



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE  
METABOLITOS ANTIFÚNGICOS SINTETIZADOS POR  
*Amycolatopsis* sp. BX17**

---

Por:

**Héctor García López**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Héctor García López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



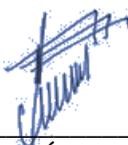
---

Dra. Rosina Cabrera Ruiz  
Directora de Tesis



---

M.C. María del Refugio Robles Burgueño  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. María de los Ángeles Mendoza  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. José Ángel Huerta Ocampo  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Aislamiento y Caracterización Química de Metabolitos Antifúngicos Sintetizados por *Amycolatopsis* sp. BX17” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Héctor García López, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en sus instalaciones.

Al Proyecto de Cátedras CONACyT 476: Interacciones en el Microbioma de Milpa: Composición, Comunicación y Dinámica, del cual forma parte la investigación desarrollada en la presente Tesis. Asimismo, al Proyecto 296368: Operación del Consorcio CIDEA 2018-2020.

A mi directora de tesis, la Dra. Rosina Cabrera Ruiz, por su invaluable apoyo, dedicación y confianza proporcionada durante la realización del presente trabajo de investigación. Por su calidad humana y el trato recibido desde mi llegada al laboratorio.

A mi comité de tesis, la M.C. María del Refugio Robles Burgueño, el Dr. José Ángel Huerta Ocampo y la Dra. María de los Ángeles Mendoza, por su apoyo, colaboración y aporte de conocimientos para la elaboración del presente trabajo.

Al Laboratorio de Toxicología de Plaguicidas de la Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar, por todas las facilidades que me brindaron para la realización de mi trabajo. Asimismo, a la M.C. María de Lourdes Gutiérrez Coronado, M.C. Patricia Grajeda Cota y M.C. Zoe Navarro Apodaca, por el apoyo otorgado y los gratos momentos de convivencia en el laboratorio.

Al Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Glicanos de la Dra. Luz Vázquez Moreno, por las facilidades que me concedieron para la elaboración de mi trabajo experimental. A la M.C. Ana María Guzmán Partida, por su disposición y apoyo.

Al laboratorio de Microbiología Polifásica y Bioactividades del Dr. Alfonso García Galaz, por el espacio facilitado para la realización del presente proyecto.

Al M.C. Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña, M.C. Jesús Antonio Orozco Avitia y M.C. Consuelo Guadalupe Corrales Maldonado, por su valioso apoyo para la elaboración del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y amigos de la maestría, Michel, Sharon, Abel, Daniel, Martín, Melissa, Jannel, Jhosep, Carlos, Jorge, Leo, Oscar, Antonio y Giovanna, por hacer de mi estadía en Hermosillo una experiencia muy grata.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá, papá y hermanas, sin ellos no sería quien soy.

A mi tío Manuel.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARATORIA INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1. Microbioma del Suelo .....	15
2.2. Biología del Phylum Actinobacteria .....	16
2.2.1. Importancia Biotecnológica de las Actinobacterias.....	17
2.3. Características Generales del Género <i>Amycolatopsis</i> .....	18
2.3.1. Ecología de las Cepas de <i>Amycolatopsis</i> .....	19
2.4. Metabolismo del Género <i>Amycolatopsis</i> para la Biosíntesis de Metabolitos Primarios y Secundarios .....	20
2.4.1. Compuestos Antifúngicos Sintetizados por el Género <i>Amycolatopsis</i> .....	24
2.4.2. Compuestos Antifúngicos Producidos por <i>Amycolatopsis</i> para el Control Biológico de Hongos Fitopatógenos .....	26
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	29
4.1. Objetivo General.....	29
4.2. Objetivos Específicos .....	29
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
5.1. Cepas Microbianas .....	30
5.2. Bioensayo de Antagonismo <i>ex situ</i> en Plantas de Maíz ( <i>Zea mays</i> L.) .....	30
5.3. Diseño de Sistema de Cultivo Para la Recuperación de los Metabolitos Antifúngicos Secretados por <i>Amycolatopsis</i> BX17.....	31
5.4. Perfil Antagónico de <i>Amycolatopsis</i> sp. BX17 .....	32
5.5. Cultivo de <i>Amycolatopsis</i> BX17 y Extracción de Metabolitos Extracelulares .....	33
5.5.1. Evaluación de Actividad Antifúngica de los Extractos .....	33
5.6. Extracción Metanólica de Metabolitos Antifúngicos .....	34
5.7. Perfil Global de Metabolitos Extracelulares de <i>Amycolatopsis</i> BX17 .....	34

