

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS
FITOTÓXICOS SECRETADOS POR DIFERENTES AISLADOS DE
*MACROPHOMINA PHASEOLINA***

JAZMÍN VACEQUE ACOSTA

Orientador: **PROF.DRA. MARÍA EUGENIA FLORES GIUBI**

PROF. DR. JAVIER ENRIQUE BARÚA CHAMORRO

**Tesis presentada a la Dirección General de postgrado y Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de
Magister en Ciencias Químico Biológica - Mención Química de Productos Naturales**

SAN LORENZO-PARAGUAY

JUNIO-2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios en primer lugar por haberme dado fortaleza durante estos años.

A mi familia por el apoyo que siempre demostraron durante todos estos años por haber estado conmigo en cada paso y decisión que tomaba.

A mis amigas gracias por haberme aguantado estos años, por escucharse y soportarme cuando las cosas parecían no ir tan bien, por esas charlas y noches interminables.

Agradezco también a mis tutores la Prof. Dra. María Eugenia Flores y el Prof. Dr. Javier Barúa a quienes les enseñaron el amor a la ciencia, quienes me guiaron y acompañaron con paciencia durante estos años. A la profe Cristina (Kity) por haber tenido la paciencia y mejor predisposición para responder y enseñarme.

Al CONACYT por el financiamiento y el apoyo dado para la realización de este trabajo, el cual se enmarca dentro del proyecto “PINV-15-782: Producción diferencial de factores de patogenicidad del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* aislado de cultivos de importancia socio-económica del Paraguay”

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS FITOTÓXICOS SECRETADOS POR DIFERENTES AISLADOS DE *MACROPHOMINA PHASEOLINA*

Autor: Jazmín Vaceque Acosta

Orientador: PROF.DRA. MARÍA EUGENIA FLORES GIUBI
PROF. DR. JAVIER ENRIQUE BARÚA CHAMORRO

RESUMEN

Macrophomina phaseolina es un hongo fitopatógeno que puede afectar a un amplio espectro de hospedero, entre los que se encuentran especies, como la soja (*Glycine max* L.), maíz (*Zea mays* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). Es causante de la enfermedad conocida como pudrición carbonosa, este patógeno puede permanecer viable en el suelo por largos periodos de tiempo, ocasionando pérdidas económicas importantes en cultivos en la región y en Paraguay. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar de forma química-biológica los metabolitos secretados por aislados de *M. phaseolina*, los cuales fueron obtenidos de cultivos de soja (*Glycine max* L.), sésamo (*Sesamum indicum*) y estevia (*Stevia rebaudiana* Bert. Bertonii) cultivados en Paraguay. Se analizaron diez aislados nativos de *M. phaseolina*, obtenidos de distintos cultivos y zonas del país; en los ensayos de virulencia se demostraron que seis aislados de *Macrophomina phaseolina*, poseían la capacidad de colonizar o dañar el tejido, se obtuvo el perfil cromatográfico de cada extracto orgánico permitiendo así la obtención del perfil de las moléculas secretadas, se detectó la presencia de cuatro metabolitos en los extractos orgánicos de los diferentes aislados: acetilfomalactona, asperlina, isoasperlina y macrofominol., este último se detectó en todos los aislados, siendo mayor su producción por aislados de soja: FCQ39, FCQ51 y FCQ53. *M. phaseolina* FCQ60, FCQ61 y FCQ63 provenientes de cultivos de sésamo, secretaron cantidades significativas de asperlina, isoasperlina y acetilfomalactona. El aislado de *M. phaseolina* de estevia FCQ64 produjo cantidades detectables de macrofominol y asperlina. Este trabajo constituye la primera descripción de la variabilidad de la capacidad de secreción de moléculas con actividad fitotóxica por diferentes aislados nativos de *M. phaseolina* y la primera descripción de la capacidad de producción de cuatro metabolitos en aislados de *M. phaseolina* de Paraguay.

**BIOLOGICAL CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE
PHYTOTOXIC METABOLITES SECRETED BY DIFFERENT ISOLATES
OF *MACROPHOMINA PHASEOLINA***

Author: Jazmín Vaceque Acosta

Advisor: PROF. DRA. MARÍA EUGENIA FLORES GIUBI
PROF. DR. JAVIER ENRIQUE BARÚA CHAMORRO

SUMMARY

Macrophomina phaseolina is a phytopathogenic fungus infect a large number of plant species, including soybean (*Glycine max*), corn (*Zea mays*), bean (*Phaseolus vulgaris*). Is the causative agent of charcoal rot disease,,can remain viable in the soil for long periods of time, causing significant economic losses in crops in the region and the Paraguay. The aim of this work was the characterize chemical-biological the metabolites secreted byparaguayan isolates ofM. phaseolina from infected soybean (*Glycine max L.*), sesame (*Sesamum indicum*) and stevia (*Stevia rebaudina (Bert)*). The ten native isolates of M. phaseolina, obtained from different crops and areas of the country, were analyzed; in virulence tests, it was demonstrated that six isolates of Macrophomina phaseolina, had the ability to colonize or damage tissue,The chromatographic profile of each organic extract was obtained, thus allowing the profile of the secreted molecules to be obtained. The presence of four metabolites was detected in the organic extracts of the different isolates: acetylphomalactone, asperlin, isoasperlin and macrofominol. The latter was detected in all the isolates, their production being higher for soy isolates: FCQ39, FCQ51 and FCQ53. M. phaseolina FCQ60, FCQ61 and FCQ63 from sesame cultures, secreted significant amounts of asperlin, isoasperlin and acetylphomalactone. M. phaseolina estevia isolate FCQ64 produced detectable amounts of macrofominol and asperlin. This work constitutes the first description of the variability of the secretion capacity of molecules with phytotoxic activity by different native isolates of M. phaseolina and the first description of the production capacity of four metabolites in isolates of M. phaseolina from Paraguay.

INDICE

1- INTRODUCCIÓN	1
1.1- Características biológicas de <i>Macrophomina phaseolina</i>	1
1.1.1- Taxonomía y nomenclatura	1
1.1.2- Identificación morfológica de <i>Macrophomina phaseolina</i>	1
1.1.3- Hospederos de <i>Macrophomina phaseolina</i>	2
1.1.4 Ciclo de Infección de <i>Macrophomina phaseolina</i>	3
1.1.5 Síntomas de la enfermedad causada por <i>Macrophomina phaseolina</i>	5
1.1.5.1- Síntomas en plántulas	5
1.1.5.2- Síntomas en plantas adultas	6
1.2 Impacto económico de la enfermedad ocasionada por <i>Macrophomina phaseolina</i>	7
1.2.1- Impacto de <i>Macrophomina phaseolina</i> sobre cultivos de soja (<i>Glycine max</i>).....	8
1.2.2 - Impacto de <i>Macrophomina phaseolina</i> sobre cultivos de sésamo (<i>Sesamum indicum</i>)	9
1.2.3- Impacto de <i>Macrophomina phaseolina</i> sobre cultivos de estevia (<i>Stevia rebaudiana</i>)	10
1.3- Bases moleculares de la interacción de <i>M. phaseolina</i> con su huésped	11
1.3.1 Proteínas de <i>Macrophomina phaseolina</i>	12
1.3.2- Fitotoxinas de <i>Macrophomina phaseolina</i>	13
1.3.3. Información genómica de <i>Macrophomina phaseolina</i>	16
1.4- Características químico-biológicas de moléculas secretadas por <i>M. phaseolina</i>	17
2- MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1- Reactivos	19
2.2- Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Macrophomina phaseolina</i>	19
2.3- Evaluación de la virulencia de los aislados sobre hoja entera	20
2.4- Obtención del extracto orgánico	20
2.5- Análisis cromatográfico	21
2.5.1- Cromatografía en capa delgada (CCD).....	21
2.5.2- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	21
2.6- Cromatografía en columna abierta.....	22
2.7- Evaluación de la actividad fitotóxica.....	23
2.7.1- Ensayo en disco de hoja.....	23
2.7.2- Ensayo en plántulas de soja	23
2.8- Análisis estadístico	25

3- RESULTADOS	26
3.1- Evaluación de la virulencia de los aislados de <i>M. phaseolina</i> sobre hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	26
3.2- Metabolitos secretados por los aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i>	26
3.2.1- Rendimiento de extracción de metabolitos secretados	26
3.2.2- Perfil de los metabolitos secretados por los aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i>	28
3.2.2.1- Cromatografía en capa delgada (CCD)	28
3.2.2.2- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	29
3.3- Actividad fitotóxica de los metabolitos producidos por <i>Macrophomina phaseolina</i>	33
3.3.1- Evaluación de la actividad fitotóxica sobre discos de hojas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	33
3.3.2- Ensayo de inmersión en plántulas de soja (<i>Glycine max</i>)	35
3.3.3- Fuga de electrolitos	37
3.4- Purificación cromatográfica de los metabolitos secretados por <i>Macrophomina phaseolina</i>	38
3.5- Evaluación de la actividad fitotóxica de las fracciones cromatográficas	40
3.5.1- Ensayo en disco de hoja	40
3.6- Evaluación de la actividad fitotóxica e identificación de los compuestos purificados y fitotóxicos	41
3.6.1- Ensayo de fuga de electrolitos inducida compuestos purificados	43
3.7. Detección y cuantificación de metabolitos fitotóxicos en aislados de <i>M. phaseolina</i> del Paraguay	43
3.7.1- Detección de metabolitos fitotóxicos en aislados de <i>M. phaseolina</i> del Paraguay por Cromatografía en capa delgada	43
3.7.2- Cuantificación de metabolitos fitotóxicos en aislados de <i>M. phaseolina</i> del Paraguay por Cromatografía líquida de alta resolución	44
3.8 - Caracterización de los aislados de <i>M. phaseolina</i> de acuerdo al perfil de metabolitos detectados y cuantificados	48
4- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
5- CONCLUSIÓN	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	65

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Características biológicas de *Macrophomina phaseolina*

1.1.1- Taxonomía y nomenclatura

Macrophomina es un género monotípico compuesto por una especie, *phaseolina*, fue descrito por primera vez por Tassi en 1901, el cual denominó al estado picnidial del hongo como *Macrophoma phaseolina*. En 1923, Petrak estableció por primera vez el género *Macrophomina*, con la descripción de *M. philippinensis* de los especímenes secos de *Sesamum orientale* recogidos en Filipinas en 1921. Finalmente, Ashby en 1927 examinó críticamente y comparó los especímenes del hongo con otros géneros relacionados y estableció la especie binomial *Macrophomina phaseoli*. Más tarde, Goidanich (1947) cambió las *Macrophomina phaseoli* binomiales a *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid., ya que la muestra original de *Macrophomina* se recogió por Tassi en 1901 (Dhingra and Sinclair 1978; Kaur, Dhillon, Brar, Vallad, et al. 2012).

Macrophomina phaseolina es un hongo fitopatógeno necrotrófico, anamórfico, que pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae*, orden *Botryosphaerales*, clase *Dothideomycetes*, División *Ascomycota* (Crous et al. 2006; Slippers et al. 2013). Dentro de su ciclo de vida, presenta dos fases asexuales: la fase esclerocial, denominada *Rhizoctonia bataticola* que es saprofítica y la fase picnidial, *M. phaseolina* que es la patogénica (Chiesa et al. 2016; Kaur, Dhillon, Brar, Vallad, et al. 2012).

Presenta una amplia variabilidad morfológica, fisiológica, patogénica y genética que le ha permitido adaptarse a diferentes condiciones ambientales y tener una amplia distribución geográfica (Ashraf et al. 2015; Jana et al. 2005; Khan et al. 2017; Leyva-Mir et al. 2015; Muñoz Cabañas et al. 2005; Reyes-Franco et al. 2006).

1.1.2- Identificación morfológica de *Macrophomina phaseolina*

Aislados de *M. phaseolina* crecidos en cultivo *in vitro* presentan características de crecimiento variables; ya que se ha observado que determinadas condiciones

promueven diferencias en las colonias, así como en la producción de picnidios y microsclerocios (Cervantes-García, D.; Padilla-Ramírez, JS.; Simpson, J.; Mayek-Pérez 2003; Mayek-Pérez et al. 2002; Mayek Pérez, López Castañeda, and Acosta Gallegos 1997; Mihail and Taylor 1995; Radwan et al. 2014).

Las colonias de *Macrophomina phaseolina* varían su color con el transcurso del tiempo; pudiendo observarse en las placas de cultivo colonias que van de gris o marrón a negro (**Fig1.1**). También se puede observar la producción de gran cantidad de micelio aéreo con esclerocios incrustados o absorbidos en el agar. Las hifas son septadas de color negro y también presentan numerosos esclerocios que son de color marrón oscuro o negro que se pueden observar al reverso de la placa. Los microsclerocios de *M. phaseolina* son de color negro y de tamaño variable dependiendo de las condiciones y de los medios utilizados (Dhingra and Sinclair 1978; Kaur, Dhillon, Brar, Vallad, et al. 2012; Short, Wyllie, and Ammon 1978).

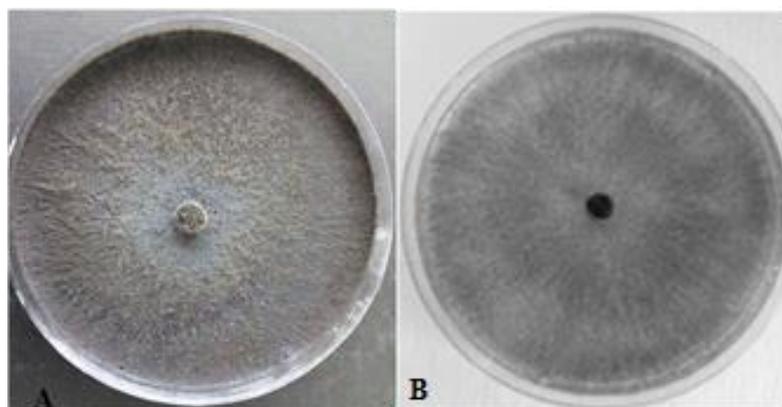


Figura 1.1: Aislados de *Macrophomina phaseolina* en medio de cultivo PDA. (A) Aislado obtenido de cultivo de vid con seis días de crecimiento (Abed-Ashtiani, Narmani, and Arzanlou 2018). (B) Aislado obtenido de cultivos de arándanos con 10 días de crecimiento (Popović et al. 2017).

1.1.3- Hospederos de *Macrophomina phaseolina*

Este patógeno presenta un amplio espectro de hospederos, entre los cuales se encuentra una amplia variedad de cultivos de los que se pueden citar al maíz (*Zea mays L.*) (Ashraf et al. 2015; Ramos et al. 2016), el sorgo (*Sorghum bicolor*

L.)(Williams-Alanís et al. 2009), el poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) (Méndez-Aguilar, Reyes-Valdés, and Mayek-Pérez 2013; Yesil and Bastas 2016), el yute (*Corchorus capsularis* L.)(Biswas et al. 2013),el algodón (*Gossypium hirsutum* L.)(Baird, Watson, and Scruggs 2003), la soja (*Glycinemax* L.) (Ammon, Wyllie, and Brown 1974, 1975; Cabrera et al. 2002; Chiesa et al. 2016; Coser et al. 2017; Leyva-Mir et al. 2015; Pearson, C. A.S;Schwenk 1984),el sésamo (*Sesamum indicum* L.)(Martínez-Hilders and Laurentin 2012)e inclusive ha sido descrito en cultivos de estevia (*Stevia Rebaudiana Bertoni*),de Carolina del Norte .(Koehler and Shew 2017)

Publicaciones recientes han evidenciado una mayor incidencia del hongo en diversos cultivos alrededor del mundo, sacando a la luz el gran impacto que tiene la enfermedad ocasionada por *M. phaseolina*(Baggio, Cordova, and Peres 2019; Y. M. A. Y. Bandara et al. 2018; Burkhardt et al. 2019; Cohen, Elkabetz, and Edelstein 2016; Efraín et al. 2019; Gomez et al. 2020; Huda-Shakirah et al. 2019; Khan et al. 2017; Koike et al. 2016; Negreiros et al. 2019; Nouri et al. 2020; Sexton, Hughes, and Wise 2016; Türkkán et al. 2019; Wagan et al. 2019; Yesil and Bastas 2016; Živanov et al. 2019), este hecho se ha visto beneficiado por factores que favorecen su desarrollo de manera principal por condiciones del medio ambiente, como las elevadas temperaturas y la baja humedad del suelo(Islam et al. 2012; Radwan et al. 2014).

1.1.4 Ciclo de Infección de *Macrophomina phaseolina*

Existe un gran variedad de factores se encuentran involucrados en el desarrollo de la enfermedad o en el proceso de infección de *M. phaseolina*, facilitando el ingreso, la invasión y la colonización del huésped (Ivancovich, Flores, and Lavilla 2013; Prell and Day 2001a).

El ciclo de infección de *M. phaseolina* implica una serie de etapas (**Fig1.2**); se requiere una fuente de infección, luego la germinación de estructuras vegetativas de supervivencia denominadas microesclerocios, desarrollo del apresorio que se trata de una modificación de una hifa que facilita la adhesión y penetración del hongo, luego

el crecimiento de las hifas en el tejido del huésped, obstrucción mecánica, marchitamiento y muerte de las plantas infectadas (Ivancovich, Flores, and Lavilla 2013).

Este patógeno presenta la característica que puede permanecer viable por largos periodos de tiempo en el suelo o en residuos de cultivos, mediante los microesclerocios, que sirven como principal fuente de inóculo (**Fig. 1.2.A**) y en contacto con las raíces de las plantas infectan el sistema vascular de las mismas, causando los signos de la enfermedad conocida como pudrición carbonosa (Lago 2009). Los microesclerocios también pueden ser transmitidos por las semillas, ya que están adaptados para sobrevivir bajo condiciones adversas (Baird, Watson, and Scruggs 2003).

Una vez germinados los microesclerocios ocurre la penetración de la pared celular (Mayek-Pérez et al. 2002) y luego se produce la colonización del tejido, el micelio coloniza el tejido vascular creciendo a través de la corteza y penetrando los vasos del xilema, una vez dentro de los tejidos vasculares se propaga hacia la raíz, donde obstruye los vasos, lo que al final provoca la deshidratación y desnutrición de la planta, ocasionando marchitez y muerte (Kaur, Dhillon, Brar, Vallad, et al. 2012; Mayek-Pérez et al. 2002).

La planta infectada presenta numerosos microesclerocios en el tallo y en la raíz, los cuales constituyen nuevas fuentes de inóculo y de esta manera continua el ciclo infectivo en nuevas plantas (Lira-Méndez et al. 2012; Mayek-Pérez et al. 2002; Mayek Pérez, López Castañeda, and Acosta Gallegos 1997).

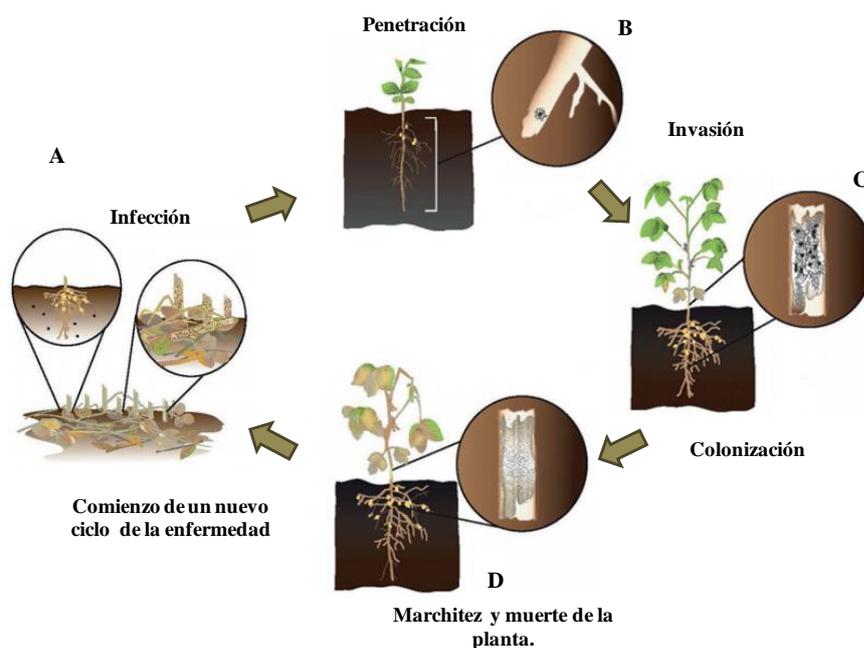


Figura 1.2. Ciclo de la infección de *Macrophomina phaseolina*. A. Fuente de infección primaria: microesclerocios en residuos de cultivos, semillas B. Infección de la raíz en contacto con los microesclerocios; germinación de microesclerocios, C. Crecimiento de las hifas, interrupción del sistema vascular, D. Abundantes microesclerocios en el tallo y la raíz que dan una apariencia similar al carbón, marchitez y muerte de la planta. Los residuos infectados se convertirán en una fuente potencial de inóculo para el comienzo de un nuevo ciclo (Romero, Luna et al. 2017).

1.1.5 Síntomas de la enfermedad causada por *Macrophomina phaseolina*

1.1.5.1- Síntomas en plántulas

Las plántulas emergentes infectadas pueden presentar síntomas como manchas circulares, de color marrón rojizo, que pueden oscurecerse con el transcurso del tiempo, tornándose de marrón oscuro a negro (Ivancovich, Flores, and Lavilla 2013) (Gupta, Sharma, and Ramteke 2012).

En las condiciones de altas temperaturas, por encima de 35°C, durante periodos largos y sequías persistentes las plántulas pueden ser infectadas y pueden aparecer lesiones oscuras en epicótilos e hipocótilos de las plántulas, las que se observan como manchas marrones oscuras (**Fig. 1.3**). A veces, el borde de los cotiledones se vuelve de marrón a negro y se pierden en una etapa temprana (Gupta, Sharma, and Ramteke 2012; Méndez-Aguilar, Reyes-Valdés, and Mayek-Pérez 2013).



