol, beta-1,3-glucan biosynthesis inhibitor, isolated from fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Tetrahedron letters*, 36,9: 1469-1472.
- Sassa, T. 1971. Cotylenins, leaf growth substances produced by a fungus. *Agricultural biological chemistry*, 35: 1415-1428.
- Sassa T. y Togashi, M. 1973. Isolation and structure of cotylenin E. *Agricultural biological chemistry*, 37: 1505-1506.
- Sassa, T., Togashi, M. and Kitagushi, T. 1975. The structures of Cotylenins A, B, C, D, and E. *Agricultural biological chemistry*, 39: 1735-1744.
- Schubert, K., Groenewald, J.Z., Braun, U., Dijksterhuis J., Starink, M., Hill, C.F., Zalar, P., de Hoog, G.S. y Crous, P. 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, (Capnodiales)) with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology*, 58: 105-156.
- Schuemann, J. y Hertweck, C. 2009. Biosynthesis of fungal polyketides. en: Esser, K., Anke, T. y Weber, D. (eds.). *The mycota XV: Physiology and Genetics*. Springer. 331-352 pp.

- Scott P. M., Van Walbeek W. y MacLean W. M. 1971. Cladosporin, a new fungal metabolite from *Cladosporium cladosporoides*. *Journal of Antibiotics*, 24: 747.
- Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Dalarmelina, Z., Salati, F. y Duarte, M.C.T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbial Biotechnology*, 22: 1185-1195.
- Sharma, J.K. y Heather, W.A. 1980. Effect of *Cladosporium aecidiicola* Thum. on the viability of urediniospores of *Melampsora medusae* Thum. in storage. *European Journal of Forestal Pathology*, 10: 360-364.
- Shaw, B.D. y Hoch, H.C. 2007. Ions Regulate Spore Attachment, Germination, and Fungal Growth. *Biology of the fungal cell*, 2nd edition. *The Mycota VIII*. Howard, R.J. y Gow, N.A.R. (Eds.). Springer. 219-236 pp.
- Silber, J., Ohlendorf, B., Labes, A., Wenzel-Storjohann, A., Näther, C. y Imhoff, J. 2014. Malettin E, an antibacterial and antifungal tropolone produced by a marine *Cladosporium* strain. *Frontiers in Marine Science*, 1: 1-6.
- Smith, C.J., Abbanat, D., Bernan, V.S., Maiese, W.M., Greenstein, M., Jompa, J., Tahir, A., Ireland, C.M. 2000. Novel Polyketide Metabolites from a Species of Marine Fungi. *Journal of Natural Products*, 63: 142-145.
- Soman de Medeiros, L., Murgu, M., de Souza, A. y Rodrigues-Fo, E. 2011. Antimicrobial Depsides Produced by *Cladosporium uredinicola*, an Endophytic Fungus Isolated from *Psidium guajava* Fruits. *Helvetica Chimica Acta*, 94: 1077-1084.
- Spreafico, D. 2004. Indagine su *Cladosporium tenuissimum* Cooke e cladosporoli nel biocontrollo di *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, agente della ruggine del fagiolo. Tesi di Laurea (Tesis de Licenciatura). Facoltà di Agraria, Università degli studi di Milano. 99 p.
- Springer, J., Cutler, H., Crumley, F., Cox, R., Davis, E. y Thean, J. 1981. Plant growth regulatory effects and stereochemistry of cladosporin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29: 853-855.
- Teichert, I. y Nowrousian, M. 2011. Evolution of Genes for Secondary Metabolism in Fungi. In: *Evolution of fungi and fungal-like organisms, The Mycota XIV*. Pöggeler, S. y Wöstemeyer, J. (Eds.). Springer-Verlag.
- Torres D.E., Guevara-Féfer P., Ocotero-Muñoz V., Venturini G., Toffolati S.L., Assante G., DallaValle S., Musso L., Zavaleta-Mejía E., Rojas-Martínez R.I. 2015. Efecto de los

- metabolitos secundarios de *Cladosporium* sp. sobre *Puccinia horiana* y *Botrytis cinerea*. Revista Mexicana de Fitopatología, 33: S125.
- Traquair, J., Meloche, R.B., Jarvis, W.R. y Baker, K.W. 1984. Hyperparasitism of *Puccinia violae* by *Cladosporium uredinicola*. Canadian Journal of Botany, 62: 181-184.
- Tsuneda, A. y Hiratsuka, Y. 1979. Mode of parasitism of a mycoparasite, *Cladosporium gallicola*, on western gall rust *Endocronartum harknessii*. Canadian Journal of Plant Pathology, 1:31-36.
- Vercesi, A., Toffolatti, S. L., Venturini, G., Campia, P., y Scagnelli, S. 2014. Characterization of *Botrytis cinerea* populations associated with treated and untreated cv. Moscato vineyards. Phytopathologia Mediterranea, 53: 108-123.
- Walker, G. y White, N. 2011. Introduction to fungal physiology. In: Fungi: Biology and Applications, 2nd Edition. Kavanagh, K. (ed.). John Wiley & Sons. 1-35.
- Wang, X., Radwan, M., Taráwneh, A., Gao, J., Wedge, D., Rosa, L., Cutler, H. y Cutler, S. 2013. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 4551-4555.
- Weiss, U., Merlini, L., Nasini, G. 1987. Naturally occurring perylenequinones. In: Herz, W., Grisebach H., Kirby, G.W., Tamm, C.H, (eds) Progress in the chemistry of organic natural products, vol 52. Springer. 1-71 pp.
- Whipps, J. M., y Lumsden, R. D. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential, 9-22.
- Williams. R., Henrikson, J., Hoover, A., Lee, A., Cichewicz, R. 2008. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. Organic and biomolecular Chemistry, 6: 1857-2020.
- Wrigley, S., Ainsworth, M., Kau, D., Martin, S., Bahl, S., Tang, J., Hardick, D., Rawlins, P., Sadheghi, R. y Moore, M. 2001. Novel Reduced Benzo [j]fluoranthren-3-ones from *Cladosporium* cf. *cladosporioides* with Cytokine Production and Tyrosine Kinase Inhibitory Properties. The Journal of Antibiotics, 54: 479-488.
- Wu, G.W., Sun, X., Yu, G., Wang, W., Zhu, T., Gu, Q., Li, D. 2014. Cladosins A-E, hybrid polyketides from a deep-sea-derived fungus, *Cladosporium sphaerospermum*. Journal of Natural Products, 77: 270-275.

- Ye, X.S. 2005. Cell Cycle Regulation in Morphogenesis and Development of Fungi. In: Handbook of Industrial Mycology. Zhiqiang, A. (Ed.). Marcel Dekker. 93-104 pp.
- Yoshihara, T., Shimanuki, T., Araki, T. y Sakamura, T. 1975. Phleiochrome a new phytotoxic compound produced by *Cladosporium phlei*. Agricultural and Biological Chemistry, 39: 1683-1684.
- Yu, G.H., Wu, G.W., Zhu, T.J., Gu, Q.Q. y Li, D. 2015. Cladosins F and G, two new hybrid polyketides from the deep-sea-derived *Cladosporium sphaerospermum* 2005-01-E3. Journal of Asian Natural Products Research, 17: 120-124.
- Zhang, H., Tomoda, H., Tabata, N., Miura, H., Namikoshi, M., Yamaguchi, Y., Masuma, R. y Omura, S. 2001. Cladospolide D, a New 12-Membered Macrolide Antibiotic Produced by *Cladosporium* sp. FT-0012. The journal of Antibiotics, 54: 635-641.
- Zheng, H., Zhao, C., Fang, B., Jing, P., Yang, J., Xie, X. y She, X. 2012. Asymmetric Total Synthesis of Cladosporin and Isocladosporin. The Journal of Organic Chemistry, 77: 5656-5663.
- Zhu, X., Huffman, J., Gerber, R., Lou, L., Xie, Y., Lin, T., Jorgenson, J., Maresch, A., Vogeler, C., Wang, Q., Shen, Y. y Du, L. 2008. Biosynthesis and genetic engineering of polyketides. Acta Botanica Yunnanica, 30: 249-278.
- Zurlo, D., Leone, C., Assante, G., Salzano, S., Renzo, G., Scalon, A., Foresta, C., Colantuoni, V. & Lupo, A. 2013. Cladosporol A stimulates G1- phase arrest of the cell cycle by up regulation of p21 expression in human colon carcinoma HT-29 cells. Molecular Carcinogenesis, 52:1-17.
- Zurlo, D., Assante, G., Moricca, S., Colantuoni, V. y Lupo, A. 2014. Cladosporol A, a new peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand, inhibits colorectal cancer cells proliferation through  $\beta$ -catenin/TCF pathway inactivation. Bichimica et Biophysica Acta, 1840: 2361-2372.