Figura 1.3: Daño causado en plántulas de frijol por *M. phaseolina*. (A) cotiledón; (B) hipocótilo y epicótilo; (C) muerte de la plántula. (Méndez-Aguilar, Reyes-Valdés, and Mayek-Pérez 2013).

1.1.5.2-Síntomas en plantas adultas

En las plantas adultas se pueden observar lesiones en las raíces, tallos, vainas y semillas, además de la presencia de micelio oscuro y microesclerocios negros que se deben al patógeno (**Fig. 1.4**).

Debido a la formación de microesclerocios en el tejido vascular y en la médula se observan lesiones oscuras longitudinales en el tallo, dando un aspecto negro-grisáceo y la planta se defolia y marchita (**Fig. 1.4 C**). Con respecto a las hojas, éstas permanecen más pequeñas de lo normal y, posteriormente, se vuelven amarillas antes de marchitarse. El hongo penetra en las vainas y los granos induciendo los diversos síntomas, donde se pueden observar puntos negros difusos o manchas en las semillas (**Fig. 1.4 A,B**) (Cabrera et al. 2002; Gupta, Sharma, and Ramteke 2012).

Los cultivos infectados en el campo exhiben amarillamiento prematuro como manchas dispersas, en ocasiones, las hojas muertas permanecen unidas al peciolo durante varios días después de la muerte (**Fig. 1.4 D**) (Gupta, Sharma, and Ramteke 2012).



Figura 1.4. Síntomas de la infección por *M. phaseolina*. (A) Semillas de soja; (B) vainas de soja infectadas por el hongo *Macrophomina phaseolina*. (C) Microesclerocios en los tejidos vasculares y en la médula; (D) Síntomas de *M. phaseolina* en soja (Bachi 2016; Bellaloui et al. 2014).

1.2 Impacto económico de la enfermedad ocasionada por *Macrophomina phaseolina*

M. phaseolina presenta una amplia distribución a nivel mundial, la enfermedad causada por este patógeno puede resultar en grandes pérdidas económicas en los distintos países, ya que afecta la calidad y la producción de diferentes cultivos como el maíz (Ashraf et al. 2015), soja (Vibha 2016), sésamo (Bashir 2017); también se ha informado la pudrición de la corona y la raíz de la fresa en regiones de como Israel, Estados Unidos de América, España y Francia (Lodha and Mawar 2020) y en cultivos de soja en Argentina en donde se reportaron que fueron afectadas distintas áreas de producción (Reznikov et al. 2013).

La información de los procesos involucrados en la interacción de este fitopatógeno con sus hospederos en las condiciones ambientales de nuestro país es insuficiente, teniendo en cuenta, que las condiciones favorables descritas para este patógeno son las elevadas temperaturas y la baja humedad, se ha reportado el crecimiento óptimo de *Macrophomina* entre 30-35 °C; en Paraguay su propagación se ha visto favorecida ocasionando grandes pérdidas en cultivos de relevancia económica, como la soja, sésamo (Ayala R and Orrego F 2006; Ramiez Ferreira and Orrego Fuente 2008; Reznikov and Gonzalez 2014).

1.2.1- Impacto de *Macrophomina phaseolina* sobre cultivos de soja (*Glycine max*)

En el mundo, se estima un área cultivada de soja de 124.921.956 millones de hectáreas con una producción de 348.712.311 millones de toneladas con un rendimiento de 27.914 (Hg/ha) (FAO2018).

Paraguay es uno de los principales productores de soja del mundo; ubicándose, según el último informe de la Asociación Americana de Soja (ASA), en la sexta posición con 9.9 millones de toneladas y en el cuarto como exportador de soja (SOYSTATS 2019),(**Tabla 1.1**).En Paraguay se ha reportado para la zafra de soja del 2018, un área cultivada de 3.565.00 hectáreas, con una producción de 8.520.350 toneladas y un rendimiento de 2.390 Kg/ha (DCEA-MAG).

El cultivo de soja se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país, siendo mayormente cultivado en los Departamentos de Itapúa, Alto Paraná, Canindeyú, y San Pedro.

Tabla1.1: Principales países productores y exportadores de soja en la zafra 2019/20.

PRINCIPALES PRODUCTORES MUNDIALES DE SOJA	
Cifras en Millones de Toneladas – Fuente: USDA Feb/2020 – Zafra 2019/20	
PAIS	2019/20
BRASIL	125.00
USA	96.84
ARGENTINA	53.00
CHINA	18.10
PARAGUAY	9.90
PRINCIPALES EXPORTADORES MUNDIALES DE SOJA	
PAIS	2019/20
BRASIL	77.00
USA	49.67
ARGENTINA	8.20
PARAGUAY	5.90

Los cultivos de soja se encuentran constantemente expuestos a una variedad de factores; bióticos es decir, infección por patógenos como *Phakopsora pachyrhizi*

(Roya de la soja); *Pythium spp*; *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp*, *Colletotrichum spp* (*Damping off*); *Microsphaera diffusa* (Oídio); *Septoria glycines* (Mancha marrón o septoria); *Cercospora kikuchi* (Tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla); *Macrophomina phaseolina* (Putridión carbonosa de la raíz); *Aphididae* (Virus del mosaico común de la soja (SMV)) y factores abióticos como las altas o bajas temperaturas, deficiencia de agua y/o la salinidad que afectan negativamente su crecimiento y rendimiento (Mengistu et al. 2018).

Se ha informado el impacto y la prevalencia de la podredumbre carbonosa en los E.E.U.U., donde se estima una pérdida de rendimiento de la soja de hasta el 50% (A. Y. Bandara et al. 2020), en Paraguay se ha informado para cultivos de soja una prevalencia del 100 % de este patógeno, los cuales fueron evaluados en 48 localidades desde abril hasta agosto de 2008 (Rezniko et al. 2018), también se ha informado una reducción en el rendimiento del cultivo desde los periodos 2001, 2005 y 2006 (Wrather et al. 2010).

1.2.2 - Impacto de *Macrophomina phaseolina* sobre cultivos de sésamo (*Sesamum indicum*)

En el mundo, el sésamo se cultiva en un área de 11.743.382 millones de hectáreas, con una producción de 6.015.573 millones de toneladas y con un rendimiento de 5.123 hg/ha (FAO2018). En Sudamérica se cultiva alrededor de 145.586 hectáreas con una producción de 77.424 toneladas y con un rendimiento de 5.318 hg/ha (FAO 2018).

En Paraguay, el cultivo de sésamo tiene un gran impacto social ya que involucra a muchas familias de pequeños productores, debido a la alta demanda que presenta, por sus propiedades y características, en nuestro país se ha registrado una gran expansión de este cultivo; en Paraguay el área cultivada de sésamo abarcaba 30.000 hectáreas en 2018, con una producción de 18.002 toneladas y con un rendimiento de 6.001 hg/ha (FAO2018).

La enfermedad de pudrición carbonosa causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid, es muy grave y destructiva, en E.E.U.U. se han reportado que causa pérdidas de rendimiento que oscila entre 5 a 100% (Bedawy and Moharam 2019; Meena, Indiragandhi, and Ushakumari 2018). En Paraguay se han informado de trabajos de control químico, en condiciones de campo, de la enfermedad Pudrición carbonosa del tallo en sésamo, causada por el hongo *M. phaseolina*(Ayala R and Orrego F 2006), así como el efecto de aislados nativos de *Trichoderma* spp. en la incidencia de *M. phaseolina* (Tassi) Goid en variedades de Escoba Blanca de sésamo (*Sesamum indicum* L.) en condiciones experimentales ;(Garcete Gómez and Orrego Fuentes 2011).

1.2.3- Impacto de *Macrophomina phaseolina* sobre cultivos de estevia(*Stevia rebaudiana*)

Dentro de los cultivos también se encuentra la *Stevia rebaudiana* siendo Paraguay el origen biológico del cultivo y es el segundo productor del mismo; según estimaciones de la Dirección Nacional de Censos y Estadísticas del Ministerio de Agricultura, se para la zafra 2018/2019 que el área cultivada ocupa 3.100 hectáreas, con una producción 3.720 toneladas y un rendimiento de 1.200 Kg/ha (DCEA-MAG) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Producción de Estevia obtenida en la zafra 2017/2018.Fuente: Dirección de Censo y Estadísticas Agropecuarias/MAG.

REGIÓN ORIENTAL	SUPERFICIE SEMBRADA	PRODUCCIÓN	RENDIMIENTO
	Ha.	Ton.	Kg/Ha.
San Pedro	1.630	2.585	1.586
Itapúa	246	500	2.033
Alto Paraná	238	417	1.752
Canindeyú	97	158	1.629
Caaguazú	62	122	1.968
Otros	97	129	9.597
Total	2.370	3.911	1.650

1.3- Bases moleculares de la interacción de *M. phaseolina* con su huésped

Se debe considerar que las plantas se encuentran en contacto con una gran variedad de organismos, los cuales pueden resultar beneficiosos o no, para su desarrollo, aunque en muchos casos estos procesos no son percibidos ya que las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa que les permite reducir o parar la infección (Jones, Canada, and Wang 1998; Ordeñana 1998).

En general, dependiendo de los requerimientos del patógeno en la interacción con su huésped, pueden clasificarse en biótrofos o necrotróficos; en el caso de los biotróficos son organismos que requieren nutrientes de huéspedes vivos por lo cual invaden y se adaptan al tejido huésped para luego reproducirse; sin embargo, los necrotróficos son patógenos que ocasionan la muerte del huésped y obtienen los nutrientes a partir del tejido muerto, que resulta beneficioso para su crecimiento como para su patogénesis; en este último grupo se puede incluir a la mayoría de los hongos, entre ellos, *M. phaseolina*, y bacterias fitopatógenas (Collinge et al. 2001; Sarkar et al. 2014).

En el caso de los hongos, éstos han desarrollado estrategias para invadir y colonizar el tejido de las plantas, sobre todo, los fitopatógenos, producen y secretan una gran cantidad y variedad de enzimas que posibilitan el ingreso o la propagación, reguladores de crecimiento y/o polisacáridos, que están involucrados en el desarrollo de la enfermedad (Agrios 2004); además de las enzimas hidrolíticas, se ha visto que los patógenos producen metabolitos secundarios conocidos como fitotoxinas; para los cuales se han descrito determinadas actividades o mecanismos que pueda ejercer en contacto con el huésped, como supresión de la división celular, activación o inhibición de la respiración, cambios bioquímicos como la interrupción de la síntesis o transporte de compuestos, daño de membranas celulares e incluso algunos mimetizan o presentan similitud con algunas fitohormonas (Berestetskiy 2008; Otani, Kohmoto, and Kodama 1995).

La especificidad de la interacción depende tanto de las características de la planta como del patógeno, ya que un patógeno puede presentar una patogenicidad variable dependiendo del huésped (Sarkar et al. 2014).

Macrophomina phaseolina emplea diversas herramientas para el desarrollo de la enfermedad entre las cuales se describen dos mecanismos que emplea para infectar el sistema vascular de las plantas, la penetración mecánica o física y la secreción de enzimas y toxinas, que degradan o debilitan el tejido local de la planta, permitiendo que el hongo ingrese a través de la zona necrótica creada por la toxina (Bellaloui et al. 2014; Romero, Luna et al. 2017).

Este patógeno puede afectar a las plantas en casi todas las etapas de desarrollo, observándose clorosis, defoliación prematura, maduración temprana, marchitez o aparición de lesiones oscuras en el cuello de la planta, las cuales pueden cubrir por completo al tallo y llegar a destruir los haces vasculares causando su muerte (Cabrera et al. 2002) y ocasionar la pudrición carbonosa (Ashraf et al. 2015; Kaur, Dhillon, Brar, Vallad, et al. 2012).

Macrophomina phaseolina produce enzimas que presentan actividad hidrolítica, genes de virulencia implicados en procesos de adhesión, biosintetiza micotoxinas, posee genes implicados con procesos de desintoxicación celular y codificadores de transportadores, todos relacionados al proceso de infección (Cordero-Roa and Rosas-Quijano 2013; Islam et al. 2012; Martínez-Villarreal et al. 2016).

1.3.1 Proteínas de *Macrophomina phaseolina*

La mayoría de los hongos patógenos secretan gran cantidad de proteínas, que presentan actividad enzimática, las cuales colaboran en la colonización ya que degradan componentes estructurales que forman parte de la pared celular de la planta (Javaid and Saddique 2012).

La actividad celulolítica de *M. phaseolina* es significativamente mayor que en otras especies de hongos (e.g., *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*), lo cual refleja la

potencia patogénica de este hongo para infectar una amplia gama de hospederos; este patógeno posee alrededor de 25 endoglucanasas(GH5, GH12, GH45, GH61), 7 exocelobio hidrolasas(GH6, GH7, GH81) y 28 β -glucosidasas para la hidrólisis de la celulosa(GH1,GH3, GH17)(Islam et al. 2012).

Se han reportado para *M. phaseolina* enzimas con actividad hidrolíticas, los cuales desempeñan un papel en el desarrollo de la enfermedad, ya que pueden degradar la celulosa, hemicelulosa componentes de la pared celular (Kaur, Dhillon, Brar, and Chauhan 2012),también en otros estudios se ha informado a producción de enzimas tales como lipasa, amilasa y proteasa (Ramos et al. 2016).

1.3.2- Fitotoxinas de *Macrophomina phaseolina*

Las fitotoxinas son metabolitos secundarios capaces de ocasionar alteraciones en el funcionamiento de las células vegetales o incluso causar la muerte del organismo a determinadas concentraciones. Su efecto es observable en los tejidos mediante la aparición de síntomas como clorosis, necrosis, supresión del crecimiento y la marchitez (Berestetskiy 2008; Pusztahelyi, Holb, and Pócsi 2015; Scharf, Heinekamp, and Brakhage 2014).

En general, las fitotoxinas pueden clasificarse en función a su toxicidad en no selectivas o no específicas (NHS) y también en selectivas o específicas del huésped (HS); las selectivas o específicas son activas únicamente frente a aquellas plantas susceptibles que se encuentran en el rango de huésped del patógeno que la producen. Las no selectivas o específicas poseen un rango más amplio de acción en cuanto al huésped del patógeno que las produce(Otani, Kohmoto, and Kodama 1995; Prell and Day 2001b; Scheffer and Briggs 1981).

La biosíntesis de las fitotoxinas se encuentra influenciada por diferentes factores como la temperatura, la humedad, la presencia de nutrientes que son condiciones ambientales que afectan al patógeno como al huésped, provocando variaciones en la producción de los metabolitos secundarios. También existen factores que pueden influenciar la producción de metabolitos *in vitro* como la composición del medio de

cultivo, el tiempo de cultivo o las condiciones de crecimiento del cultivo (Berestetskiy 2008; Fountain et al. 2014; Hayashi et al. 1988).

Se han identificado y descrito varias fitotoxinas de *M.phaseolina*; las cuales pueden desempeñar un papel en la supresión o en la activación de las respuestas de las plantas (Islam et al. 2012; Kaur, Dhillon, Brar, Vallad, et al. 2012). Entre las que se han descrito como fitotoxinas se encuentran la botriodiplodina(4) (Ramezani et al. 2007) y la faseolinona(7) (Dipanwita Bhattacharya et al. 1994; Dhar, Siddiqui, and Ali 1982). También se han aislado e identificado otros metabolitos como el ácido faseolínico(5) (Mahato et al. 1987), el macrofominol(6)(Trigos et al. 1995), asperlina(1), isoasperlina(2), acetilfomalactona(3), fomenona(8)(D. Bhattacharya, Siddiqui, and Ali 1992) (Fig. 1.5).

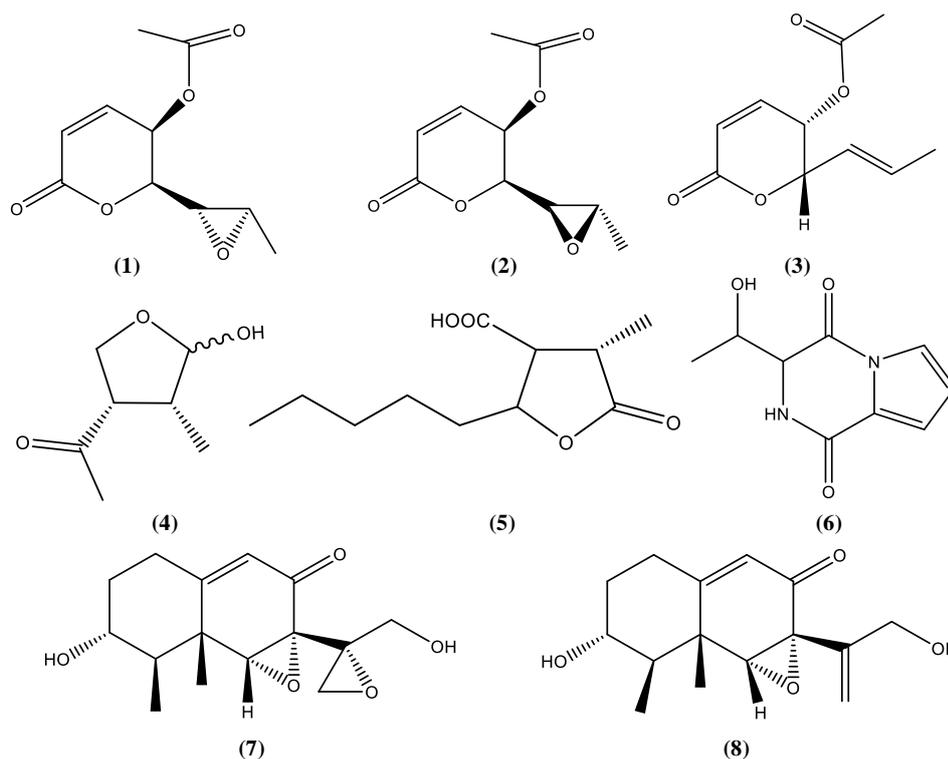


Figura 1.5: Estructura de los metabolitos secretados por *Macrophomina phaseolina*. Asperlina(1), Isoasperlina(2), Acetilfomalactona(3), Botriodiplodina(4), Ácido Faseolínico(5), Macrofominol(6), Faseolinona(7), Fomenona(8).

La botriodiplodina(4) se aisló por primera vez en cultivo de *Botryodiplodia theobromae*, posteriormente se la aisló en otras especies de hongos como *Penicillium*

roqueforti(Moreau et al. 1981), *P. Coalescens*(Cabedo et al. 2007), *P. stipitatum*(Fuska, Proksa, and Uhrín 1988) y *Lancunspora tetraspora*(Nakagawa et al. 1979).

Para este metabolito se ha descrito una amplia variedad de actividades biológicas entre las que se pueden mencionar a las actividades antifúngica y antibacteriana (Cabedo et al. 2007), así como su capacidad mutagénica(Y Moulé et al. 1981; Yvonne Moulé, Decloitre, and Hamon 1981), su capacidad de inducir enlaces cruzados de proteína-ADN en células de mamíferos e inhibir la multiplicación celular en cultivos en crecimiento(Y Moulé et al. 1982; Y Moulé and Darracq 1984), posee capacidad citotóxica y anti leucémica(Fuska and Fuskova 1976; Fuska, Proksa, and Uhrín 1988; McCrurry and Kyo 1973) y también se la describió como fitotoxina de *M. phaseolina* aislada de cultivos de soja en Mississippi (Moreau et al. 1981; Ramezani et al. 2007).

El macrofominol(6) fue reportado por primera vez por Trigós et al en 1995, en donde evaluaron patogenicidad del medio de cultivo del hongo con plantas de *Phaseolus vulgaris* observándose pudrición de la raíz (Trigós et al. 1995).

Con respecto al ácido faseolínico(5) se ha reportado que no presenta actividad fitotóxica, a diferencia de la faseolinona(7)(Mahato et al. 1987) que es una exotoxina no específica, resistente al calor, que inhibe la germinación de semillas y causa síntomas de marchitez en plántulas y lesiones necróticas en hojas de manera similar a las que son causadas por la infección del hongo en los hospederos; estudios confirman que la faseolinona es la fitotoxina producida en inicio de la enfermedad, pero su rol en el inicio de la infección de las raíces permanece desconocido(Dipanwita Bhattacharya et al. 1994; Dipanwita Bhattacharya, Dhar, and Ali 1992; G. Bhattacharya et al. 1987, 1990; Dhar, Siddiqui, and Ali 1982; Siddiqui et al. 1979).

Se determinó la fitotoxicidad de cultivos *M. phaseolina* ,obtenidos de cultivos de soja provenientes de Mississippi desde 2000 hasta 2003 los cuales presentaban

síntomas de la pudrición carbonosa, en los cuales no se detectó la presencia de faseolinona(Ramezani et al. 2007).

Con respecto a los demás metabolitos; acetilfomalactona, asperlina e isoasperlina han sido aislados a partir de un amplio grupo de organismos. En el caso de la acetilfomalactona se aisló por primera vez *Aspergillus caepitosus*, el cual presentaba actividad antimicrobiana(Gómez et al. 1997; Honda et al. 1990; Mizuba, Lee, and Jiu 1975);la asperlina fue descrita por primera vez en *Aspergillus nidulansy* se ha reportado su actividad antitumoral y antibacterial(Argoudelis and Zieserl 1966). En *Macrophomina phaseolina* Bhattacharyaet al.1992 informaron el aislamiento de la asperlina, isoasperlina, acetilfomalactona.

1.3.3. Información genómica de *Macrophomina phaseolina*

Con la reciente secuenciación del genoma de *M. phaseolina* se buscó obtener información sobre los procesos implicados en la interacción huésped-patógeno, y comprender las bases moleculares de la patogénesis (proceso de infección, adhesión, invasión y la colonización) (Islam et al. 2012).

Como se conoce hasta la actualidad este patógeno cuenta con gran cantidad de estrategias que le permiten sobrevivir en el huésped; adquiriendo nutrientes del mismo o para contrarrestar las defensas; se han informado que codifica 829 genes transportadores agrupados en 106 familias, así como también una gran cantidad de genes relacionados a la detoxificación(Martínez-Villarreal et al. 2016).