## CONCLUSIONES GENERALES

A partir de pústulas dañadas *P. horiana* parasitando *Crysanthemum × morifolium* cv. polaris, se aislaron e identificaron a *Cladosporium delicatulum*, *C. pseudocladosporioides* y *C. cladosporioides*. De la última especie, se asignaron dos aislamientos, determinados como DETSC1A y DETSC1B, basados en la morfología distintiva de las colonias en tres medios diferenciales.

Solamente *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* parasitaron significativamente la roya blanca, confirmando como los causales de la alteración de las pústulas observada en campo. Analizando su asociación antagonica a mayor detalle, se determinó que el crecimiento de ambas especies de *Cladosporium* se da en las células esporógenas y micelio intercelular, así como sobre las pústulas de *P. horiana*, sin existir una penetración directa de las teliosporas. A pesar de esto, existe un daño generalizado de las teliosporas y de la estructura de la pústula.

*Cladosporium cladosporioides*, *C. pseudocladosporioides* y *C. delicatulum*, son capaces de crecer en medio con laminarina como única fuente de carbono, lo que sugiere su capacidad de producción de  $\beta$ -1,3 glucanasas extracelulares. No así en medio con quitina coloidal. En el caso de *C. delicatulum*, su capacidad de producción de ésta enzima podría apoyar su papel como invasor secundario. La presencia de esta enzima podría ser un determinante nutricional en la asociación diferencial de las estructuras de *P. horiana*.

Extractos orgánicos de *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides* reducen la germinación de las teliosporas por arriba del 50%. Por otro lado, utilizando a *Botrytis cinerea* como modelo en el desarrollo micelial, los resultados sólo fueron efectivos a las 24h, decreciendo la actividad con el tiempo. Aunque es claro que los esfuerzos tienen que redoblar en esclarecer la implicación de los metabolitos secundarios con el parasitismo de este complejo de especies.

Se observó que el antagonismo mediado por *C. cladosporioides* y *C. pseudocladosporioides*, como un complejo de especies, altera la producción y reduce la viabilidad de las teliosporas, por lo que ambas especies podrían ser una nueva opción útil en el manejo de la roya blanca del crisantemo, mediante control biológico y como parte de un manejo integrado del cultivo.

# **ANEXOS**

Anexo I. Datos de los aislamientos de Bensch et al. (2010; 2012) utilizados en el análisis filogenético.

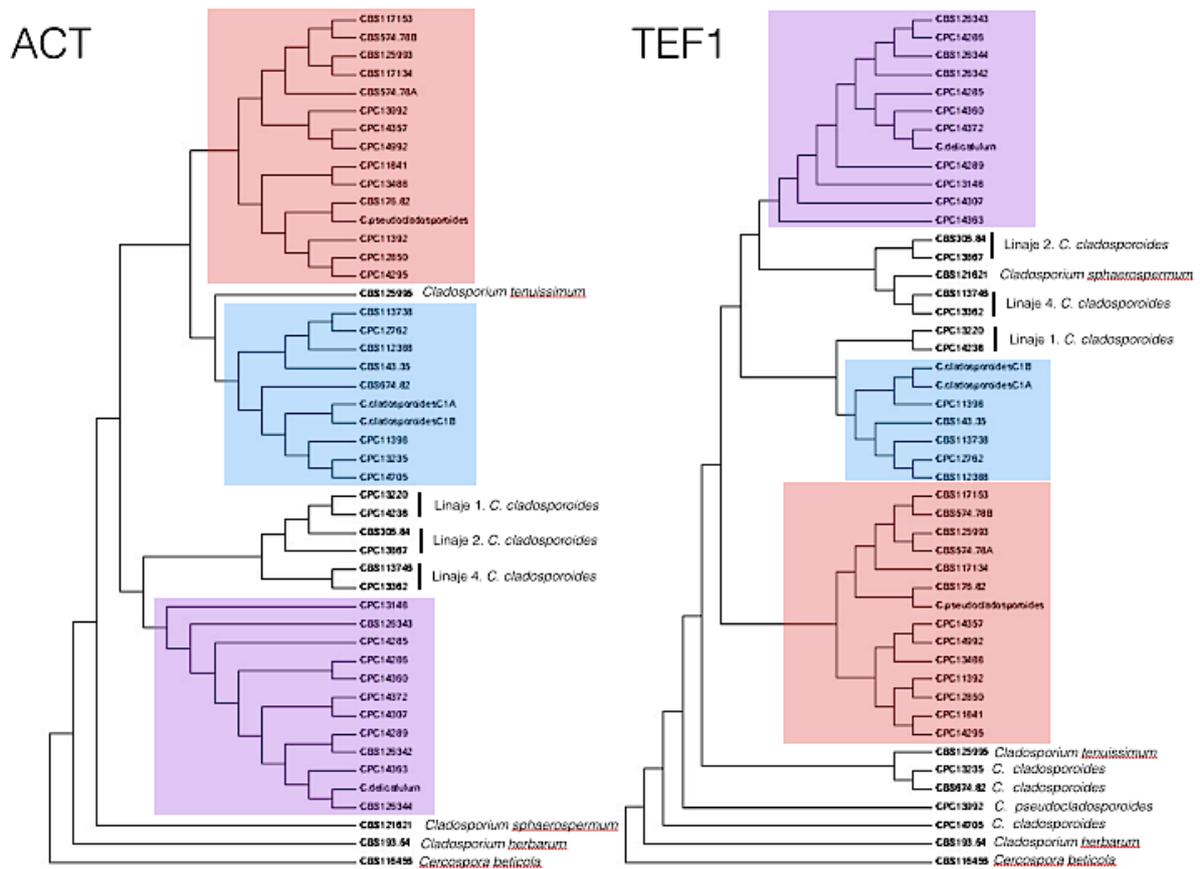
Especie	C/L	Accesión CBS	ITS	TEF1	ACT	Sustrato	País	Autor
<i>C. cladosporoides</i>	-	CBS11373 8	HM1 4800 4	HM1 48245	HM1 48491	Botón de uva	E.U.A.	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	-	CBS143.35	HM1 4801 1	HM1 48252	HM1 48498	<i>Pisum sativum</i>	Sudáfrica	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	-	CBS674.82 ; CBS 320.87	HM1 4801 4	HM1 48255	HM1 48501	Semillas de <i>Gossypium</i>	Israel	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	-	CBS11398	HM1 4802 4	HM1 48265	HM1 48511	<i>Phragmidium griseum</i> en <i>Rubus crataegifolius</i>	Corea del Sur	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	-	CPC12762	HM1 4803 0	HM1 48271	HM1 48517	Semillas de <i>Spinacia oleracea</i>	E.U.A.	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	-	CPC12852	HM1 4803 3	HM1 48274	HM1 48520	<i>Eucalyptus</i> sp.	Australia	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	-	CPC14705	HM1 4805 0	HM1 48291	HM1 48537	Chasmotecios de <i>Phyllactinia</i> sp. en <i>Fraxinus rhynchophylla</i>	Corea del Sur	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	Linaje 1	CPC13220	HM1 4805 4	HM1 48296	HM1 48541	Liquen en hojas de <i>Acer platanoides</i>	Alemania	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	Linaje 1	CPC14238	HM1 4805 5	HM1 48297	HM1 48542	Frutos de <i>Sambucus nigra</i>	Holanda	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	Linaje 2	CBS306.84	HM1 4805 7	HM1 48299	HM1 48544	Urediniosporas de <i>Puccinia allii</i>	Reino Unido	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	Linaje 2	CPC13867	HM1 4805 9	HM1 48301	HM1 48546	<i>Leptosphaeria</i> sp.	Sudáfrica	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	Linaje 4	CBS11374 6	HM1 4806 1	HM1 48303	HM1 48548	Frutos de Ceréza	E.U.A.	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	Linaje 4	CPC13362	HM1 4806 3	HM1 48305	HM1 48550	<i>Paeonia obovata</i>	Alemania	Bensch et al., 2010
<i>C. cladosporoides</i>	-	CBS11238 8	HM1 4800 3	HM1 48244	HM1 48490	Aire interior	Alemania	Bensch et al., 2010; Bensch et al., 2012
<i>C. delicatulum</i>	-	CBS 126342; CPC 14287	HM1 4807 9	HM1 48323	HM1 48568	Aire interior	Dinamar ca	Bensch et al., 2010
<i>C. delicatulum</i>	-	CBS 126343; CPC 14299	HM1 4808 0	HM1 48324	HM1 48569	Material del construcción	Dinamar ca	Bensch et al., 2010