Con el análisis del genoma de *Macrophomina phaseolina* se ha encontrado que presentan diferencias con otros hongos fitopatógenos con respecto a la cantidad de enzimas hidrolíticas; se estima que el genoma de *M. phaseolina* codifica 365 enzimas activas de hidratos de carbono, dentro de las cuales se encuentran alrededor de 219 hidrolasas de glucósidos, 56 glicosiltransferasas, 65 esterases de hidratos de carbono, 6 módulos de unión a carbohidratos y 16 liasas de polisacáridos (Islam et al. 2012).

Se destaca que se han reportado que 75 genes estarían relacionados con la producción de metabolitos secundarios (Islam et al. 2012).

1.4- Características químico-biológicas de moléculas secretadas por *M. phaseolina*

Los mecanismos de participación de las fitotoxinas en la interacción huésped-patógeno hasta la actualidad representan un área por descubrir, debido a la amplia diversidad química que existe y que aún se desconoce como estas moléculas están implicadas en la patogénesis(Pusztahelyi, Holb, and Pócsi 2015).

Teniendo en cuenta que este fitopatógeno presenta una alta variabilidad morfológica, genética y patogénica (Muñoz Cabañas et al. 2005), inclusive para aislados obtenidos de una misma región(Ashraf et al. 2015), así como también diferencias en la capacidad patogénica de los aislados en distintas especies de plantas(Su et al. 2001); que podría deberse a una diferentes factores como la variabilidad genética(Yesil and Bastas 2016), condiciones ambientales (Diourte et al. 1995)(Mihail and Taylor 1995), zonas geográficas de la cual proviene el aislado (Sexton, Hughes, and Wise 2016)(Reyes-Franco et al. 2006)(Beas-fernández et al. 2004) e incluso el huésped del cual fue obtenido(Williams-Alanís et al. 2009).

M. phaseolina posee un potencial genómico importante para la producción de metabolitos secundarios que podrían estar implicados en el proceso de patogénesis, sin embargo, hasta la fecha sólo se describieron pocos metabolitos e inclusive se desconoce los factores que regulan su biosíntesis o su función específica en el proceso de infección.

En Paraguay, este fitopatógeno afecta a cultivos de importancia socio económica, incluso con gran severidad y no se dispone de información sobre cómo afecta en la capacidad de los aislados para la biosíntesis de moléculas que faciliten la colonización según el área geográfica del aislado o de diferentes cultivos de origen, por ello, es necesario determinar si existe producción diferencial de metabolitos de

aislados de *Macrophomina phaseolina* del Paraguay de acuerdo a estos factores y además identificar y caracterizar la función en la patogénesis de estos metabolitos.

La búsqueda de alternativas para el control del hongo *M. phaseolina* requiere un esfuerzo por entender cuáles son los factores que favorecen la infección, qué herramientas dispone el hongo para ello para, posteriormente, diseñar de manera bioespecífica agentes antifúngicos.

El objetivo general del siguiente trabajo fue caracterizar de forma química y biológica los metabolitos fitotóxicos secretados por diferentes aislados de *Macrophomina phaseolina* para ello se fijaron los siguientes objetivos específicos: evaluar la virulencia de los aislados de *Macrophomina phaseolina* sobre un modelo vegetal, evaluar el perfil de los metabolitos secretados por los aislados de *Macrophomina phaseolina*, realizar el aislamiento de los metabolitos fitotóxicos producidos por *Macrophomina phaseolina*, comparar la capacidad de producción de metabolitos fitotóxicos por parte de los diferentes aislados de *M. phaseolina*.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Reactivos

Se emplearon solventes de grado HPLC para la obtención del extracto orgánico, y técnicas cromatográficas: Acetato de etilo (JT Baker) y Hexano de (JT Baker). Para los bioensayos se emplearon Acetonitrilo (JT Baker) y Dimetilsulfóxido (para análisis ACS-.Merck)

Los metabolitos macrofominol, asperlina, isoasperlina y acetilfomalactona fueron purificados, identificados y caracterizados por miembros del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas en colaboración con el Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, España.

2.2- Cultivo *in vitro* de *Macrophomina phaseolina*

Se utilizaron diez aislados del hongo *Macrophomina phaseolina* obtenidos de cultivos de soja (*Glycine max*(L.) Merr.), sésamo (*Sesamum indicum* L.) y estevia *Stevia rebaudiana*(Bert.)Bertoni, provenientes de distintas zonas geográficas del Paraguay, pertenecientes al cepario micológico del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción.

Los aislados fueron mantenidos en medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA), del cual posteriormente se tomaron tres discos de micelio y se inocularon en botellas Roux que contenían 200 mL de medio de cultivo líquido papa dextrosa (PDB), las botellas se incubaron por un periodo de ocho días en estufa microbiológica en condiciones estáticas de oscuridad y a 30°C. Se utilizaron como control negativo medios de cultivo sin inocular mantenidos en las mismas condiciones que los medios que fueron inoculados con el hongo.

2.3- Evaluación de la virulencia de los aislados sobre hoja entera

Para los ensayos de virulencia se emplearon hojas enteras de *Phaseolus vulgaris* que se colocaron en placas de Petri que contenían papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Sobre cada hoja se colocó un disco de micelio de 1 mm de diámetro de cada aislado y se mantuvieron en oscuridad. Se evaluó la virulencia de los aislados cada 24 horas hasta la finalización del experimento al cabo de siete días (Bañuelos-Balandrán and Mayek-Pérez 2008). Los aislados empleados provienen de distintas zonas y cultivos del país se muestran en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Aislados de *Macrophomina phaseolina* provenientes de distintas zonas geográficas del Paraguay y de distintos cultivos.

Aislados de <i>M. phaseolina</i>	Localidad	Departamento	Cultivo
FCQ11	San Lorenzo	Central	
FCQ39	Edelira	Itapúa	
FCQ51	Curupayty	Alto Paraná	Soja
FCQ53	Katuete	Canindeyú	
FCQ58	María Auxiliadora	Itapúa	
FCQ26	Choré	San Pedro	
FCQ60	San Francisco	San Pedro	Sésamo
FCQ61	Toro Pirú	San Pedro	
FCQ63	Toro Pirú	San Pedro	
FCQ64	Caacupé	Cordillera	Estevia

2.4- Obtención del extracto orgánico

Transcurrido el tiempo de crecimiento del hongo se procedió a separar el micelio del medio de cultivo. El filtrado resultante se empleó para la obtención del extracto orgánico mediante partición líquido-líquido con acetato de etilo HPLC (1:1; 1:1/2; 1:1/2), luego se secó la fracción orgánica con sulfato de sodio anhidro y posteriormente se eliminó el solvente orgánico mediante un evaporador rotatorio.

Los extractos obtenidos se almacenaron hasta su utilización (Flores-Giubi, Barúa Chamorro, and Vaceque Acosta 2016).

2.5- Análisis cromatográfico

Los extractos orgánicos obtenidos de los distintos aislados fueron analizados por técnicas cromatográficas como cromatografía en capa delgada (CCD) y Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC) para una evaluación comparativa de la producción de metabolitos.

2.5.1- Cromatografía en capa delgada (CCD)

Para el análisis por cromatografía en capa delgada los extractos fueron resuspendidos en acetato de etilo y fueron cromatografiados utilizando cromatofolios de gel de sílice 60 F254 Macherey-Nagel (0.20mm de grosor) y utilizando como fase móvil Hexano: Acetato de etilo (1:1), las placas fueron reveladas con luz UV a las longitudes de onda de 254, 365 nm y con vainillina como revelador.

2.5.2- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Se empleó una columna Luna 5µm de Silica 100A°, 250 x 4,6 mm marca Phenomenex, la fase móvil fue Hexano: Acetato de etilo en una proporción 40:60 en modo isocrático, la temperatura del horno fue de 25°C, los extractos orgánicos, las fracciones y los compuestos puros se solubilizaron en acetato de etilo. Para el análisis del perfil cromatográfico las condiciones de corrida se ajustaron a las diferentes muestras y se indican en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2: Condiciones del análisis cromatográfico.

	Concentración (mg/mL)	Tiempo de corrida (min)	Detector	Flujo (mL/min)
Extracto Crudo	5	18	UV (260nm)	0,6
Fracciones	1	25	UV(260nm), IR	0,6
Compuestos puros	1	25	UV(260nm), IR	0,6

Se obtuvieron los tiempos de retención de los metabolitos purificados, de manera a comparar e identificar los picos en los cromatogramas correspondientes a las fracciones cromatográficas, mediante la utilización de los detectores UV (260nm) e índice de refracción(IR), **Tabla 2.3**.

Tabla 2.3: Tiempo de retención de los metabolitos de *M. phaseolina*

Metabolitos	Tiempo de retención (min.)	
	Detector UV (260 nm)	Detector IR
Acetilfomalactona (F3)	8,758	8,867
Macrofominol (H3)	10,158	10,267
Asperlina (H5)	11,067	11,175
Isoasperlina (J4)	14,750	14,858

Se realizaron curvas de calibración de cada compuesto puro para su cuantificación en los extractos orgánicos y se establecieron las diferentes condiciones del análisis cromatográfico para cada metabolito(**ANEXO 1**)(Flores-Giubi, Barúa, and Gwynn 2019).

2.6- Cromatografía en columna abierta

La obtención y el aislamiento de las fracciones semipurificadas, se realizó mediante la separación cromatográfica en columna abierta, empleándose como fase estacionaria gel de sílice y fase móvil una mezcla de solventes de polaridad creciente de hexano:acetato de etilo, la mezcla fue de 10%, 20%, 40%, 50% de acetato de etilo :Hexano (v/v),100 % acetato de etilo.

La cromatografía en columna se realizó a partir de un gramo de extracto orgánico de FCQ11, se eluyó sucesivamente con las diferentes mezcla de solventes, obteniéndose las diferentes fracciones, las cuales fueron evaluadas por cromatografía en capa fina (CCD) y fueron agrupados de acuerdo al perfil cromatográfico obtenido.

Las fracciones de interés fueron analizadas y purificadas por HPLC y posteriormente identificadas por Resonancia Magnética Nuclear por miembros del Departamento de Química Biológica a través de una colaboración con el Departamento de Diseño Biosintético de Fungicidas de la Universidad de Cádiz, España. De esta manera se purificaron e identificaron el Macrofominol, Asperlina, Isoasperlina y Acetilfomalactona (ANEXO 2).

2.7- Evaluación de la actividad fitotóxica

2.7.1- Ensayo en disco de soja

Hojas de *P. vulgaris* fueron previamente lavadas en etanol al 70% por 10 segundos, luego en agua destilada también por 10 segundos y posteriormente secadas, se cortaron con un sacabocados de 1,8 cm de diámetro y fueron colocadas en placas de Petri que contenían papel de filtro humedecido con agua destilada estéril (Molitor et al. 2012). Sobre cada disco de hoja se colocaron 50 µg de extracto orgánico disuelto en Acetonitrilo y agua en proporción de 50 %. Se utilizó como control positivo una solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 5% y como control negativo el disolvente. Los discos de hoja se dejaron en oscuridad a 30°C por 24 hs en contacto con los extractos crudos y 48 hs en contacto con las fracciones y los compuestos puros; posteriormente se evaluó el porcentaje de área foliar dañada empleando el Software Image J (Rueden et al. 2017).

2.7.2- Ensayo en plántulas de soja

Se emplearon semillas de soja (*Glycine max*) de la variedad NIDERA, las cuales fueron previamente esterilizadas con etanol al 70% por 2 minutos, luego solución de hipoclorito de sodio por 2 minutos, lavado con agua destilada estéril tres veces por 30 segundos y dejadas en reposo en agua destilada estéril por 2 minutos. Posteriormente las semillas se colocaron en placas de Petri que contenían un papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Las semillas se dejaron en oscuridad y a temperatura ambiente hasta su germinación. Posteriormente, las semillas que germinaron se transfirieron a tubos tipo Eppendorf que contenían papel

de filtro humedecido con agua destilada estéril. Se colocaron en cámara bajo condiciones de crecimiento de luz continua y a una temperatura de 25°C por 48 a 72 horas. El bioensayo fue realizado por triplicado.

Luego de 48 a 72 horas las plántulas en estadio VC fueron expuestas a los distintos extractos orgánicos y a los compuestos purificados obtenidos de *M. phaseolina*; los cuales se disolvieron con Dimetilsulfóxido (DMSO) al 3% de manera a obtener una concentración de extracto crudo de 10 mg/mL y de 5mg/mL para los compuestos purificados.

Las plántulas se colocaron en 250 µL de los extractos disueltos en DMSO, luego de seis horas se procedió al agregado de 500 µL de agua destilada. Se empleó como control 250 µL de una solución de DMSO al 3%. Para la evaluación del daño se realizaron mediciones de la longitud de la raíz principal de las plántulas (en cm) y del número de raíces secundarias formadas (Flores-Giubi, Barúa Chamorro, and Vaceque Acosta 2016).

También se evaluó el daño de membrana mediante la medición del porcentaje del contenido total de electrolitos empleando un conductímetro para lo cual cada plántula se colocó en tubos Falcon de 50mL conteniendo 30 mL de agua destilada y se llevó a agitación constante toda la noche para luego registrar el valor de la conductividad inicial (C1). Seguidamente, se devolvió el líquido a los tubos y con sus mismas plántulas se autoclavaron a 126°C y 30 minutos de manera a liberar la totalidad de los iones presentes, luego de alcanzar temperatura ambiente, se llevaron nuevamente a agitación constante al menos por un mínimo de 12 horas y posteriormente se registró nuevamente la conductividad (C2). Se emplearon como control plántulas, que no fueron expuestas a los diferentes extractos orgánicos y compuestos puros.

Para el cálculo del porcentaje de fuga de electrolitos se utilizó el valor de la conductividad inicial y la conductividad final.

$$\text{Porcentaje de fuga de electrolitos: } \frac{C1(\text{conductividad inicial})}{C2(\text{conductividad final})} \times 100$$

2.8- Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los ensayos de fitotoxicidad se utilizó un programa estadístico GraphPadPrism 5. Se empleó un análisis de varianza (ANOVA) y posterior comparación múltiple entre las medias mediante la prueba de rangos de Tukey (post test). Para todas las pruebas estadísticas se consideraron diferencias significativas con un 95 % de confianza, $p < 0.05$.

3- RESULTADOS

3.1- Evaluación de la virulencia de los aislados de *M. phaseolina* sobre hojas de *Phaseolus vulgaris*

Se evaluó la virulencia y la sintomatología producida por *Macrophomina phaseolina* sobre hojas de *Phaseolus vulgaris*. Se emplearon nueve aislados de *M. phaseolina*, cinco de ellos fueron obtenidos a partir de cultivos de soja pero de diferentes regiones geográficas del territorio nacional; FCQ11 proveniente de San Lorenzo, Departamento Central, FCQ39 y FCQ58 proveniente de las localidades de Edelira y María Auxiliadora, respectivamente, ambos del Departamento de Itapúa. FCQ51 proveniente de la localidad de Curupayty, Departamento de Alto Paraná y FCQ53 provino de la localidad de Katuete, Departamento de Canindeyú. Tres de los aislados fueron obtenidos a partir de cultivos de sésamo del Departamento de San Pedro; FCQ60, el cual provino de la localidad de San Francisco y FCQ61 junto con FCQ63 provinieron de Toro Pirú. Un aislado se obtuvo a partir de un cultivo de estevia FCQ64 de Caacupé, Departamento de Cordillera.

Se observó que, a los siete días postinoculación, seis de los aislados presentaban crecimiento, clorosis o necrosis, que podría indicar la capacidad de dichos aislados de colonizar o dañar el tejido, a excepción de los aislados FCQ53, y FCQ58 donde no se observó efecto alguno sobre el tejido foliar (**Fig. 3.1**).

3.2- Metabolitos secretados por los aislados de *Macrophomina phaseolina*

3.2.1- Rendimiento de extracción de metabolitos secretados

Los extractos orgánicos se obtuvieron a partir de los filtrados de los cultivos de los diferentes aislados de *M. phaseolina*. Fue incluido el extracto orgánico obtenido del filtrado del aislado de *M. phaseolina* FCQ26, el mismo fue obtenido de un cultivo de sésamo del Departamento de San Pedro y fue crecido en las mismas condiciones que los primeros nueve aislados y previamente a este trabajo, bajo las mismas condiciones de cultivo se obtuvo un extracto orgánico.

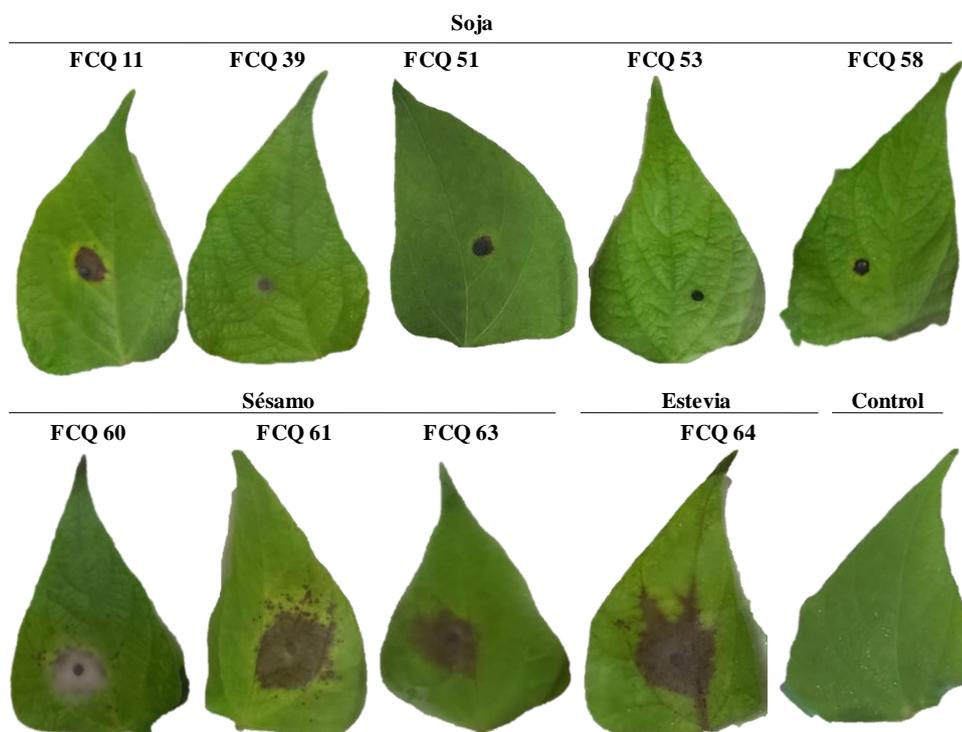


Figura 3.1. Evaluación de la virulencia de aislados de *Macrophomina phaseolina* en hojas de *Phaseolus vulgaris*. Imágenes representativas de hojas de *Phaseolus vulgaris* que fueron inoculadas con un disco de micelio de los aislados de *M. phaseolina* obtenidos de cultivos de soja (FCQ 11, FCQ 39, FCQ 51, FCQ 53, FCQ 58), sésamo (FCQ 60, FCQ 61, FCQ 63) y estevia (FCQ 64), como control negativo se utilizó una hoja sin inocular. Corresponden al cuarto día post inoculación, el ensayo se realizó por triplicado.

En la **Figura 3.2** se muestran los rendimientos de extracción de metabolitos secretados por los diferentes aislados. Se destacó de manera significativa *M. phaseolina* FCQ 58 con el menor rendimiento de moléculas secretadas y *M. phaseolina* FCQ 63 con un rendimiento promedio de 253 ± 96 mg/L el que, aunque no hayan diferencias significativas con los demás aislados, presentó la tendencia de una mayor secreción de moléculas orgánicas. No se encontraron diferencias significativas entre los demás aislados.

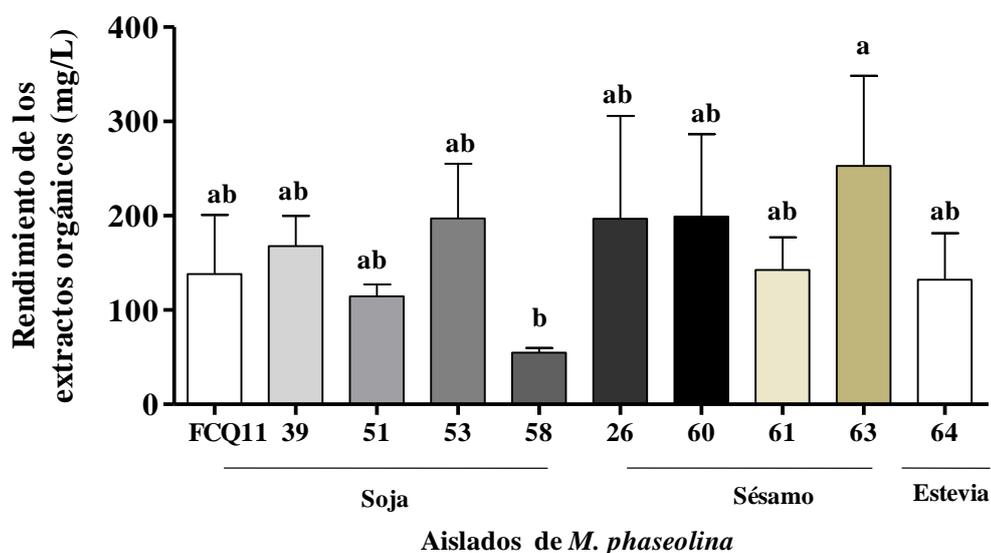


Figura 3.2: Rendimiento de los extractos orgánicos (mg/L). Rendimiento de los extractos orgánicos obtenidos a partir del filtrado de aislados de *M. phaseolina* obtenidos de cultivos de soja (FCQ11,FCQ39,FCQ51,FCQ53,FCQ58), sésamo (FCQ 26,FCQ60, FCQ61,FCQ 63) y estevia (FCQ 64) crecidos en el medio PDB. Letras diferentes representan diferencias significativas entre extractos crudos, * $p < 0.05$ ANOVA, PostHocTukey.