<i>C. delicatulum</i>	-	CBS 126344; CPC 11389	HM1 4808 1	HM1 48325	HM1 48570	<i>Tilia cordata</i>	Alemania	Bensh et al., 2010; Bensh et al., 2012
<i>C. delicatulum</i>	-	CPC 13148	HM1 4808 2	HM1 48326	HM1 48571	<i>Puccinia bromina</i> ssp. <i>symphyti-bromarum</i>	Alemania	Bensh et al., 2010
<i>C. delicatulum</i>	-	CPC 14285	HM1 4808 3	HM1 48327	HM1 48572	Aire interior	Dinamar ca	Bensh et al., 2010
<i>C. delicatulum</i>	-	CPC 14286	HM1 4808 4	HM1 48328	HM1 48573	Aire interior	Dinamar ca	Bensh et al., 2010
<i>C. delicatulum</i>	-	CPC 14289	HM1 4808 5	HM1 48329	HM1 48574	Marco de la puerta	Dinamar ca	Bensh et al., 2010
<i>C. delicatulum</i>	-	CPC 14307	HM1 4808 6	HM1 48330	HM1 48575	Alga marina	Dinamar ca	Bensh et al., 2010
<i>C. delicatulum</i>	-	CPC 14360	HM1 4808 7	HM1 48331	HM1 48576	Aire interior	Dinamar ca	Bensh et al., 2010
<i>C. delicatulum</i>	-	CPC 14363	HM1 4808 8	HM1 48332	HM1 48577	Aire interior	Dinamar ca	Bensh et al., 2010
<i>C. delicatulum</i>	-	CPC 14372	HM1 4808 9	HM1 48333	HM1 48578	Polvo	Dinamar ca	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CBS11713 4	HM1 4815 6	HM1 48400	HM1 48645	Nube	-	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CBS11715 3	HM1 4815 7	HM1 48401	HM1 48646	Hojas de <i>Paemonia</i> sp.	Alemania	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CBS 125993*	HM1 4815 8	HM1 48402	HM1 48647	Aire exterior	Holanda	Bensh et al., 2010; Bensh et al., 2012
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CBS 176.82	HM1 4816 2	HM1 48406	HM1 48651	<i>Pteridium aquilinum</i>	Rumania	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CBS 574.78A	HM1 4816 3	HM1 48407	HM1 48652	<i>Melampsopodium betulae</i>	Rusia	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CBS 574.78B	HM1 4816 4	HM1 48408	HM1 48653	<i>Melampsopodium betulae</i>	Rusia	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CPC 11392	HM1 4816 6	HM1 48410	HM1 48655	<i>Chrysanthemum coronarium</i> var. <i>spatiosum</i>	Corea del Sur	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CPC 11841	HM1 4816 8	HM1 48412	HM1 48657	Hojas de <i>Phalaris</i> <i>aquatica</i>	Nueva Zelanda	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CPC 12850	HM1 4816 9	HM1 48413	HM1 48658	Madera podrida	E.U.A.	Bensh et al., 2010