3.2.2- Perfil de los metabolitos secretados por los aislados de *Macrophomina phaseolina*

El análisis cromatográfico del perfil de moléculas secretadas de cada aislado de *M. phaseolina* se realizó con tres técnicas cromatográficas: cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UPLC).

3.2.2.1- Cromatografía en capa delgada (CCD)

La placa de CCD eluida fue expuesta a luz ultravioleta, a longitud de onda de 254nm (**Fig. 3.3A**), se pudo observar que, a diferencia del control, los aislados de *M. phaseolina* secretaron una amplia diversidad de moléculas capaces de absorber luz ultravioleta.

El revelador vainillina confirmó la gran variabilidad de compuestos producidos por los diferentes aislados y que son secretados al medio de cultivo en las condiciones experimentales y que los diferencian del control (**Fig.3.3B**).

Con ambas técnicas de revelado se pudo comprobar que a pesar de tener el mismo cultivo de origen o la misma zona geográfica, los perfiles mostraron diferencias cualitativas.

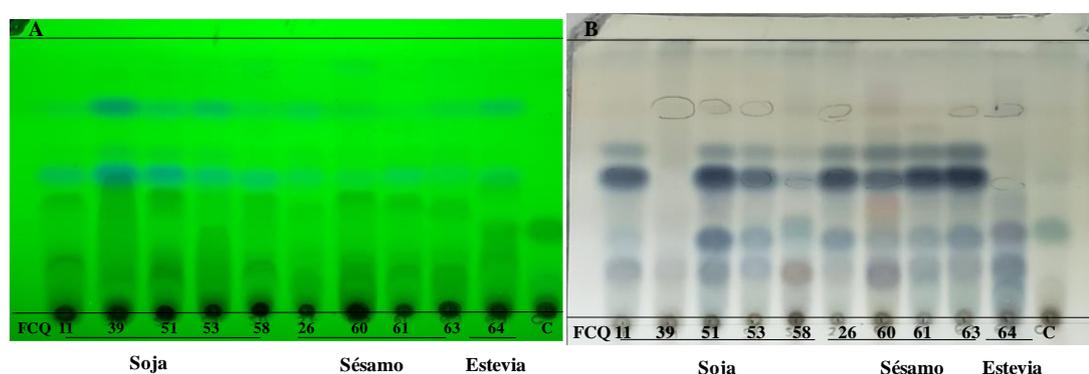


Figura 3.3 Separación por cromatografía en capa delgada de moléculas secretadas por los aislados de *M. phaseolina*. Perfil de los metabolitos secundarios secretados por aislados de *M. phaseolina* obtenidos a partir de cultivos de soja (FCQ11, FCQ39, FCQ51, FCQ53, FCQ58), sésamo FCQ26, FCQ60, FCQ61, FCQ63), estevia (FCQ64) por cromatografía de capa delgada. Fase estacionaria: gel de sílice 60 F254 (0.25 μ m de grosor); Fase móvil: hexano-acetato de etilo (1:1); A) revelador UV 254 nm, B) revelador Vainillina. El orden de siembra de la muestra de izquierda a derecha: FCQ11, FCQ39, FCQ51, FCQ53, FCQ58, FCQ26, FCQ60, FCQ61, FCQ63, FCQ64 y C: Control del medio de cultivo.

3.2.2.2- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Posteriormente, se procedió al análisis mediante HPLC con detector ultravioleta (UPLC-UV) tanto del control como de los extractos orgánicos obtenidos de los distintos aislados.

Los cromatogramas obtenidos de los diferentes extractos orgánicos presentaron un perfil diferencial de moléculas secretadas por *M. phaseolina*, mostraron diferencias cualitativas y cuantitativas. El perfil cromatográfico de las moléculas secretadas por *M. phaseolina* obtenido de cultivos de soja: FCQ11, FCQ39, FCQ51, FCQ53 y

FCQ58 se muestra en la **Figura 3.4**; de sésamo: FCQ26, FCQ60, FCQ61 y FCQ63 se muestra en la **Figura 3.5** y del aislado obtenido de un cultivo de estevia FCQ64 en la **Figura 3.6**. *M. phaseolina* FCQ 39 se destacó por ser quien presentó los picos de mayor intensidad de señal, además, se detectaron no sólo las diferencias cualitativas sino también diferencias cuantitativas en los metabolitos secretados por los diferentes aislados de *M. phaseolina*, incluso teniendo el mismo cultivo de origen y/o zona geográfica de aislamiento.

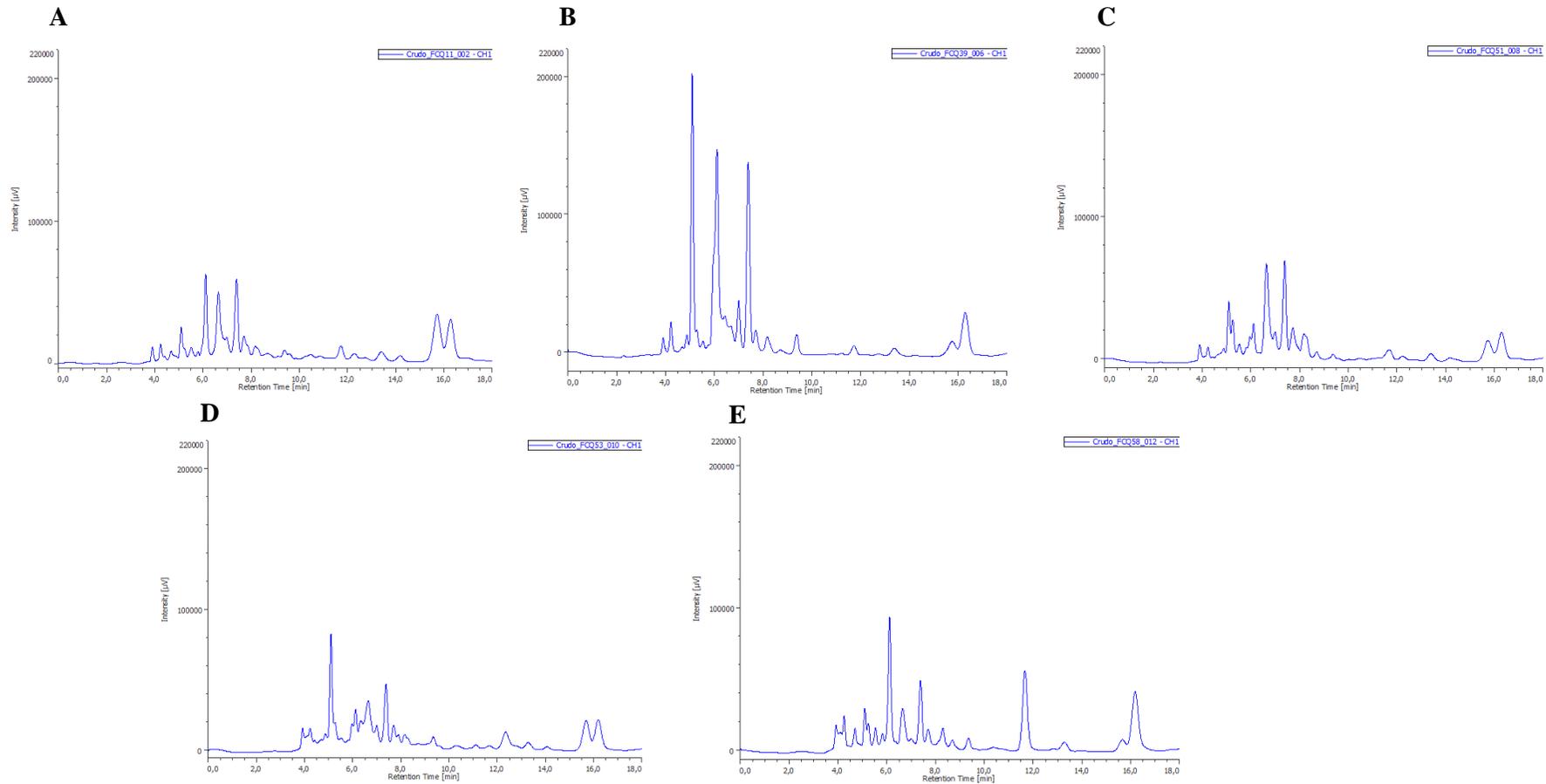


Figura 3.4. Perfil cromatográfico de moléculas secretadas por los distintos aislados de *Macrophomina phaseolina* de cultivos de soja **A:** FCQ11, **B:** FCQ39, **C:** FCQ51, **D:** FCQ53, **E:** FCQ58, obtenidos por HPLC-UV(260 nm). Fase estacionaria: Columna sílicagel de 5 micras; fase móvil: Hexano-acetato de etilo (40:60).

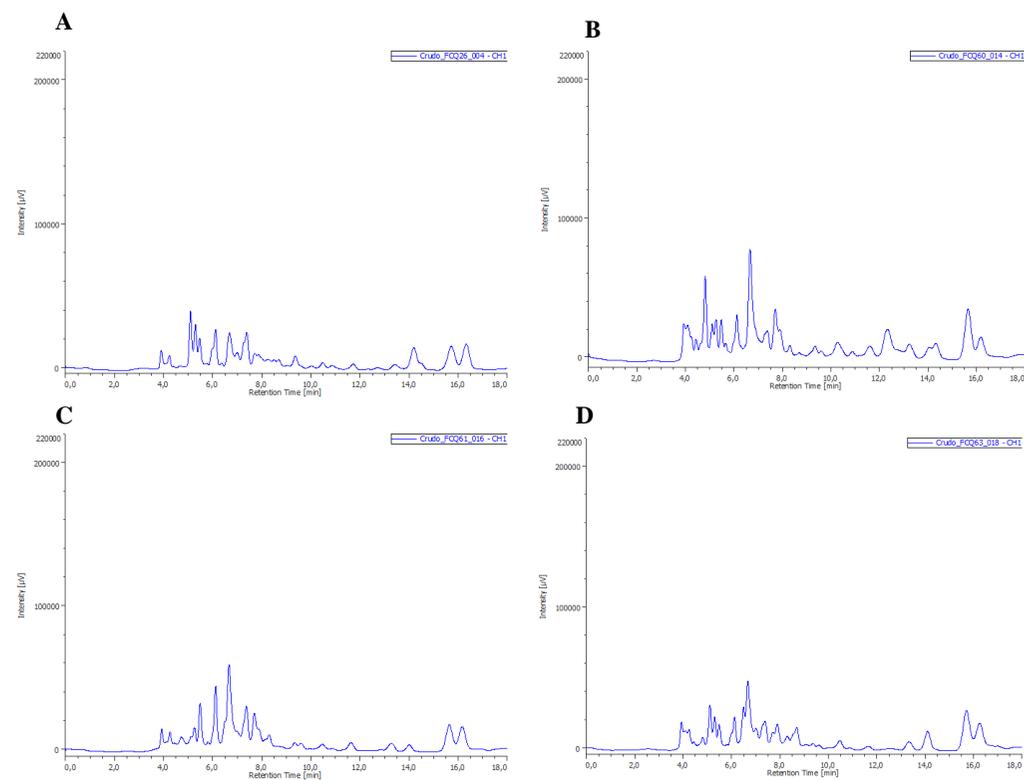


Figura 3.5: Perfil cromatográfico de moléculas secretadas por los distintos aislados de *Macrophomina phaseolina* de cultivos desésamo A:FCQ26, B:FCQ60, C:FCQ61, D:FCQ63, obtenidos por HPLC-UV (260 nm). Fase estacionaria: Columna sílicagel de 5 micras; fase móvil: Hexano-acetato de etilo (40:60).

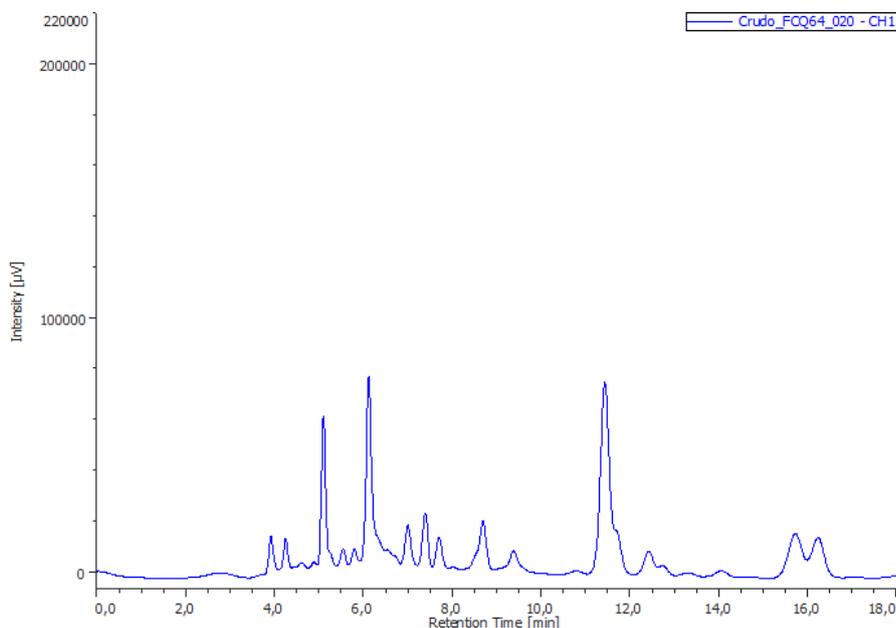


Figura 3.6. Perfil cromatográfico de moléculas secretadas por los distintos aislados de *Macrophomina phaseolina* de cultivos de estevia FCQ64 obtenidos por HPLC-UV (260 nm). Fase estacionaria: Columna sílicagel de 5 micras; fase móvil: Hexano-acetato de etilo (40:60).

3.3- Actividad fitotóxica de los metabolitos producidos por *Macrophomina phaseolina*

El ensayo de fitotoxicidad de las moléculas secretadas por *M. phaseolina* fue realizado sobre discos de hojas de *Phaseolus vulgaris* y plántulas de soja (*Glycine max*).

3.3.1- Evaluación de la actividad fitotóxica sobre discos de hojas de *Phaseolus vulgaris*

Se evaluó la fitotoxicidad de las moléculas secretadas por los diez aislados de *M. phaseolina* sobre discos de hojas de *Phaseolus vulgaris*. La mayoría de los extractos orgánicos ensayados mostraron signos de fitotoxicidad sobre los discos de hojas, en las mismas se observó la aparición de lesiones necróticas luego 24 hs de tratamiento a los discos de hoja con los extractos (**Fig.3.7**).

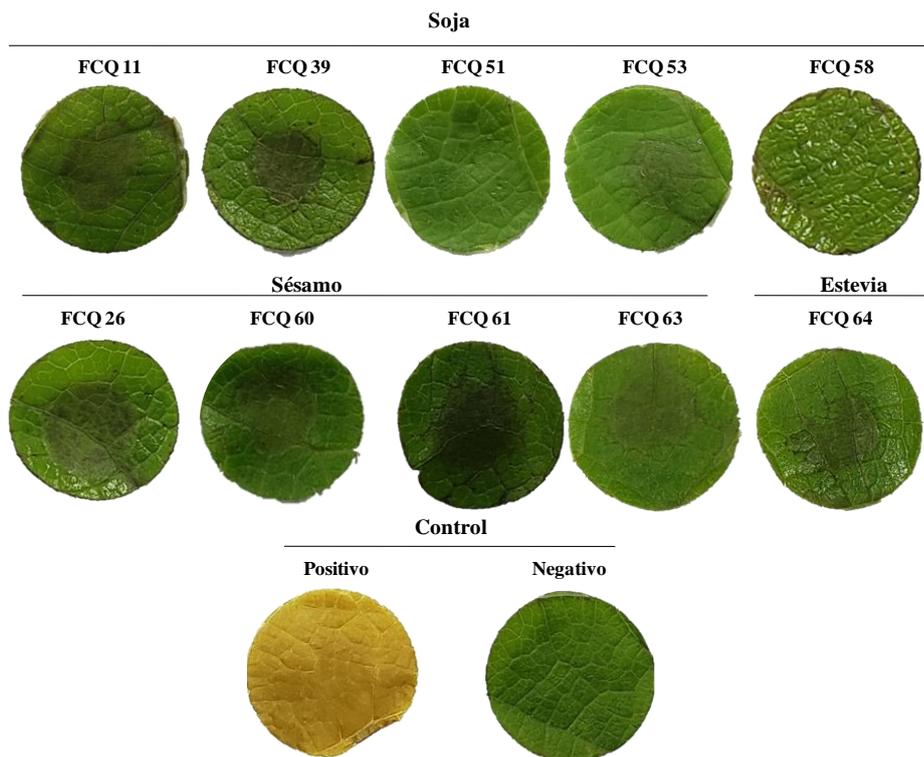


Figura 3.7. Imágenes representativas de discos de hoja de *Phaseolus vulgaris* donde se evaluó la actividad fitotóxica de moléculas secretadas por diferentes aislados de *M. phaseolina*. Los discos de hoja fueron puestos en contacto con 50 μg de extracto orgánico de filtrado de *M. Phaseolina* por 24 horas. Control positivo: H_3PO_4 al 5 %. Control negativo: Acetonitrilo 50 %. Los aislados fueron obtenidos a partir de cultivos de soja (FCQ11, FCQ39, FCQ51, FCQ53, FCQ58), sésamo FCQ26, FCQ60, FCQ61, FCQ63), estevia (FCQ64).

Se midió el área de necrosis producido por los metabolitos secretados por los diferentes aislados y se calcularon los porcentajes de necrosis inducida por las moléculas presentes en los diferentes extractos.

Todos los extractos, a excepción de FCQ51 y FCQ58, indujeron daño necrótico sobre el tejido vegetal evaluado sin mostrar diferencias significativas entre ellos (**Fig. 3.8**).

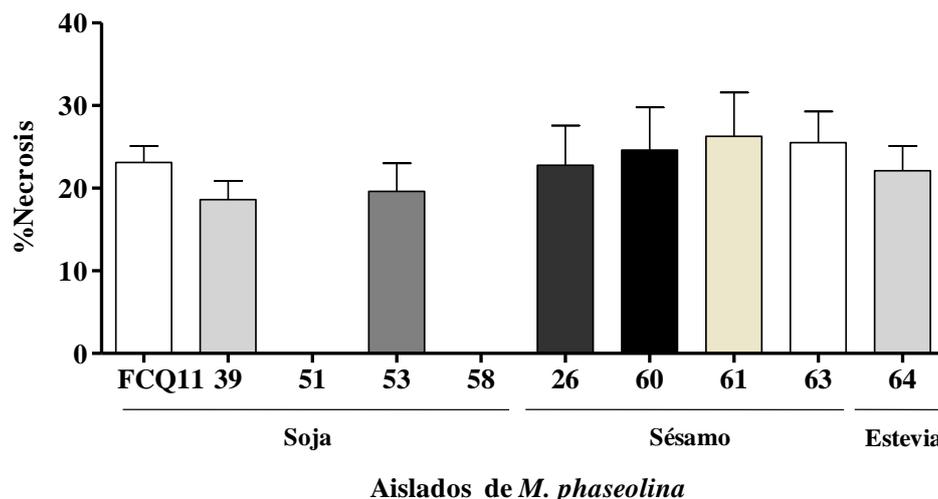


Figura 3.8 Ensayo de Fitotoxicidad en discos de hoja de *Phaseolus vulgaris*. Porcentaje de necrosis inducido por 50µg de extracto orgánico obtenido a partir del filtrado de *M. phaseolina*. obtenidos de cultivos de soja (FCQ11,FCQ39,FCQ51,FCQ53,FCQ58), sésamo (FCQ 26,FCQ60, FCQ61,FCQ 63) y estevia (FCQ 64), N= 3, *p<0.05 ANOVA, PostHocTukey.

3.3.2- Ensayo de inmersión en plántulas de soja (*Glycine max*)

Para evaluar la fitotoxicidad se emplearon los mismos extractos orgánicos utilizados para el ensayo de disco de hoja y se trataron con ellos a plántulas de soja en fase cotiledonar (VC). Éstas fueron colocadas en 250 µL una solución de 10 mg/mL de extracto orgánico obtenido del filtrado de *M. phaseolina*. Se empleó como control 250 µL del disolvente, una solución de DMSO al 3%.

Los indicadores de efecto fitotóxico de los extractos de *M. phaseolina* sobre las plántulas de soja fueron la longitud de la raíz principal, el número de raíces secundarias y el porcentaje de electrolitos liberados (**Fig.3.9**).

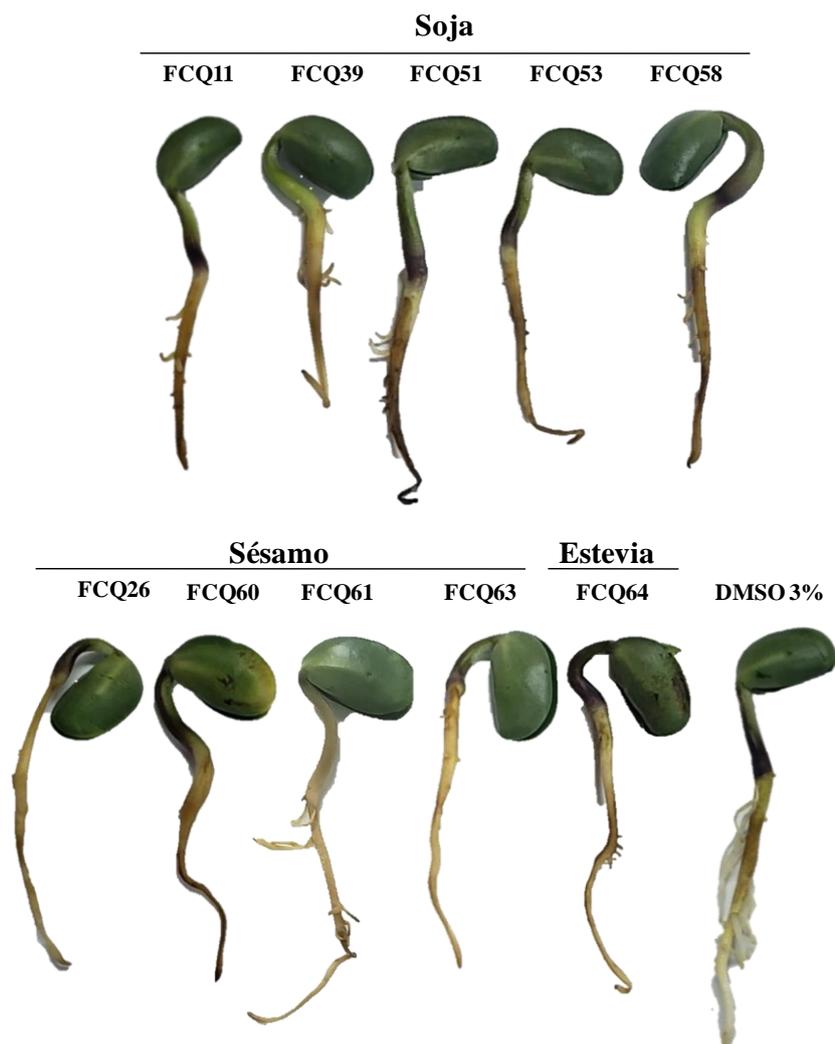


Figura 3.9. Actividad fitotóxica de extractos orgánicos del filtrado de los aislados de *M. phaseolina* sobre plántulas de soja (*Glycine max*). Imagen representativa de las plántulas, tomadas a las 24 hs de tratamiento.

No existieron diferencias significativas ni en la longitud de la raíz principal (**Fig.3.10 A**) ni en el número de raíces secundarias (**Fig.3.10B**) entre los extractos de los diferentes aislados o con el control. Sin embargo, se observó que las escasas raíces secundarias desarrolladas expuestas a los extractos orgánicos, se caracterizaron por su longitud disminuida con respecto al tamaño de las raíces secundarias en el control, lo que constituyó una observación macroscópica cualitativa del efecto general de los extractos sobre las plántulas de soja.

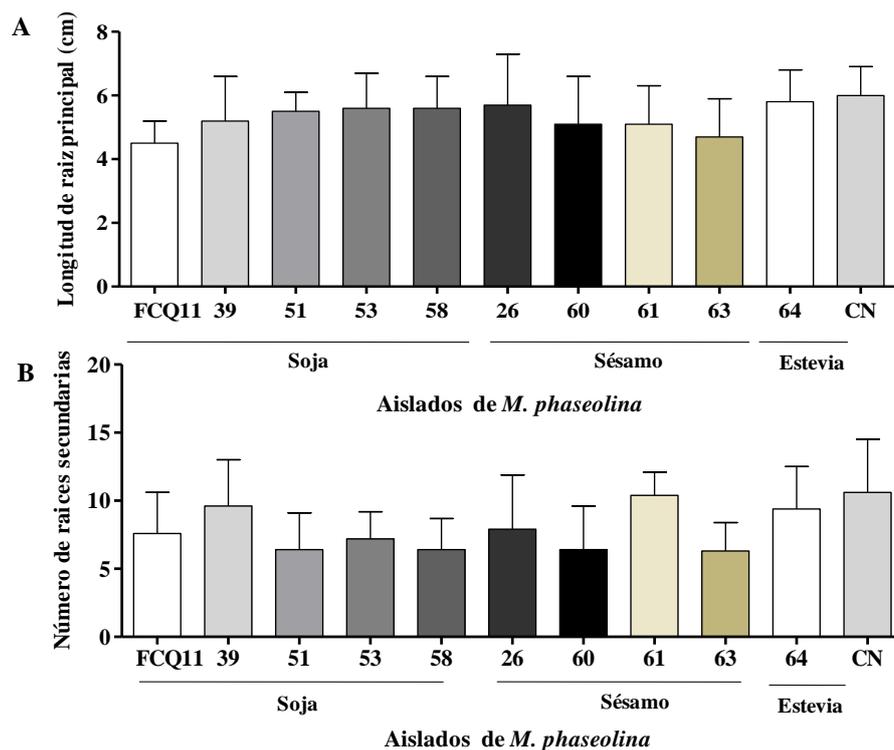


Figura 3.10. A) Efecto del extracto orgánico en la longitud de raíz principal. B) Efecto de los extractos orgánicos en el número de raíces secundarias de plántulas de soja. Plántulas expuestas a 10 mg/mL de extractos orgánicos de *Macrophomina phaseolina* obtenidos a partir de cultivos de soja (FCQ11, FCQ39, FCQ51, FCQ53, FCQ58), sésamo (FCQ26, FCQ60, FCQ61, FCQ63), estevia (FCQ64); Grupo control: plántulas expuestas a DMSO al 3%. Medidos a las 24 hs de exposición. N=3.

3.3.3- Fuga de electrolitos

En este experimento se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de la fuga de electrolitos para los extractos orgánicos correspondientes a los aislados de soja FCQ39 y de sésamo FCQ26, FCQ61 y FCQ63 con respecto al control (Fig. 3.11).

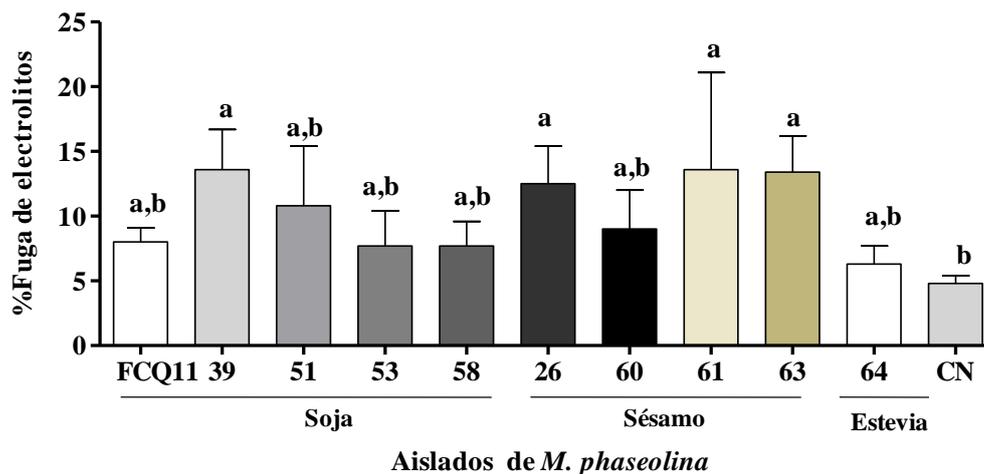


Figura 3.11. Efecto de los extractos orgánicos en la liberación de electrolitos de plántulas de soja. Plántulas expuestas a 10 mg/mL de extractos orgánicos de *Macrophomina phaseolina* obtenidos a partir de cultivos de soja (FCQ11, FCQ39, FCQ51, FCQ53, FCQ58), sésamo FCQ26, FCQ60, FCQ61, FCQ63), estevia (FCQ64); Grupo control plántulas expuestas a DMSO al 3%. Medidos a las 24 hs de exposición. N=3. Letras diferentes representan diferencias significativas, * $p < 0,05$ (ANOVA), PostHocktukey.

3.4- Purificación cromatográfica de los metabolitos secretados por *Macrophomina phaseolina*

Un gramo de extracto orgánico de *M. phaseolina* FCQ11, se separó en un columna de gel de sílice y se obtuvieron trece fracciones denominadas alfabéticamente de la Aa la M, las cuales fueron monitoreadas por CCD, estas fracciones resultaron de la combinación de aquellos tubos que presentaban un perfil similar.

Posteriormente de las trece fracciones, en colaboración con la Universidad de Cádiz, se obtuvieron distintas subfracciones y a partir de ellas se aislaron y purificaron los metabolitos mayoritarios de las fracciones D, F, G, H y J teniendo en cuenta las características del espectro de Resonancia Magnética Nuclear como criterio de selección de las fracciones para su purificación (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1: Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna y metabolitos mayoritarios.

Fracciones cromatográficas	Metabolitos mayoritarios
D	D1
F	F3
G	G5
H	H3, H4, H5
J	J4

Las distintas fracciones obtenidas de la cromatografía en columna y los metabolitos purificados fueron evaluados por cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando como fase estacionaria cromatofolios de gel sílice 60 F254, como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo en proporción 1:1.

La placa eluida fue expuesta a la luz ultravioleta (254nm)(**Fig.3.12.A**), en donde se pudo observar los carriles correspondientes a las trece fracciones obtenidas de la columna y a los siete compuestos purificados, en donde se puede visualizar, cuatro bandas principales que presentan una intensidad significativa, correspondientes a las fracciones D, E, G,Hy tres bandas en los compuestos purificados D1,G5 y H3 también se empleó el revelador vainillina con el cual se visualizó la presencia de diversos compuestos en las distintas fracciones (**Fig.3.12.B**).

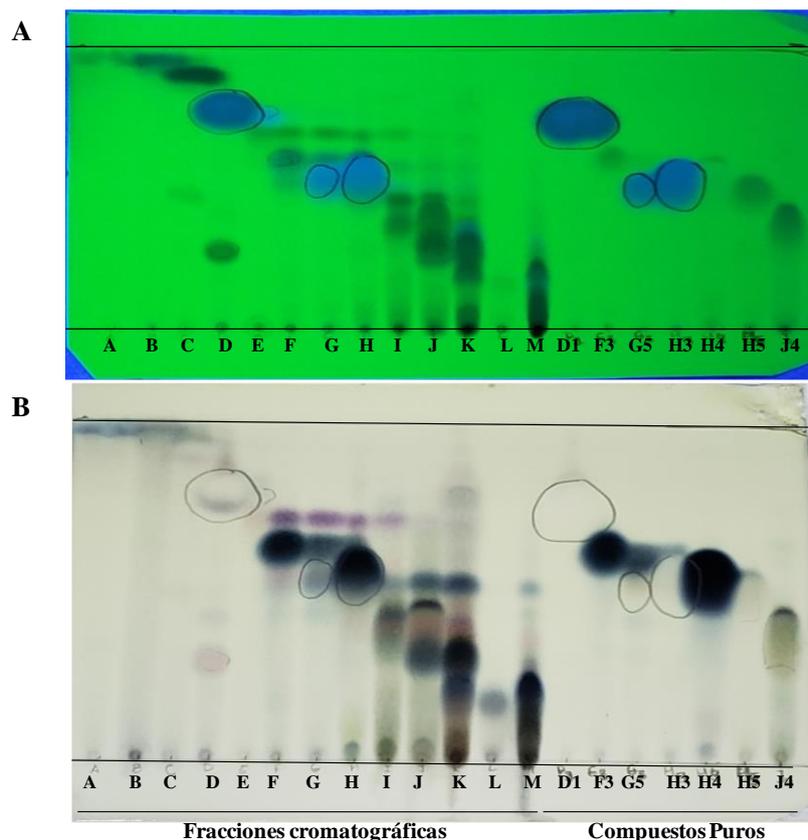


Figura 3.12. Cromatografía en capa delgada de las diferentes fracciones recogidas de la purificación de los compuestos presente en extracto orgánico. A. Reveladas con UV 254 nm y **B.** con revelador químico: vainillina.Fase estacionaria: gel de sílice 60 F₂₅₄ (0.25µm de grosor); Fase móvil: hexano-acetato de etilo (1:1).

3.5-Evaluación de la actividad fitotóxica de las fracciones cromatográficas

3.5.1- Ensayo en disco de hoja

Se evaluó la fitotoxicidad de las trece fracciones cromatográficas sobre discos de hojas de *Phaseolus vulgaris*. Para ello se emplearon 50 µg de las fracciones A a la M, por triplicado, empleando como control positivo ácido fosfórico y como control negativo el solvente en el que fueron disueltas las fracciones.

Las fracciones F, G, H, J, K y M mostraron signos de fitotoxicidad sobre los discos de hojas, en las mismas se observó la aparición de lesiones necróticas, las demás fracciones no presentaron daños en los discos de hojas (**Fig. 3.13**).

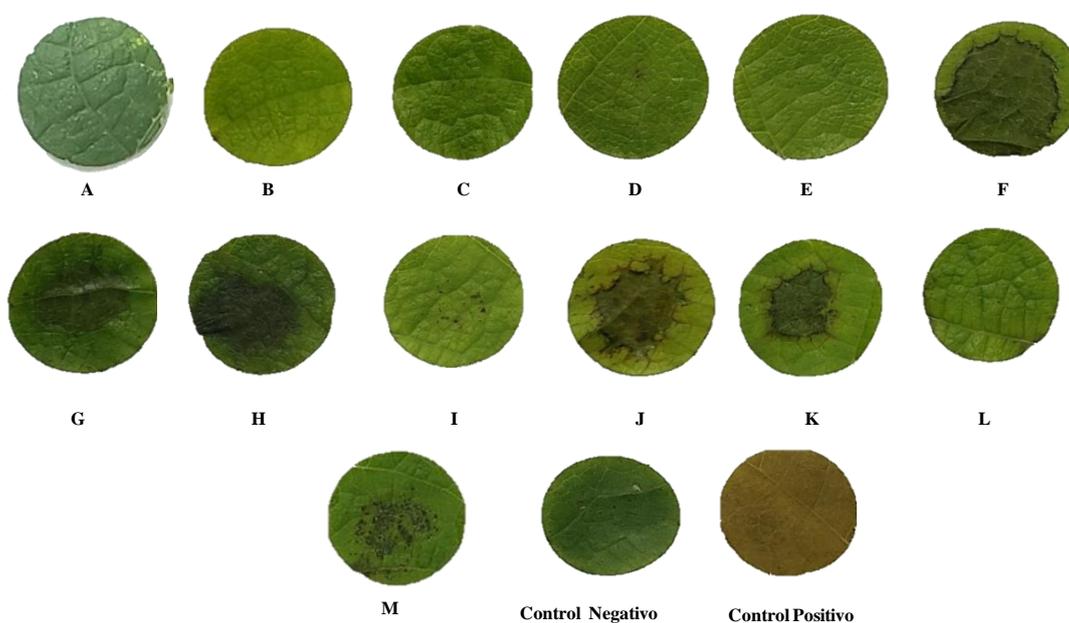


Figura 3.13. Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas del extracto orgánico de *M. phaseolina* sobre discos de hojas de *Phaseolus vulgaris*. Imágenes representativas de los discos de hoja puestos en contacto con 50 µg de extracto orgánico de *M. phaseolina*. Imagen tomada a las 48 horas. Control positivo: H₃PO₄ al 5 %. Control negativo: Acetonitrilo 50 %.

Las fracciones F, G, H, J, K y M indujeron necrosis en las hojas de *Phaseolus vulgaris*, no así las demás fracciones. Entre las fracciones que presentaron actividad o provocaron alguna lesión se destacó la fracción F como la fracción de mayor fitotoxicidad seguida de las fracciones H y J, luego la fracción G y por último las fracciones K y M (**Fig. 3.14**).

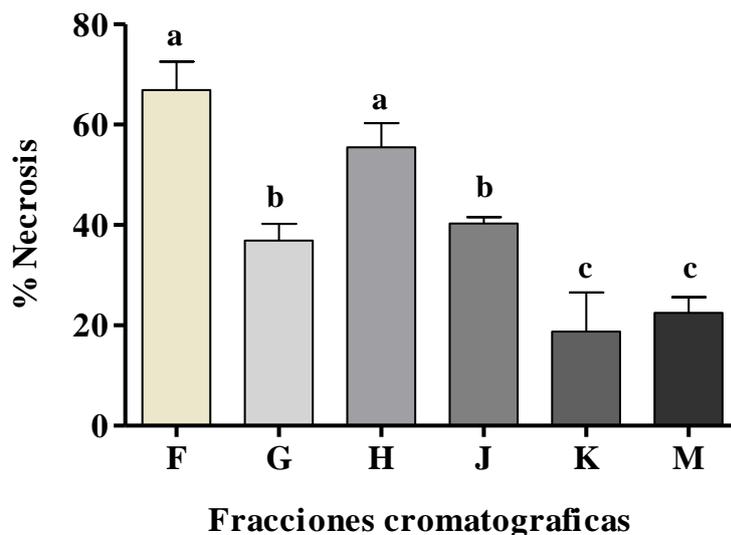


Figura 3.14. Ensayo de Fitotoxicidad en discos de hoja de *Phaseolus vulgaris*. Porcentaje de necrosis inducido por las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna del extracto orgánico de *M. phaseolina* cultivado en los medio PDB evaluados a 50µg. Letras diferentes representan diferencias significativas, * $p < 0.05$ ANOVA, PostHocTukey.

3.6- Evaluación de la actividad fitotóxica e identificación de los compuestos purificados y fitotóxicos

Se evaluó la fitotoxicidad de 50 µg de los compuestos puros sobre discos de hojas de *Phaseolus vulgaris* empleando como control positivo ácido fosfórico y como control negativo el solvente en el que fueron disueltos los mismos.

Se pudo observar que los compuestos F3, H3, H5, J4 provocaron daño o lesión en la superficie de los discos de hojas, en las mismas se observó la aparición de lesiones necróticas (**Fig.3.15**).

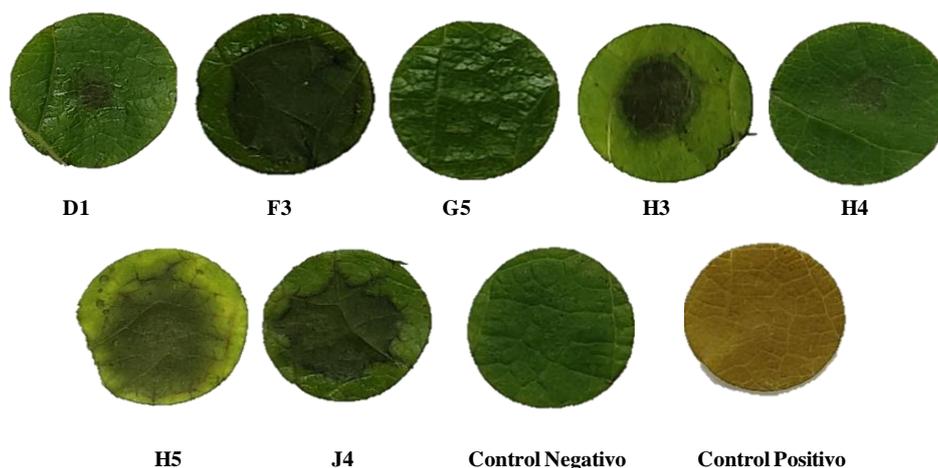


Figura 3.15. Ensayo de Fitotoxicidad en discos de hoja de *Phaseolus vulgaris*. Porcentaje de necrosis inducido por 50µg de los compuestos puros obtenidos del extracto orgánico de *M. phaseolina*. Imágenes representativas tomadas a las 48 hs del ensayo.

Mediante análisis del espectro de Resonancia Magnética Nuclear fueron identificados a los metabolitos F3, H3, H5 y J4 como acetilfomalactona, macrofominol, asperlina, e isoasperlina, respetivamente. Los cuatro metabolitos se encuentran previamente descritos en la literatura como producidos por *M. phaseolina*. La cuantificación del daño inducido por los compuestos purificados y fitotóxicos se muestran en la Figura 3.19. Se observó diferencia significativa en la fitotoxicidad inducida por la asperlina con respecto a los demás compuestos, siendo esta significativamente mayor, seguido de acetilfomalactona e isoasperlina y por último macrofominol (Fig. 3.16).

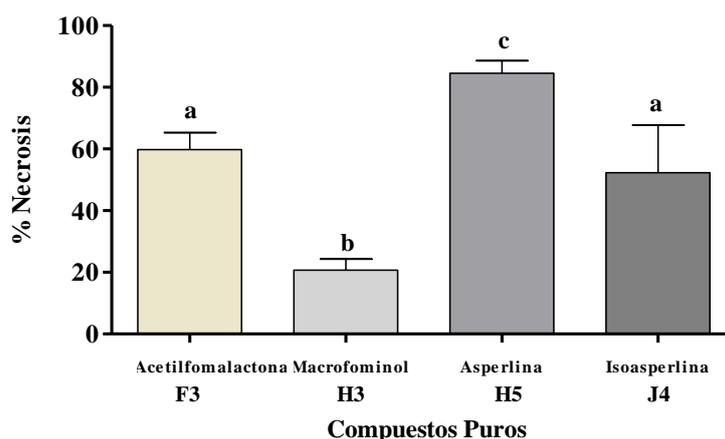


Figura 3.16. Ensayo de Fitotoxicidad en discos de hoja de *Phaseolus vulgaris*. Porcentaje de necrosis inducida por 50µg de los metabolitos secretados por *M. phaseolina* cultivado en el medio PDB. Letras diferentes representan diferencias significativas entre los compuestos puros, * $p < 0.05$ ANOVA, PostHocTukey.

3.6.1- Ensayo de fuga de electrolitos inducida compuestos purificados

Posteriormente se realizó el ensayo de fuga de electrolitos inducida compuestos purificados en plántulas de soja. Entre los cuatro compuestos puros ensayados se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de la fuga de electrolitos para los compuestos acetilfomalactona, asperilina, isoasperilina con respecto al control, donde se destacó la acetilfomalactona como el metabolito que tuvo el mayor efecto sobre la membrana plasmática de las plántulas de soja. El macrofominol no presentó diferencias significativas con respecto al control (Fig.3.17).