<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CPC 13488	HM1 4817 1	HM1 48415	HM1 48660	<i>Vernonia</i> sp.	Brasil	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CPC 14295	HM1 4818 8	HM1 48432	HM1 48677	Suelo	Chile	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CPC 14357	HM1 4818 9	HM1 48433	HM1 48678	Comida, hoja de café	Uganda	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CPC 14992	HM1 4819 2	HM1 48436	HM1 48681	<i>Eucalyptus</i> sp.	Indonesia	Bensh et al., 2010
<i>C. pseudocladosporoides</i>	-	CPC 13992	HM1 4817 4	HM1 48418	HM1 48663	Árbol de café	E.U.A.	Bensh et al., 2010
<i>C. sphaerospermum</i>	1	CBS193.54	DQ7 8034 3	EU57 0261	EU57 0269	-	-	Bensh et al., 2012
<i>C. herbarum</i>	2	CBS 121621; CPC 12177	EF67 9363	EF67 9440	EF67 9516	-	-	Bensh et al., 2012
<i>C. tenuissimum</i>	3	CBS12599 5; CPC14253	HM1 4819 7	HM1 48442	HM1 48687	-	-	Bensh et al., 2012
<i>Cercospora beticola</i>	4	CBS11645 6	AY84 0527	AY84 0494	AY84 0458	-	-	Bensh et al., 2010; Bensh et al., 2012

\* C/L= Complejo/Linaje, <sup>1</sup>Complejo *C. sphaerospermum*, <sup>2</sup>Complejo *C. herbarum*, <sup>3</sup>Complejo *C. cladosporoides*, <sup>4</sup>Familia Mycospharellaceae.

**ANEXO II.** Árboles construidos por el método de Neighbour-Joining con el objetivo de verificar la estabilidad de los clados obtenidos en el análisis bayesiano.



En violeta se muestran los aislamientos pertenecientes a *C. delicatulum*, en azul los aislamientos pertenecientes a *C. cladosporioides* y en rojo aquellos pertenecientes a *C. pseudocladosporioides*. Se muestran sólo las ramas con valores de bootstrap por arriba del 60%. La diferencia de topología, utilizando el marcador ACT y el TEF1, se debe al nivel de resolución de cada marcador, aún así se mantienen de manera general las asociaciones, en cambio contruyendo un árbol utilizando ITS, el nivel de resolución es mucho menor, colapsando la gran mayoría de las ramas, es por esto que no se utilizó como marcador en la estabilidad de los clados de *Cladosporium*.

La topología de los árboles mediante N-J. coincide y apoya la encontrada mediante análisis bayesianos reportada en el capítulo II del presente trabajo.