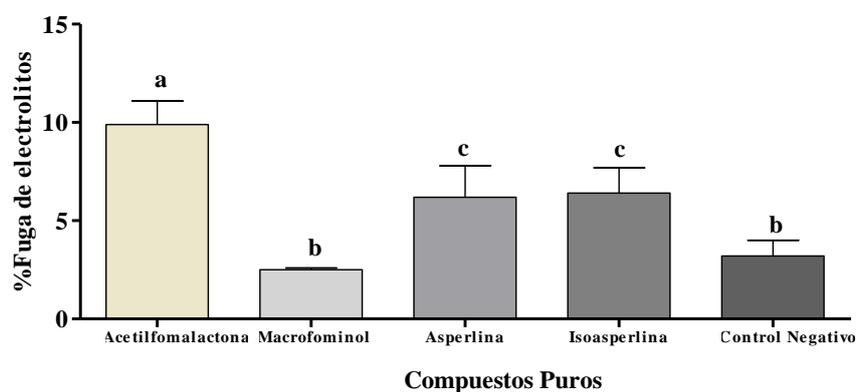


Figura 3.17. Efecto de los metabolitos de *M. phaseolina* en la liberación de electrolitos de plántulas de soja. Plántulas expuestas a 5 mg/mL de los compuestos puros obtenidos del extracto orgánico de *Macrophomina phaseolina*; Grupo control plántulas expuestas a DMSO al 3%. Medidos a las 24 hs de exposición. Letras diferentes representan diferencias significativas entre los compuestos puros, $p < 0,05$ (ANOVA), PostHocktukey.

3.7. Detección y cuantificación de metabolitos fitotóxicos en aislados de *M. phaseolina* del Paraguay

3.7.1- Detección de metabolitos fitotóxicos en aislados de *M. phaseolina* del Paraguay por Cromatografía en capa delgada

Los extractos orgánicos y los compuestos puros, fueron evaluados por cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando como fase estacionaria cromatofolios de gel sílice 60 F254, como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo en proporción 1:1.

Las placas eluidas fueron expuestas a luz ultravioleta (254nm) (Fig. 3.18.A) o con el revelador vainillina (Fig. 3.18.B), en ambos casos se pudo observar que los compuestos purificados se encontraban presentes en los extractos, con diferencias cuali y cuantitativas.

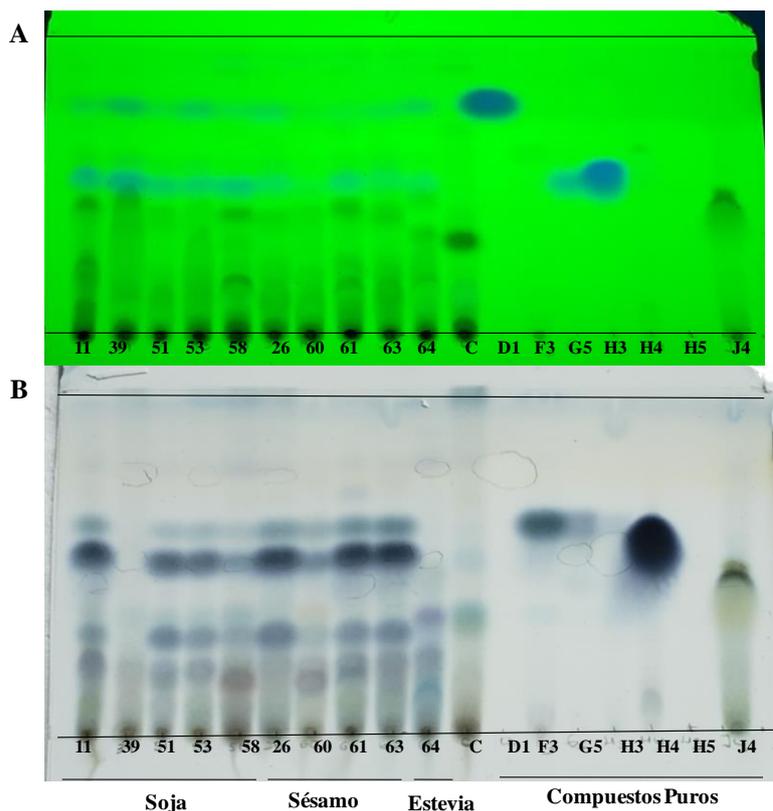


Figura 3.18. Cromatografía en capa delgada de los diferentes extractos orgánicos y los compuestos puros. Fase estacionaria: gel de sílice 60 F₂₅₄ (0.25µm de grosor); Fase móvil: hexano-acetato de etilo (1:1); placa fueron reveladas con UV 254 nm y el revelador químico: vainillina.

3.7.2- Cuantificación de metabolitos fitotóxicos en aislados de *M. phaseolina* del Paraguay por Cromatografía líquida de alta resolución

Teniendo en cuenta que los metabolitos purificados presentaban características estructurales distintas se seleccionó un método cromatográfico para cada uno de ellos.

Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes del Macrofominol (H3), Asperlina(H5), Isoasperlina(J4) y Acetilfomalactona(F3) con el detector ultravioleta (**Fig. 3.19**) y el detector de índice de refracción (**Fig. 3.20**). Se observó una buena separación de los picos revelado a través de tiempos de retención diferentes para cada uno de los compuestos (**Tabla 2.3**), esto permitió la cuantificación de los mismos en los extractos crudos.

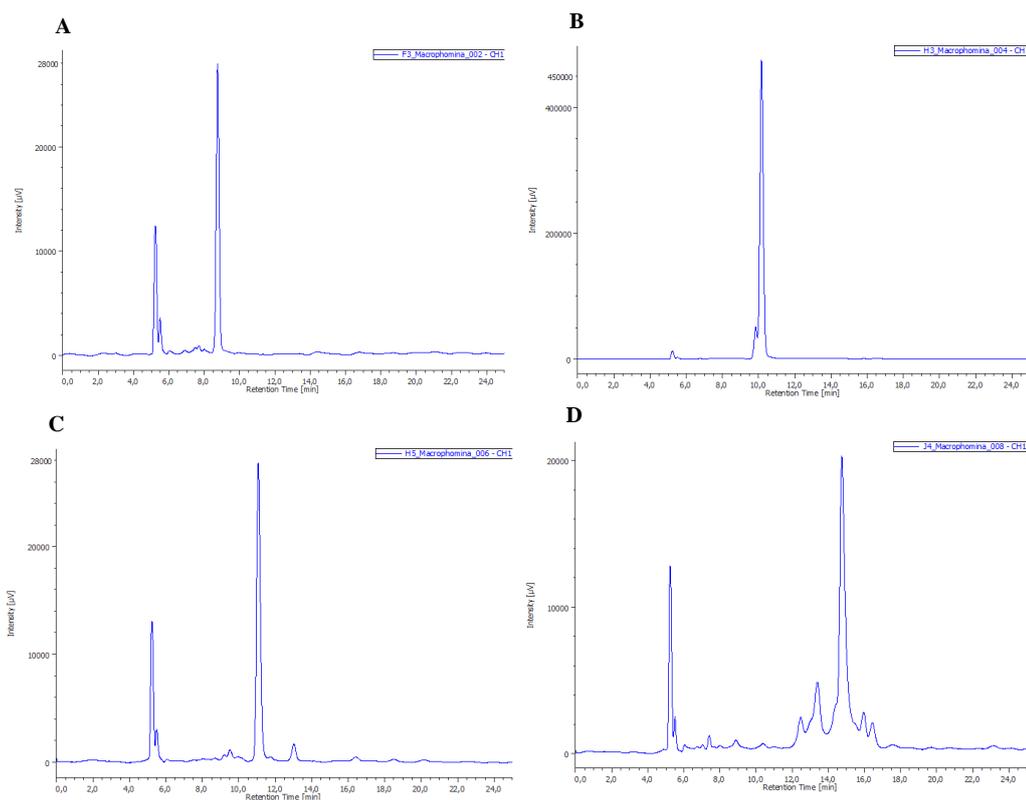


Figura 3.19. Cromatogramas de los metabolitos de *Macrophomina phaseolina*. A: Acetilfomalactona; B: Macrofominol; C: Asperlina; D: Isoasperlina. Perfiles obtenidos por HPLC – UV (260 nm) Fase estacionaria: Columna Silica gel de 5 micras; fase móvil: Hexano-acetato de etilo (40:60).

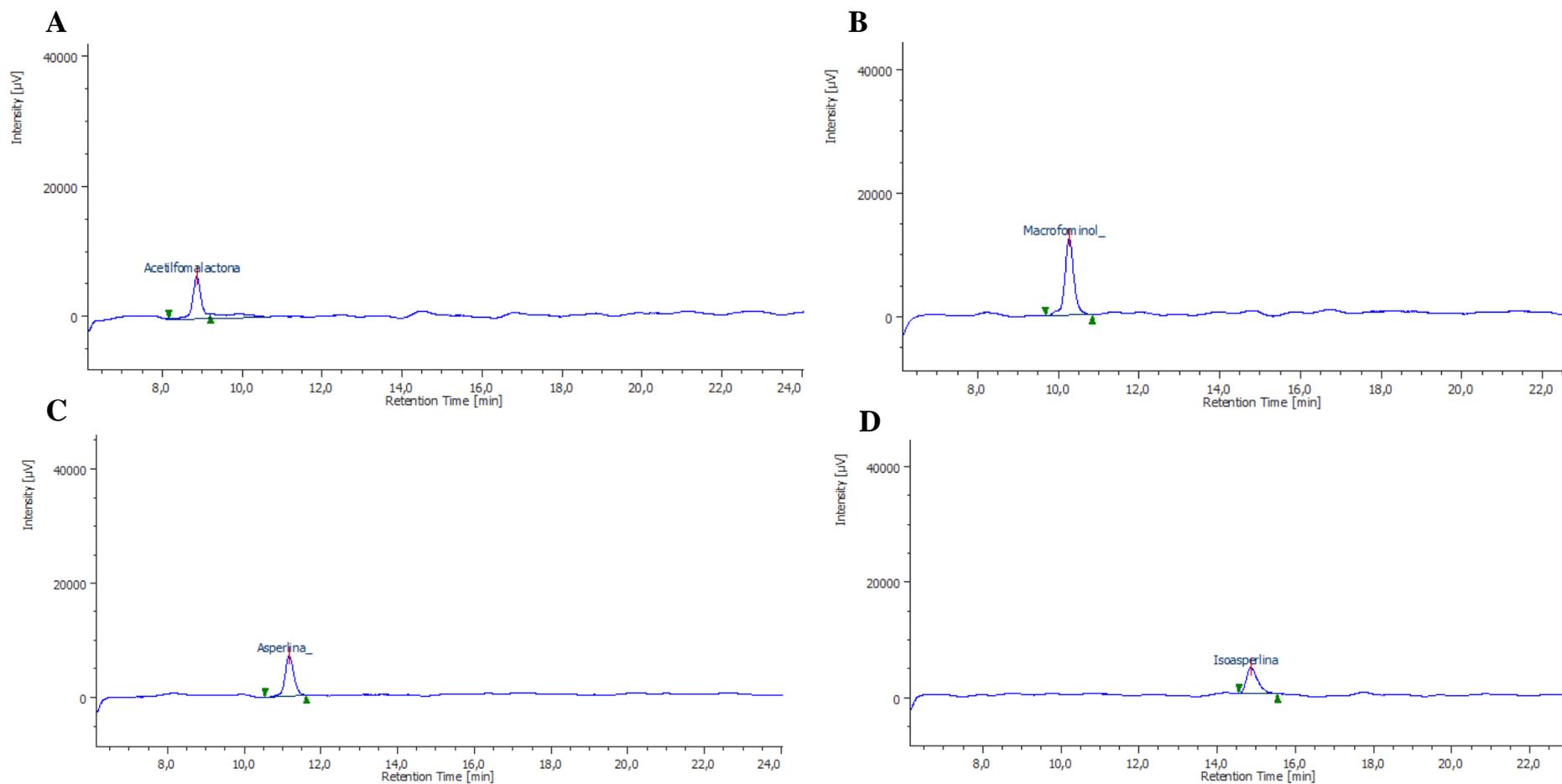


Figura 3.20. Cromatogramas de los metabolitos de *Macrophomina phaseolina*.A: Acetilfomalactona; B:Macrofominol; C:Asperlina;D:Isoasperlina. Perfiles obtenidos por HPLC – IR. Fase estacionaria: Columna Silica gel de 5 micras; fase móvil: Hexano-acetato de etilo (40:60).

Se realizó el análisis cromatográfico de los extractos crudos y los compuestos purificados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV), con el cual se establecieron diferencias cuantitativas en la secreción de los metabolitos por los diferentes aislados de *M. phaseolina*. La cuantificación de los metabolitos en los extractos orgánicos se realizó mediante una curva de calibración en donde se emplearon los compuestos puros como referencia (ANEXO 1).

Se determinó la concentración de los compuestos puros presentes en los extractos orgánicos de cada aislado de *M. phaseolina* (Tabla 3.2). El macrofominol se detectó en todos los extractos obtenidos, se detectaron concentraciones elevadas en los extractos de los aislados FCQ39 seguido de FCQ51 y FCQ53. En cambio, la asperlina, isoasperlina y acetilfomalactona no fueron detectados en todos los aislados.

M. phaseolina FCQ63 secreta la mayor cantidad de asperlina, seguido de FCQ60, FCQ61 y FCQ53, los demás aislados no produjeron cantidades detectables de este metabolito.

La mayor concentración de isoasperlina fue detectada en *M. phaseolina* FCQ60, seguida de FCQ63 y FCQ26. No se detectó su presencia en FCQ39, FCQ58 y FCQ63.

La acetilfomalactona se caracterizó por que aquellos aislados que la secretaban lo hacían en grandes concentraciones, entre ellos se destacó *M. phaseolina* FCQ63 con 2972 µg/mL en promedio, seguido de FCQ61, FCQ11, FCQ60 y FCQ58.

Tabla 3.2: Detección de metabolitos secundarios en los extractos crudos.

Extracto crudo – Procedencia	Cultivo	Macrofominol (µg/mL)	Asperlina (µg/mL)	Isoasperlina (µg/mL)	Acetilfomalactona (µg/mL)
FCQ 11 – Central	Soja	50±2 ^{e,f}	ND*	232±40 ^{c,d}	1104 ±89 ^c
FCQ39 – Itapúa		283±17 ^a	ND	ND	ND
FCQ51 - Alto Paraná		183± 7 ^b	ND	120±14 ^d	ND
FCQ53 – Canindeyú		129± 2 ^c	618±10 ^b	230±93 ^{c,d}	ND
FCQ58 – Itapúa		52± 1 ^{e,f}	ND	ND	882±35 ^c
FCQ 26 - San Pedro	Sésamo	49± 2 ^f	ND	427±82 ^{b,c}	ND
FCQ 60 - San Pedro		74± 1 ^{d,e}	668±78 ^b	1070±62 ^a	1056±2 ^c
FCQ 61 - San Pedro		95 ±1 ^d	624± 10 ^b	354±24 ^{b,c}	1636±73 ^b
FCQ 63- San Pedro		33± 1 ^f	1211±148 ^a	547±33 ^b	2972±36 ^a
FCQ 64 – Cordillera	Estevia	47± 1 ^f	209±9 ^c	ND	ND

Letras diferentes representan diferencias significativas entre extractos crudos para un mismo metabolito analizado, p<0,05 (ANOVA), PostHocTukey.

*ND: No detectable

3.8 - Caracterización de los aislados de *M. phaseolina* de acuerdo al perfil de metabolitos detectados y cuantificados

El análisis de componentes principales (PCA) se realizó para visualizar el patrón de distribución de los diez aislados de *Macrophomina phaseolina* en relación a la detección y concentración de los metabolitos, su procedencia geográfica o de cultivo del cual fue aislado (Fig. 3.21).

El análisis de componentes principales demostró una agrupación entre *M. phaseolina* FCQ11, FCQ26, FCQ58 y FCQ 64, éstos se caracterizaron por secretar macrofominol en baja cantidad con respecto a los demás aislados y metabolitos. No se encontró asociación entre aislados de acuerdo a la procedencia geográfica o de cultivo del cual fue aislado y su capacidad de secretar metabolitos.

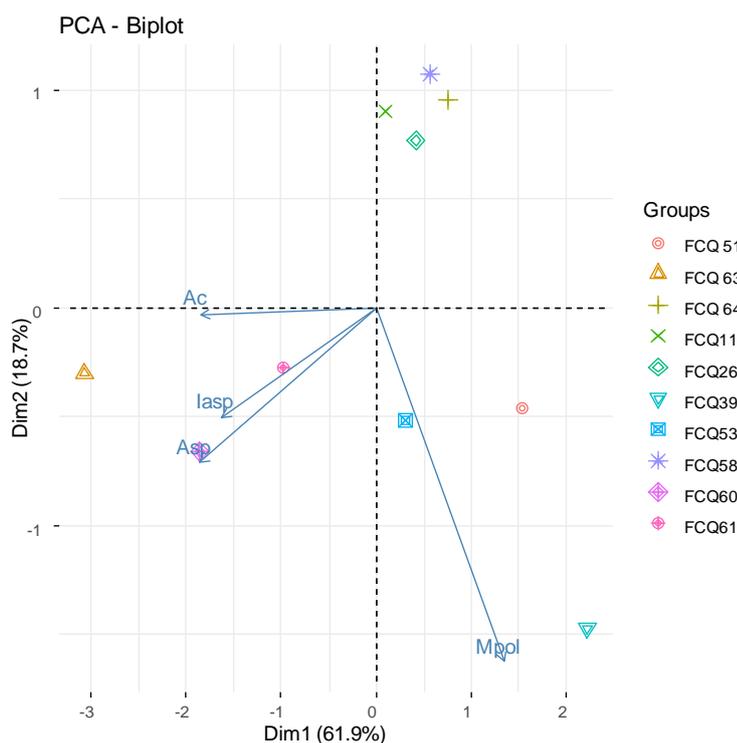


Figura 3.21: Análisis de componentes principales (PCA). Indicando la separación de los diferentes aislados de *M. phaseolina* en base a la producción de metabolitos secundarios de cada uno. Los aislados evaluados fueron FCQ11, FCQ39, FCQ5, FCQ53, FCQ58, FCQ 26, FCQ60, FCQ61, FCQ63, FCQ64. Mpol: Macrofominol, Asp: Asperlina, Iasp: Isoasperlina, Ac: Acetilfomalactona.

4- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El ensayo de virulencia sobre hojas de *Phaseolus vulgaris* demostró la variabilidad en la capacidad de colonizar el tejido vegetal de los diferentes aislados de *Macrophomina phaseolina* provenientes de distintas zonas geográficas y cultivos del Paraguay.

Se observó que seis de los aislados presentaban crecimiento, clorosis o necrosis, que podría indicar la capacidad de dichos aislados de colonizar o dañar el tejido, a excepción de los aislados FCQ51, FCQ53, y FCQ58 donde no se observó efecto alguno sobre el tejido foliar (**Fig. 3.1**). Los resultados obtenidos, se podrían comparar con algunos los datos expresados por otras investigaciones, en las cuales se han realizado estudios de la virulencia o capacidad de patogénica de este hongo en diferentes modelos vegetales; donde han reportado variabilidad en la patogenicidad de aislados de *M. Phaseolina* obtenidos de una región o cultivo; Ashraf et al 2015 informaron con respecto a la variabilidad en la virulencia de aislados obtenidos de cultivos de maíz provenientes de distintas zonas de una región en donde observaron una baja y alta virulencia de los aislados (Ashraf et al. 2015).

Se pudo observar que los aislados utilizados presentaron diferencia en la capacidad patogénica; observándose la aparición de lesiones necróticas y clorosis en el tejido vegetal para siete de los aislados, los cuales corresponde a dos aislados de soja, tres de sésamo y el aislado de estevia. Con respecto a los tres aislados restantes al término del ensayo no se observó la aparición de daño en el tejido, estos aislados corresponden al cultivo de soja; los resultados demuestran la alta tasa de variabilidad que presenta este patógeno, por lo cual se ha dificultado la generalización de su comportamiento con respecto al hospedero del cual obtiene o de la región de dónde proviene (Sexton, Hughes, and Wise 2016). Sin embargo, se pudo notar de forma cualitativa un mayor daño inducido por los aislados de *M. phaseolina* de sésamo y estevia, en comparación con los de soja, lo que podría indicar que éstos aislados poseen mayor capacidad de infección sobre el modelo vegetal seleccionado o que las hojas de *Phaseolus vulgaris* son más sensibles a los aislados de *M. phaseolina* provenientes de cultivos de sésamo y estevia.

Estos resultados también demostraron la capacidad de *M. phaseolina* de atacar a diferentes hospederos, es decir, su baja especificidad.

Los rendimientos de extracción reflejan la capacidad de secreción de metabolitos por los diferentes aislados (**Fig. 3.2**). Se destacó que todos los aislados de *M. phaseolina* secretaron al medio de cultivo una cantidad semejante de metabolitos, a excepción de *M. phaseolina* FCQ58, aislado de soja, quien de forma significativa fue el que secretó la menor cantidad de moléculas *in vitro*, este hongo también se destacó por su nula fitopatogenicidad en el ensayo de virulencia.

Más allá de la capacidad total de secreción de moléculas es importante la evaluación de la complejidad química de los extractos obtenidos, lo que daría una huella dactilar química e indicaría el potencial de cada aislado de secretar moléculas con mayor o menor diversidad en las condiciones de cultivo *in vitro* empleadas. Para ello, la producción de metabolitos por aislados de *M. phaseolina* obtenidos de diferentes zonas geográficas del Paraguay y de diferentes huéspedes fueron evaluados cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis cualitativo de la CCD (**Fig.3.3**) demostró que cada aislado a pesar de haber sido mantenido en idénticas condiciones de cultivo presentó un perfil cromatográfico diferente; mostrando la presencia de una gran diversidad de moléculas secretadas por los diferentes aislados, muchos de ellos comunes independiente de su origen geográfico o de hospedero del cual fue aislado.

Las diferencias cualitativas y cuantitativas entre las moléculas secretadas se demostró a través de cromatografía líquida de alta resolución, ya que a través de esta técnica se pueden resolver las manchas aunque se encuentren con relaciones de frente muy similares. Los perfiles cromatográficos constituyeron la huella dactilar de los diferentes aislados de *M. phaseolina* aislados en suelo paraguayo a través de HPLC-UV(**Fig. 3.4-3.6**).

Con estos resultados se pudo corroborar que los aislados de *Macrophomina* presentan un perfil diferencial y complejo; destacándose que a pesar de que hayan sido aislados de un mismo hospedero y cultivados en idénticas condiciones *in vitro*, éstos presentan perfiles químicos diferentes. Se debe tener en cuenta que existen muchos factores relacionados a la producción de fitotoxinas, entre los que podemos mencionar características inherentes al patógeno, hasta la composición del medio de cultivo (Cervantes-García, D.; Padilla-Ramírez, JS.; Simpson, J.; Mayek-Pérez 2003), la duración, las condiciones de cultivo (Berestetskiy 2008).

Através de los ensayos sobre discos de hojas de *Phaseolus vulgaris* y de inmersión de plántulas de soja evaluó el papel de los metabolitos secretados por *M. phaseolina* y que podrían estar involucrados en los procesos de interacción patógeno-huésped.

Los ensayos de actividad fitotóxica demostraron la presencia de moléculas con actividad fitotóxica en la mayoría de los extractos, visualizándose la aparición de lesiones necróticas en disco de hoja o induciendo la fuga de electrolitos

Todos los aislados de *M. phaseolina*, excepto FCQ51 y FCQ58, secretaron al medio de cultivo moléculas que indujeron necrosis en tejido foliar, es decir, la secreción de moléculas de bajo peso molecular constituye una de las estrategias que emplean estos aislados fúngicos(**Fig.3.7**). Es posible que FCQ51 disponga de otras herramientas adicionales para infectar y lograr exitosamente la colonización como ser la secreción de enzimas proteolíticas o factores de virulencia. En el caso de FCQ58, además de poseer baja virulencia, secretó una cantidad significativamente menor de moléculas orgánicas y era predecible que no disponga de moléculas inductoras de necrosis en hojas.

El ensayo de inmersión de plántulas reflejó el efecto que tendrían estos aislados sobre un hospedero susceptible y a través de una exposición de las raíces a las moléculas secretadas por los diferentes aislados de *M. phaseolina*. A pesar de que no se observaron diferencias significativas en el número o longitud de raíz principal de las plántulas se destacó que en la mayoría de ellos existió una reducción en el tamaño de las raíces secundarias expuestas a los extractos comparadas al control(**Fig.3.10**); lo que podría indicar que algunas de las moléculas presentes en los extractos y en contacto con las raíces tendrían implicancia en el metabolismo del huésped, pudiendo afectarla regulación del metabolismo, el crecimiento, o en la respuesta a factores externos(Berestetskiy 2008; Fonseca et al. 2018; Otani, Kohmoto, and Kodama 1995).

También se evaluó el posible daño a nivel de membrana plasmática en células expuestas a las moléculas secretadas por los hongos fitopatógenos a través del ensayo de fuga de electrolitos; en el cual se evaluó la liberación de iones debido al debilitamiento de las paredes de las plántulas de soja Cuatro de los extractos orgánicos ensayados ocasionaron daño a nivel de membrana en mayor medida FCQ39, seguido de FCQ26 y FCQ61 y por último FCQ63, todos aislados de cultivos y zonas geográficas diferentes. Estos resultados indicarían que los mecanismos de infección empleados por este hongo fitopatógeno es variable, puede secretar

moléculas fitotóxicas o puede requerir enzimas hidrolíticas en mayor medida, en caso de no disponer de estas estrategias no es capaz de inducir daño en las plantas, como es el caso de FCQ58.

Los microorganismos, específicamente los hongos son capaces de secretar metabolitos que en sinergia con enzimas secretadas logran controlar el crecimiento de otros microorganismos (Saravanakumar et al. 2016) o colonizar a las plantas hospederas (Nielsen et al. 1998) los resultados de este trabajo, demostraron la enorme capacidad y variabilidad de *M. phaseolina* para la secreción de moléculas inductoras de necrosis en hojas y/o capaces de inducir daño en membrana plasmática pero su capacidad de producción de las mismas es variable.

Los hongos pueden producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, las cuales pueden clasificarse como policétidos, péptidos no ribosómicos, terpenos o alcaloides; las fracciones cromatográficas y los compuestos purificados obtenidos del extracto orgánico de un aislado de *M. phaseolina* fueron analizados por cromatografía en capa delgada (**Fig.3.12**) y HPLC (**Fig. 3.19-3.20**), presentaron un perfil complejo de moléculas que son secretados por este hongo.

Se evaluó el efecto o participación que puedan presentar dichos metabolitos en los procesos de interacción patógeno-huésped, para lo cual se emplearon los ensayos en disco de hoja y el de inmersión de plántulas, de manera a determinar la implicancia de dichos metabolitos en los efectos observados en los procesos de infección (clorosis o lesiones necróticas y daño a nivel de membrana o debilitamiento de las paredes).

De las fracciones cromatográficas obtenidas y los compuestos puros se comprobó su capacidad fitotóxica en discos de hoja de *Phaseolus vulgaris*, en donde se observó que seis de las fracciones presentaron actividad (**Fig.3.15**), a partir de las cuales se pudieron aislar e identificar cuatro metabolitos previamente descritos en la literatura y aislados a partir de *M. phaseolina*: acetilfomalactona (F3), macrofominol (H3), asperlina (H5) e isoasperlina (J4) (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1: Datos de los diferentes aislados descritos en la literatura

Metabolito	Aislado por primera vez en:	Referencia espectroscópica	Citado en <i>Macrophomina</i>
F3 Acetilfomalactona	<i>Aspergillus caespitosus</i> (Mizuba, Lee, and Jiu 1975) <i>Nigrospora sp</i> (Evans, Ellested, and Kunstman 1969)	Mizuba, Lee, and Jiu 1975	D. Bhattacharya, Siddiqui, and Ali 1992
H3 Macrofominol	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Trigos et al. 1995	Trigos et al. 1995
H5 Asperlina	<i>Aspergillus nidulans</i> (Argoudelis and Zieserl 1966)	Dais and Perlin 1985	D. Bhattacharya, Siddiqui, and Ali 1992)
J4 Isoasperlina	<i>Aspergillus caespitosus</i> (Mizuba, Lee, and Jiu 1975)	Mizuba, Lee, and Jiu 1975	D. Bhattacharya, Siddiqui, and Ali 1992

Los metabolitos identificados han sido descritos en *Macrophomina phaseolina*, así como también en otros organismos, a diferencia del macrofominol el cual fue reportado solo en aislados de *Macrophomina phaseolina*.

Los cuatro metabolitos fueron capaces de inducir necrosis de tejido foliar de *Phaseolus vulgaris*, principalmente asperlina, seguido de isoasperlina y acetilfomalactona y en menor medida el macrofominol (**Fig.3.16**). También, exceptuando al macrofominol, fueron capaces de inducir daño de membrana plasmática. Estos resultados indicaron que el macrofominol podría tener un mecanismo diferente para la inducción de necrosis en las hojas, este metabolito a pesar de haber sido descrito previamente en aislados virulentos de *M. phaseolina*(Trigos et al. 1995) aún se desconoce su función específica en el proceso de interacción con la planta hospedera.

Estos metabolitos han sido aislados y descritos en otros organismos para los cuales se han reportado un amplio número de actividades biológicas; la acetilfomalactona posee actividad antimicrobiana (Mizuba, Lee, and Jiu 1975), la asperlina posee actividad antifúngica y como potencial terapéutico contra el cáncer (He et al. 2011).

Aunque se ha propuesto que la acetilfomalactona, asperlina e isoasperlina podrían estar involucradas en las interacciones patógeno-huésped, su papel en la patogenicidad aún no está claro, aunque la estructura de estos metabolitos podrían influir significativamente en las actividades biológicas, teniendo en cuenta que los tres corresponden a un grupo importante de compuestos que son las δ -lactonas α,β insaturadas, para las cuales se han descrito un amplio número de actividades biológicas, como inhibidores del crecimiento de plantas, insecticidas, anti protozario (Wilson and Jairo 2011) (Cardona, Guerra, and Restrepo 2014), antifúngicas (Vijaya Kumar, Suresh Babu, and Madhusudana Rao 2012) y antitumorales (Benedeković et al. 2016), por lo tanto estas moléculas aisladas tendrían un elevado potencial como moléculas bioactivas de interés en salud pública.

Se determinó la concentración de los metabolitos fitotóxicos previamente identificados en los diferentes extractos crudos obtenidos a partir de los diferentes aislados de *M. phaseolina* (Tabla 3.2).

La mayoría de los aislados secretaron niveles cuantificables de macrofominol, aunque su concentración no es la misma para ninguno de ellos, destacando en este caso tres de los aislados obtenidos de soja en los cuales las concentraciones observadas son mayores con respecto a los demás aislados (FCQ11, FCQ58, FCQ26, FCQ60, FCQ61, FCQ63, FCQ64).

Los aislados de sésamo son los que presentan una alta diversidad de metabolitos, incluso en concentraciones elevadas, a diferencia del aislado de estevia FCQ64 que presentó un bajo nivel de producción de metabolitos solo detectándose macrofominol y asperlina, sin embargo, se trata de un aislado muy virulento y capaz de inducir necrosis de tejido foliar y fuga de electrolitos, esto indica que este aislado podría disponer de una batería de enzimas hidrolíticas que sinergizan el efecto de los metabolitos secretados.

Estas diferencias en la concentración de los metabolitos en los diferentes extractos orgánicos de *Macrophomina phaseolina* se correlaciona con lo reportado anteriormente, ya que se observaron variaciones en la concentración y en naturaleza de los metabolitos secretados. Este

tipo de variaciones en la producción de metabolitos han sido reportados en *Macrophomina phaseolina* y en otros organismos; para *M. phaseolina* se describió análisis químico de treinta aislados procedentes de diferentes regiones de los Estados Unidos, se evidenciaron grandes variaciones en la cantidad de la fitotoxina botriodiplodina producida, así como efectos fitotóxicos observados para los aislados; encontrándose en algunos elevadas concentraciones y en otros no detectables (Abbas et al. 2019).

El análisis de componentes principales realizado en el presente trabajo no detectó una agrupación coherente con la zona geográfica, el hospedero del que fue aislado o el tipo de metabolito detectado de los cuatro que fueron identificados en el presente trabajo. La asociación encontrada agrupa a *M. phaseolina* FCQ11, FCQ26, FCQ58 y FCQ64, todos aislados a partir de cultivos diferentes, que mostraron virulencia diferente, incluso FCQ58 no mostró capacidad de inducir daño foliar en el ensayo de virulencia.

Por lo tanto, el hongo *M. phaseolina* presentó una elevada variabilidad en la capacidad de secreción de moléculas fitotóxicas o no fitotóxicas y esa producción depende de factores que no son los considerados en este trabajo como ser zona geográfica o cultivo de origen, podría deberse a otros factores como ser el nicho ecológico, factores abióticos y bióticos diferenciales.

La determinación de la variabilidad entre *M. phaseolina* en diferentes aislados es fundamental para guiar el desarrollo de estrategias apropiadas para el manejo de la enfermedad en función a las diferentes regiones geográficas, ante la no disponibilidad de datos en Paraguay con respecto a la variabilidad metabólica y fitotóxica de *M. phaseolina* este trabajo constituye la primera descripción al respecto, se requieren esfuerzos mayores para la búsqueda de un patrón más claro de comportamiento y la búsqueda exhaustiva de metabolitos en la interacción *in vivo* planta-patógeno.

5- CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demostraron que seis aislados de *Macrophomina phaseolina*, que corresponden a dos aislados de soja, tres de sésamo y el aislado de estevia poseían la capacidad de colonizar o dañar el tejido, a excepción de dos aislados FCQ53, y FCQ58 donde no se observó efecto alguno sobre el tejido foliar.

Todos los aislados de *M. phaseolina* secretaron al medio de cultivo una cantidad semejante de metabolitos, a excepción del FCQ58, aislado de soja proveniente de la localidad de María Auxiliadora- Departamento de Itapúa quien secretó la menor cantidad de moléculas; los resultados obtenidos demostraron la producción diferencial de metabolitos secundarios.

Se demostró la capacidad de secreción de moléculas con actividad fitotóxica de la mayoría de los aislados de *M. phaseolina*; observándose la aparición de lesiones necróticas en disco de hoja a excepción de FCQ51 y FCQ58 o daño a nivel de membrana inducido por cuatro de los extractos orgánicos ensayados FCQ39, FCQ26, FCQ61, FCQ63.

Se comprobó la actividad fitotóxica en discos de hoja de *Phaseolus vulgaris*, de seis de las fracciones cromatográficas obtenidas, a partir de las cuales se aisló e identificó a cuatro metabolitos previamente descritos en la literatura y aislados a partir de *M. phaseolina*: acetilfomalactona, macrofominol, asperlina e isoasperlina.

Se detectaron y cuantificaron los metabolitos en los extractos orgánicos de los diferentes aislados; detectándose macrofominol en todos los aislados, siendo mayor su producción por los aislados de soja: FCQ39, FCQ51 y FCQ53. Con respecto a los aislados FCQ60, FCQ61 y FCQ63, provenientes de cultivos de sésamo, secretaron cantidades significativas de asperlina, isoasperlina y acetilfomalactona. El aislado de *M. phaseolina* de estevia FCQ64 produjo cantidades detectables de macrofominol y asperlina, no así acetilfomalactona e isoasperlina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, Hamed K. et al. 2019. “Toxin Production in Soybean (*Glycine Max L.*) Plants with Charcoal Rot Disease and by *Macrophomina Phaseolina*, the Fungus That Causes the Disease.” *Toxins* 11(11): 1–13.
- Abed-Ashtiani, Farnaz, Abolfazl Narmani, and Mahdi Arzanlou. 2018. 57 *Phytopathologia Mediterranea* *Macrophomina Phaseolina* Associated with Grapevine Decline in Iran.
- Agrios, George N. 2004. 5 Plant Pathology *Plant Pathology*.
- Ammon, Vernon, Thomas D. Wyllie, and Merton F. Brown. 1975. “Investigation of the Infection Process of *Macrophomina Phaseolina* on the Surface of Soybean Roots Using Scanning Electron Microscopy.” *Mycopathologia* 55(2): 77–81.
- Ammon, Vernon, Thomas D Wyllie, and Merton F Brown. 1974. “An Ultrastructural Investigation of Pathological Alterations Induced by *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid in Seedlings of Soybean, *Glycine Max (L.) Merrill.*” *Physiological Plant Pathology* 4: 1–4.
- Argoudelis, AD, and JF Zieserl. 1966. “The Structure of U-13, 933, a New Antibiotic.” *Tetrahedron Letters* 18: 1969–73.
- Ashraf, Waqas, Shahbaz Talib Sahi, Imran Haq, and Sohail Ahmed. 2015. “Morphological and Pathogenic Variability among *Macrophomina Phaseolina* Isolates Associated with Maize (*Zea Mays.*” *International Journal of Agriculture and Biology* 17(5): 1037–42.
- Ayala R, N, and A L. Orrego F. 2006. “Eficiencia Del Tratamiento Químico Para El Control de La Pudrición Carbonosa Del Tallo En El Cultivo de Sésamo (*Sésamum Indicum.*)” *Investigación Agraria* 11(3): 2–5.
- Bachi, Paul. 2016. “Charcoal Rot (*Macrophomina Phaseolina*) (Tassi) Goidanich.” *Centro de Investigación y Educación de la Universidad de Kentucky.* <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5430021>.
- Baggio, Juliana S., Leandro G. Cordova, and Natalia A. Peres. 2019. *Sources of Inoculum and Survival of Macrophomina Phaseolina in Florida Strawberry Fields.*
- Baird, Richard E., Clarence E. Watson, and Mary Scruggs. 2003. “Relative Longevity of *Macrophomina Phaseolina* and Associated Mycobiota on Residual Soybean Roots in Soil.” *Plant Disease* 87(5): 563–66.
- Bandara, Ananda Y et al. 2020. “Dissecting the Economic Impact of Soybean Diseases in the United States over Two Decades.” *PLOS ONE* 15(4): 1–28. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0231141>.
- Bandara, Y.M.A.Y., D.K. Weerasooriya, S. Liu, and Christopher R Little. 2018. “The Necrotrophic Fungus *Macrophomina Phaseolina* Promotes Charcoal Rot Susceptibility in Grain Sorghum through Induced Host Cell Wall-Degrading Enzymes.” *Phytopathology* 8: 1–46.
- Bañuelos-Balandrán, José Jaime, and N Mayek-Pérez. 2008. “Evaluación No Destructiva de La Patogenicidad de *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid . En Frijol (*Phaseolus Vulgaris L .*)” *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 71–75.
- Bashir, Muhammad Rizwan. 2017. “Impact of Global Climate Change on Charcoal Rot of Sesame Caused by *Macrophomina Phaseolina.*” *Journal of Horticulture* 4(1).
- Beas-fernández, Rosalba et al. 2004. “*Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid. En Frijol (*Phaseolus Vulgaris L.*) de Aguascalientes: Relación Patogénica y Genética Con Aislamientos de Otras Regiones de México.” *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(2): 172–77.

- Bedawy, Ismail M A, and Moustafa H A Moharam. 2019. Reaction and Performance of Some Sesame Genotypes for Resistance to *Macrophomina Phaseolina*, the Incitant of Charcoal Rot Disease Reaction and Performance of Some Sesame Genotypes for Resistance to *Macrophomina Phaseolina*, the Incitant Of.
- Bellaloui, Nacer et al. 2014. "Soybean Seed Phenolics, Sugars, and Minerals Are Altered by Charcoal Rot Infection in MG III Soybean Cultivars." *Scientific Research- Food and Nutrition Sciences* 5: 1843–59.
- Benedeković, Goran et al. 2016. "New Antitumour Agents with α,β -Unsaturated δ -Lactone Scaffold: Synthesis and Antiproliferative Activity of (-)-Cleistenolide and Analogues." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 26(14): 3318–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.044>.
- Berestetskiy, A. O. 2008. "A Review of Fungal Phytotoxins: From Basic Studies to Practical Use." *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(5): 453–65.
- Bhattacharya, D., K. A. I. Siddiqui, and E Ali. 1992. "Phytotoxic Metabolites of *Macrophomina Phaseolina*." *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 22(1): 54–57.
- Bhattacharya, Dipanwita, Tarun K Dhar, and Esahak Ali. 1992. "An Enzyme Immunoassay of Phaseolinone and Its Application in Estimation of the Amount of Toxin in *Macrophomina Phaseolina*-Infected Seeds." *Applied and Environmental Microbiology* 58(6): 1970–74.
- Bhattacharya, Dipanwita, TK Dhar, KAI Siddiqui, and E Ali. 1994. "Inhibition of Seed Germination by *Macrophomina Phaseolina* Is Related to Phaseolinone Production." *Journal of Applied Bacteriology* 77: 129–33.
- Bhattacharya, Gautam, Tarun K Dhar, Kathleen Bhattacharya, and Kazi AI Siddiqui. 1987. "Mutagenic Action of Phaseolinone, a Mycotoxin Isolated from *Macrophomina Phaseolina*." *Australian Journal of Biological Sciences* 40(4): 349–53.
- Bhattacharya, Gautam, Amit K Roy, Kazi AI Siddiqui, and Ranjan Bhadra. 1990. "Phaseolinone, a New Mycotoxin, Inhibits RNA Polymerase(s) Other than RNA Polymerase II." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168(1): 51–57.
- Biswas, C et al. 2013. "A Simple Method of DNA Isolation from Jute (*Corchorus Olitorius*) Seed Suitable for PCR-Based Detection of the Pathogen *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid." *Letters in Applied Microbiology* 56(2): 105–10.
- Burkhardt, Alyssa K. et al. 2019. "Assembly, Annotation, and Comparison of *Macrophomina Phaseolina* Isolates from Strawberry and Other Hosts." *BMC Genomics* 20(1): 1–18.
- Cabedo, Nuria et al. 2007. "Isolation and Structural Elucidation of Eight New Related Analogues of the Mycotoxin (-)-Botryodiplodin from *Penicillium Coalescens*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(17): 6977–83.
- Cabrera, María G. et al. 2002. *Podredumbre Carbonosa (Macrophomina Phaseolina)*, *En Soja Sometida a Estrés Hídrico En El Nordeste de La Argentina*.
- Cardona, Wilson, Doris Guerra, and Albeiro Restrepo. 2014. "Reactivity of δ -Substituted α,β -Unsaturated Cyclic Lactones with Antileishmanial Activity." *Molecular Simulation* 40(6): 477–84. <http://dx.doi.org/10.1080/08927022.2013.822077>.
- Cervantes-García, D.;Padilla-Ramírez, JS.;Simpson, J.;Mayek-Pérez, N. 2003. "Osmotic Potential Effects on In Vitro Growth, Morphology and Pathogenicity of *Macrophomina Phaseolina*." *Phytopathology* 151: 456–62.
- Chiesa, M.A et al. 2016. 44 *Problemática de La Podredumbre Carbonosa En Soja (Glycine Max)*.

- Cohen, Roni, Meital Elkabetz, and Menahem Edelstein. 2016. "Variation in the Responses of Melon and Watermelon to *Macrophomina Phaseolina*." *Crop Protection* 85: 46–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.03.015>.
- Collinge, David B., Jonas Borch, Madriz-Ordeñana Kenneth, and Mari-Anne Newman. 2001. "The Responses of Plants to Pathogens." In *Molecular Analysis of Plant Adaptation to the Environment*, , 131–58.
- Cordero-Roa, Martha Viviana, and Raymundo Rosas-Quijano. 2013. "La Biosíntesis de Las Poliaminas En El Hongo Fitopatógeno *Macrophomina Phaseolina*." *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(1): 45–59.
- Coser, Sara M. et al. 2017. "Genetic Architecture of Charcoal Rot (*Macrophomina Phaseolina*) Resistance in Soybean Revealed Using a Diverse Panel." *Frontiers in Plant Science* 8(September): 1–12. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01626/full>.
- Crous, Pedro W et al. 2006. "Phylogenetic Lineages in the Botryosphaeriaceae." *Studies in Mycology* 55: 235–53.
- Dais, Photis, and Arthur S Perlin. 1985. "Relaxation and Related Proton Nmr Studies 'Asperlin.' Configuration and Conformation of the Epoxypropyl Side-Chain." *Canadian Journal of Chemistry* 63(5): 1009–12.
- Dhar, Tarun K, Kazi AI Siddiqui, and Esahak Ali. 1982. "Structure of Phaseolinone, a Novel Phytotoxin from *Macrophomina Phaseolina*." *Tetrahedron Letters* 23(51): 5459–62.
- Dhingra, Onkar D, and James B Sinclair. 1978. *Biology and Pathology of Macrophomina Phaseolina*.
- Diourte, M. et al. 1995. "Charcoal Rot *Macrophomina Phaseolina* Resistance and the Effects of Water Stress on Disease Development in Sorghum." *Plant Pathology* 44(1): 196–202.
- Efraín, Mynor et al. 2019. "Reaction of Lima Bean Genotypes to *Macrophomina Phaseolina*." *Summa Phytopathologica* 45(1): 11–17.
- Evans, R.H., G.A Ellested, and M.P. Kunstman. 1969. "Two New Metabolites from an Unidentified *Nigrospora* Species." *Tetrahedron Letters* 22: 1791–94.
- Flores-Giubi, Maria Eugenia, Javier Barúa Chamorro, and Jazmin Vaceque Acosta. 2016. "Evaluación Del Crecimiento y de La Fitotoxicidad de Un Aislado de *Macrophomina Phaseolina* En Medios Enriquecidos Con Infusión de Hojas de Soja." Universidad Nacional de Asuncion.
- Flores-Giubi, Maria Eugenia, Javier Barúa, and Claudia Gwynn. 2019. "Análisis Comparativo de La Produccion de Metabolitos Secundarios Por *Macrophomina Phaseolina* Aislado de Suelos Con Distintos Usos Agrícolas."
- Fonseca, Sandra, Dhanya Radhakrishnan, Kalika Prasad, and Andrea Chini. 2018. "Fungal Production and Manipulation of Plant Hormones." *Current Medicinal Chemistry* 25: 253–67.
- Fountain, Jake C. et al. 2014. "Environmental Influences on Maize-*Aspergillus Flavus* Interactions and Aflatoxin Production." *Frontiers in Microbiology* 5(FEB): 1–7.
- Fuska, J, and A Fuskova. 1976. "The in Vitro- in Vivo Effect of Antibiotic PSX-1 on Lympholeukaemia L-5178." *The Journal of Antibiotics* 29(9): 81–82.
- Fuska, J, B Proksa, and D Uhrín. 1988. "The Antibiotic PSX-1 Produced By *Penicillium Stipitatum* Is Identical with Botryodiplodin." *Folia Microbiologica* 33(3): 238–40.
- Garcete Gómez, José María, and Aida Lorenza Orrego Fuentes. 2011. "Efecto de Aislados Nativos de *Trichoderma* Spp. En La Incidencia de *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid En Sésamo (*Sesamum*

Indicum L.)” *Investi* 13(2): 87–93.

Gómez, Ana M, Beatriz López de Uralde, Serafín Valverde, and J Cristóbal López. 1997. “A Novel Entry to Naturally Occurring 5-Alkenyl α,β -Unsaturated δ -Lactones from D-Glucose: Syntheses of (+)-Acetylphomalactone and (+)-Asperlin.” *Chemical Communications* 29(1): 1647–48.

Gomez, Apollo O. et al. 2020. “Response of Strawberry Cultivars Inoculated with *Macrophomina Phaseolina* in Australia.” *International Journal of Fruit Science* 00(00): 1–14. <https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1709114>.

Gupta, Girish K, Sushil K Sharma, and Rajkumar Ramteke. 2012. “Biology, Epidemiology and Management of the Pathogenic Fungus *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid with Special Reference to Charcoal Rot of Soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill).” *Journal of Phytopathology* 160(4): 167–80.

Hayashi, Noriki, Takashi Tsuge, Hirokazu Kobayashi, and Syoyo Nishimrura. 1988. “The Presence of Double-Stranded RNAs in *Alternaria Alternata* Japanese Pear Pathotype and Their Participation in AK-Toxin Productivity.” *Japanese Journal of Phytopathology* 54(2): 250–52.

He, Long et al. 2011. “Asperlin Induces G2/M Arrest through ROS Generation and ATM Pathway in Human Cervical Carcinoma Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409(3): 489–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.032>.

Honda, Toshio, Kazuo Kanai, Yoko Tatsuzaki, and Masayoshi Tsubuki. 1990. “Enantioselective Syntheses of (+) Acetylphomalactone and (6R)-(+)- Goniotalamin from 2-Furylmethanols.” *J. Chem. Soc* (21): 1733–37.

Huda-Shakirah, Abd Rahim et al. 2019. “Identification and Characterization of *Macrophomina Phaseolina* Causing Leaf Blight on White Spider Lilies (*Crinum Asiaticum* and *Hymenocallis Littoralis*) in Malaysia.” *Mycobiology* 47(4): 408–14. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1682448>.

Islam, Md et al. 2012. “Tools to Kill: Genome of One of the Most Destructive Plant Pathogenic Fungi *Macrophomina Phaseolina*.” *BMC Genomics* 13(1): 493–508.

Ivancovich, A., C. Flores, and M. Lavilla. 2013. *Podredumbre Carbonosa de La Soja, Causada Por Macrophomina Phaseolina (Tassi) Goid., Un Hongo Oportunista Muy Dependiente Del Estrés Hídrico y Térmico*.

Jana, T K, N K Singh, K R Koundal, and T R Sharma. 2005. “Genetic Differentiation of Charcoal Rot Pathogen, *Macrophomina Phaseolina*, into Specific Groups Using URP-PCR.” *Canadian Journal of Microbiology* 51: 159–64.

Javaid, Arshad, and Amna Saddique. 2012. “Control of Charcoal Rot Fungus *Macrophomina Phaseolina* by Extracts of *Datura Metel*.” *Natural Product Research* 26(18): 1715–20.

Jones, Richard W., Suzanne Canada, and Haiyin Wang. 1998. “Highly Variable Minichromosomes and Highly Conserved Endoglucanase Genes in the Phytopathogenic Fungus *Macrophomina Phaseolina*.” *Canadian Journal of Botany* 76(4): 694–98. http://www.nrc.ca/cgi-bin/cisti/journals/rp/rp2_abst_e?cjb_b98-040_76_ns_nf_cjb76-98.

Kaur, Surinder, Gurpreet Singh Dhillon, Satinder Kaur Brar, Gary Edward Vallad, et al. 2012. “Emerging Phytopathogen *Macrophomina Phaseolina*: Biology, Economic Importance and Current Diagnostic Trends.” *Critical reviews in microbiology* 38(2): 136–51.

Kaur, Surinder, G S Dhillon, S K Brar, and V B Chauhan. 2012. “Carbohydrate Degrading Enzyme Production by Plant Pathogenic Mycelia and Microsclerotia Isolates of *Macrophomina Phaseolina* through Koji Fermentation.” *Industrial Crops & Products* 36(1): 140–48.

- Khan, Ali N. et al. 2017. "Molecular Identification and Genetic Characterization of *Macrophomina Phaseolina* Strains Causing Pathogenicity on Sunflower and Chickpea." *Frontiers in Microbiology* 8(July): 1–11.
- Koehler, A.M, and H.D. Shew. 2017. *First Report of Charcoal Rot of Stevia Caused by Macrophomina Phaseolina in North Carolina.*
- Koike, Steven T. et al. 2016. "Status of *Macrophomina Phaseolina* on Strawberry in California and Preliminary Characterization of the Pathogen." *International Journal of Fruit Science* 16(July): 148–59.
- Lago, ME. 2009. *INTA EEA Enfermedades de Tallo y Raíz En Soja.*
- Leyva-Mir, Santos G. et al. 2015. "Caracterización Morfológica y Molecular de Aislados de *Macrophomina Phaseolina* Asociados a Caña de Azúcar En México." *Revista Argentina de Microbiologia* 47(2): 143–47.
- Lira-Méndez, Krystal, Jaime Roel Salinas-García, Arturo Díaz-franco, and Netzahualcóyotl Mayek-Pérez. 2012. "Effects of Tillage , Moisture and Fertilization on the Yield of the Common Bean and the Pathogenicity of *Macrophomina Phaseolina*." *Rev. Mex. Cienc. Agríc* 3(2): 365–71.
- Lodha, Satish, and Ritu Mawar. 2020. "Population Dynamics of *Macrophomina Phaseolina* in Relation to Disease Management: A Review." *Journal of Phytopathology* 168(1): 1–17.
- Mahato, SB et al. 1987. "Structure and Stereochemistry of Phaseolinic Acid: A New Acid from *Macrophomina Phaseolina*." *Journal of Natural Products* 50(2): 245–47.
- Martínez-Hilders, Andrea, and Hernán Laurentin. 2012. "Caracterización Fenotípica Y Molecular de *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid. Proveniente de La Zona de Produccion de Ajonjolí En Venezuela." *Bioagro* 24(3): 187–96.
- Martínez-Villarreal, Rodolfo et al. 2016. "Bases Bioquímicas de La Tolerancia Al Estrés Osmótico En Hongos Fitopatógenos: El Caso de *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid." *Revista Argentina de Microbiologia* 48(4): 347–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.004>.
- Mayek-Pérez, Netzahualcóyotl et al. 2002. "Water Relations, Histopathology and Growth of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) during Pathogenesis of *Macrophomina Phaseolina* under Drought Stress." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60(4): 185–95.
- Mayek Pérez, Netzahualcóyotl, Cándido López Castañeda, and Jorge Alberto Acosta Gallegos. 1997. "Efecto Del Deficit Hidrico y Altas Temperaturas En El Desarrollo y Rendimiento de Frijol Inoculado Con *Macrophomina Phaseolina*." *Revista Mexicana de Fitopatologia* 15(2): 115–25.
- McCrurry, Patrick M, and Abe Kyo. 1973. "Stereochemistry and Synthesis of the Antileukemic Agent Botryodiplodin." *J. Amer. Chem. Soc* 95(17): 5824–25.
- Meena, B, P Indiragandhi, and R Ushakumari. 2018. "Screening of Sesame (*Sesamum Indicum* L .) Germplasm against Major Diseases." *Journal of phamacognosy and phytochemistry* SP1: 1466–68.
- Méndez-Aguilar, R, M.H Reyes-Valdés, and N Mayek-Pérez. 2013. "Avances y Perspectivas Sobre El Mapeo Genético de La Resistencia a Las Pudriciones de La Raíz En Frijol Común." *Phyton* 82: 215–26.
- Mengistu, Alemu et al. 2018. "E Ff Ect of Charcoal Rot on Selected Putative Drought Tolerant Soybean Genotypes and Yield." *Crop Protection* 105(December 2017): 90–101.
- Mihail, J.D, and S.J Taylor. 1995. "Interpreting of Variability among Isolates of *Macrophomina Phaseolina* in Patogenicity, Pycnidium Production, and Chlorate Utilization." *Canadian Journal of*

Botany 73(7): 1596-1603.

Mizuba, S., K. Lee, and J. Jiu. 1975. "Three Antimicrobial Metabolites from *Aspergillus Caespitosus*." *Canadian Journal of Microbiology* 21(11): 1781–87.

Molitor, Daniel et al. 2012. "Phenguignardic Acid and Guignardic Acid, Phytotoxic Secondary Metabolites from *Guignardia Bidwellii*." *Journal of Natural Products* 75(7): 1265–69.

Moreau, S. et al. 1981. "Botryodiplodin, a Mycotoxin Synthesized by a Strain of *P. Roqueforti*." *The Journal of Organic Chemistry* 47(12): 2358–59.

Moulé, Y, and N Darracq. 1984. "Absence of DNA Breaks during Repair of DNA-Protein Cross-Links Induced by the Mycotoxin Botryodiplodin in Mammalian Cells." *Carcinogenesis* 5(10): 1375–77.

Moulé, Y, C Douce, S Moreau, and N Darracq. 1981. "Effects of the Mycotoxin Botryodiplodin on Mammalian Cells in Culture." *Chem.-Biol. Interactions* 37: 155–64.

Moulé, Y, F Renaud, N Darracq, and C Douce. 1982. "DNA-Protein Cross-Linking by the Mycotoxin, Botryodiplodin, in Mammalian Cells." *Carcinogenesis* 3(2): 211–14.

Moulé, Yvonne, Françoise Decloitre, and Gérard Hamon. 1981. "Mutagenicity of the Mycotoxin Botryodiplodin in the *Salmonella Typhimurium*/Microsomal Activation Test." *Environmental Mutagenesis* 3(3): 287–91.

Muñoz Cabañas, María Rosa et al. 2005. "Análisis Patogénico y Genético de *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid. En Diferentes Hospedantes." *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(October): 11–18.

Nakagawa, Fumio, Kentaro Kodama, Kouhei Furuya, and Atsushi Naito. 1979. "New Strains of Botryodiplodin Producing Fungi." *Agricultural and Biological Chemistry* 43(7): 1597–98.

Negreiros, Andréia Mitsa Paiva et al. 2019. "Identification and Pathogenicity of *Macrophomina* Species Collected from Weeds in Melon Fields in Northeastern Brazil." *Journal of Phytopathology* 167(6): 326–37.

Nielsen, Mette Neiendam, Jan Sørensen, Johannes Fels, and Hans Christian Pedersen. 1998. "Secondary Metabolite- and Endochitinase-Dependent Antagonism toward Plant-Pathogenic Microfungi of *Pseudomonas Fluorescens* Isolates from Sugar Beet Rhizosphere." *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 3563–69.

Nouri, Mohamed T., Daniel P. Lawrence, Craig E. Kallsen, and Florent P. Trouillas. 2020. "Macrophomina Crown and Root Rot of Pistachio in California." *Plants* 9(2): 1–17.

Ordeñana, Kenneth Madriz. 1998. "Mecanismos de Defensa En Las Interacciones Planta-Patogeno." (63): 22–32.

Otani, Hiroshi, Keisuke Kohmoto, and Motoichiro Kodama. 1995. "Alternaria Toxins and Their Effects on Host Plants ." *Canadian Journal of Botany* 73(S1): 453–58.

Pearson, C. A.S;Schwenk, F.W;Crowe F.J. 1984. "Colonization of Soybean Roots by *Macrophomina Phaseolina*." *Plant Disease* 68(12): 1086.

Popović, Tatjana et al. 2017. "A Blight Disease on Highbush Blueberry Associated with *Macrophomina Phaseolina* in Serbia." *Canadian Journal of Plant Pathology* 0(0). <http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2017.1415977>.

Prell, Hermann, and Peter Day. 2001a. "Basic Compatibility: The Colonization of Host Plants by Pathogenic Fungi." In *Plant-Fungal Pathogen Interaction*, ed. Springer-Verlag Berlin. Plant- Fungal

pathogen interaction, 52–56.

———. 2001b. “Phytotoxins: The Weapons of Necrotrophic Phytopathogenic Fungi.” In *Plant-Fungal Pathogen Interaction*, , 57–69.

Pusztahelyi, Tünde, Imre J Holb, and István Pócsi. 2015. “Secondary Metabolites in Fungus-Plant Interactions.” *Frontier in plant Science* 6: 1–23.

Radwan, Osman, Laura V Rouhana, Glen L Hartman, and Schuyler S Korban. 2014. “Genetic Mechanisms of Host-Pathogen Interactions for Charcoal Rot in Soybean.” *Plant Molecular Biology Reporter* 32(3): 617–29.

Ramezani, Mohammad et al. 2007. “Soybean Charcoal Rot Disease Fungus *Macrophomina Phaseolina* in Mississippi Produces the Phytotoxin (-)-Botryodiplodin but No Detectable Phaseolinone.” *Journal of Natural Products* 70(1): 128–29.

Ramiez Ferreira, Y.C, and A.L Orrego Fuente. 2008. 10 Investigación Agraria *EFICIENCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE Macrophomina Phaseolina EN SOJA (Glycine Max. (L.)MERRIL.)*.

Ramos, Araceli M. et al. 2016. “Crecimiento in Vitro y Producción de Enzimas Degradadoras de Pared Celular Vegetal de Aislamientos Argentinos de *Macrophomina Phaseolina*, Agente Causal de La Podredumbre Carbonosa En Maíz.” *Revista Argentina de Microbiología* 48(4): 267–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.002>.

Reyes-Franco, M.C et al. 2006. “Pathogenic and Genetic Variability within *Macrophomina Phaseolina* from Mexico and Other Countries.” *Journal of Phytopathology* 154(7–8): 447–53.

Rezniko, Sebastian et al. 2018. “Soybean- *Macrophomina Phaseolina* -Specific Interactions and Identification of a Novel Source of Resistance.” *Phytopathology* 109(1): 63–73.

Reznikov, Sebastian et al. 2013. “Importancia de La Podredumbre Carbonosa de La Soja En El Noroeste Argentino Durante Las Campañas 2010/2011, 2011/2012 y 2012/2013.” *Sanidad Vegetal* (September): 181–83.

Reznikov, Sebastian, and Victoria Gonzalez. 2014. “Estudio de La Virulencia En Soja de Diferentes Aislados de *Macrophomina Phaseolina* Bajo Condiciones Controladas.” *American Phytopathological Society* (July 2017): 3–4.

Romero, Luna, Martha P. et al. 2017. “Advancing Our Understanding of Charcoal Rot in Soybeans.” *Journal of Integrated Pest Management* 8(1): 1–8.

Rueden, Curtis T et al. 2017. “ImageJ2: ImageJ for the next Generation of Scientific Image Data.” *BMC Bioinformatics* 18(1): 1–26.

Saravanakumar, Kandasamy et al. 2016. “Synergistic Effect of Trichoderma-Derived Antifungal Metabolites and Cell Wall Degrading Enzymes on Enhanced Biocontrol of *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Cucumerinum*.” *Biological Control* 94: 37–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.001>.

Sarkar, Tuhin Subhra, Pranjal Biswas, Subrata Kumar Ghosh, and Sanjay Ghosh. 2014. “Nitric Oxide Production by Necrotrophic Pathogen *Macrophomina Phaseolina* and the Host Plant in Charcoal Rot Disease of Jute: Complexity of the Interplay between Necrotroph-Host Plant Interactions.” *PLOS ONE* 9(9).

Scharf, Daniel H., Thorsten Heinekamp, and Axel A Brakhage. 2014. “Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites.” *PLOS Pathogens* 10(1): 10–12.

Scheffer, R.P., and S.P. Briggs. 1981. “Introduction: A Perspective of Toxin Studies in Plant

Pathology.” In *Toxins in Plant Disease*, , 1–20.

Sexton, Zachary F, Teresa J Hughes, and Kiersten A Wise. 2016. “Analyzing Isolate Variability of *Macrophomina Phaseolina* from a Regional Perspective.” *Crop Protection* 81: 9–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.11.012>.

Short, G. E., T.D. Wyllie, and V.D. Ammon. 1978. “Quantitative Enumeration of *Macrophomina Phaseolina* in Soybean Tissues.” *Phytopathology* 68(5): 736–41.

Siddiqui, K. A.I., A. K. Gupta, A. K. Paul, and A. K. Banerjee. 1979. “Purification and Properties of a Heat-Resistant Exotoxin Produced by *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid in Culture.” *Experientia* 35(9): 1222–23.

Slippers, B. et al. 2013. “Phylogenetic Lineages in the Botryosphaeriales: A Systematic and Evolutionary Framework.” *Studies in Mycology* 76: 31–49. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0020>.

SOYSTATS. 2019. *American Soybean Association*. <http://soystats.com/international-world-oilseed-production>.

Su, G., S.O. Suh, R.W. Schneider, and J.S Russin. 2001. “Host Specialization in the Charcoal Rot Fungus *Macrophomina Phaseolina*.” *The American Phytopathological Society* 91(2): 120–26. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2001.91.2.120>.

Trigos, Angel, Silvia Reyna, Beatriz Matamoros, and G Gonzalez. 1995. “Macrophominol a Diketopiperazine from Cultures of *Macrophomina Phaseolina*.” *Pergamon* 40(6): 1697–98.

Türkkan, Muharrem et al. 2019. “First Report of Charcoal Rot Caused by *Macrophomina Phaseolina* on Kiwifruit in Turkey.” *Journal of Plant Pathology*: 42161.

Vibha. 2016. *Macrophomina Phaseolina : The Most Destructive Soybean Fungal Pathogen*.

Vijaya Kumar, T., K. Suresh Babu, and J. Madhusudana Rao. 2012. “A Simple and Efficient Stereoselective Synthesis of (-)-Cleistenolide.” *Tetrahedron Letters* 53(14): 1823–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.01.123>.

Wagan, Khadim Hussain, Muhammad Ibrahim Khaskheli, Jamal U.Ddin Hajano, and Abdul Ghani Lanjar. 2019. “Population Density and Aggressiveness of *Macrophomina Phaseolina* Isolates from Sindh, Pakistan.” *Sarhad Journal of Agriculture* 35(2): 400–407.

Williams-Alanís, Héctor et al. 2009. “Reacción de Variedades de Sorgo [*Sorghum Bicolor* (L .) Moench] Para Grano a *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid.” *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(2): 148–55.

Wilson, Cardona G., and Saez V. Jairo. 2011. “Antiprotozoal Activity of α,β -Unsaturated δ -Lactones: Promising Compounds for the Development of New Therapeutic Alternatives.” *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10(5): 671–80.

Wrather, A et al. 2010. *Plant Management Network Effect of Diseases on Soybean Yield in the Top Eight Producing Countries in 2006 Plant Health Progress Plant Health Progress*.

Yesil, Serkan, and Kubilay Kurtulus Bastas. 2016. “Genetic Variability of *Macrophomina Phaseolina* Isolates from Dry Beans in Turkey.” *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 4(4): 305–12.

Živanov, D. et al. 2019. “First Report of *Macrophomina Phaseolina* Causing Dry Root Rot of Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) in Serbia.” *Plant Disease* 103(6): 42161.

ANEXOS**Anexo 1: Curvas de Calibración para los compuestos Purificados.****Anexo 2: Espectros de Resonancia de los compuestos Purificados.**