## CONTENIDO (continuación)

5.7.1. Identificación de Compuestos Antifúngicos Mediante Análisis por Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS) Dirigido .....	37
5.8. Análisis de Datos .....	37
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
6.1. Antagonismo de <i>Amycolatopsis</i> sp. BX17 Contra la Infección por <i>Fusarium graminearum</i> RH1 en Plantas de Maíz .....	38
6.2. Actividad Antifúngica de los Metabolitos Secretados por <i>Amycolatopsis</i> sp. BX17.....	39
6.3. Cinética de Crecimiento y Perfil Antagónico de <i>Amycolatopsis</i> BX17 .....	40
6.4. Extracción de Metabolitos Secretados por <i>Amycolatopsis</i> BX17 .....	42
6.5. Actividad Antifúngica de los Extractos Obtenidos .....	44
6.6. Perfil Global de Metabolitos Extracelulares de <i>Amycolatopsis</i> BX17 .....	46
6.7. Identificación de Compuestos Antifúngicos Mediante Análisis por Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS) Dirigido .....	52
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>63</b>
<b>9. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>64</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>65</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>72</b>
11.1. Compuestos Identificados en Polaridad ESI W (+).....	72
11.2. Compuestos Identificados en Polaridad ESI W (-).....	76

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Beneficios de la interacción planta-Actinobacterias .....	17
2	Visión general de la síntesis de equinosporina en <i>S. erythraeus</i> por la vía del shikimato .....	23
3	Compuestos antifúngicos producidos por cepas del género <i>Amycolatopsis</i> .....	25
4	Efecto de la inoculación con la cepa <i>Amycolatopsis</i> BX17 sobre la infección en plantas de maíz por <i>Fusarium graminearum</i> RH .....	39
5	Actividad antifúngica de metabolitos extracelulares secretados por <i>Amycolatopsis</i> BX17 contra <i>Fusarium graminearum</i> RH1 .....	40
6	Porcentaje de inhibición de los compuestos secretados por <i>Amycolatopsis</i> BX17 sobre el crecimiento de <i>F. graminearum</i> RH1 .....	41
7	Crecimiento de <i>F. graminearum</i> RH1 en el agar conteniendo los metabolitos secretados por <i>Amycolatopsis</i> BX17 con respecto al control (agar sin metabolitos) .....	42
8	Espectro de absorción infrarroja de los extractos obtenidos .....	44
9	Actividad antifúngica de los extractos obtenidos con solventes de distinta polaridad .....	45
10	Actividad antifúngica del extracto metanólico .....	46
11	Cromatograma típico de iones totales comparativo entre las muestras R1, R2 y R3 en modo ESI W (+) .....	48
12	Cromatograma típico de iones totales comparativo entre las muestras R1, R2 y R3 en modo ESI W (-) .....	49
13	Perfil de abundancia de la posible identificación de Equinosporina .....	53
14	Cromatograma de iones extraídos y espectro de masas de la posible identificación de la Equinosporina .....	54
15	Espectro de masas de la posible identificación de la Equinosporina .....	55

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Metabolitos secundarios sintetizados por cepas del género <i>Amycolatopsis</i> .....	22
2	Condiciones del análisis MS <sup>E</sup> .....	36
3	Rendimiento y características de los extractos obtenidos .....	43
4	Compuestos con actividad biológica identificados en polaridad ESI (+) .....	50
5	Compuestos con actividad biológica identificados en polaridad ESI (-) .....	51
6	Posible antifúngico identificado mediante el análisis MS <sup>E</sup> , modo ESI W (+) .....	52

## RESUMEN

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos representan la principal amenaza económica en la agricultura a nivel mundial. Ante este escenario, los fungicidas químicos se han utilizado ampliamente. Sin embargo, su uso excesivo provoca estragos en el entorno. Por lo que surge la necesidad de buscar métodos alternativos sustentables para el control biológico de dichas enfermedades. En el grupo de trabajo se cuenta con la cepa de *Amycolatopsis* sp. BX17, aislada de suelos de milpa y la cual mostró actividad antagonica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum* RH1. El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad antifúngica e identificar los metabolitos secretados por *Amycolatopsis* sp. BX17. Se evaluó la capacidad de *Amycolatopsis* BX17 para controlar a *F. graminearum* RH1 mediante experimentos *ex situ* en plantas de maíz. Posteriormente, se diseñó un sistema de cultivo para recuperar los metabolitos secretados por la cepa BX17 y se evaluó su perfil antagonico. A continuación, se realizó la extracción secuencial de los metabolitos antifúngicos y se evaluó la actividad de los extractos obtenidos. Finalmente, se determinó el perfil global de metabolitos extracelulares de la cepa BX17 mediante análisis metabolómico y se realizó un análisis por espectrometría de masas dirigido para la identificación de compuestos antifúngicos. Los resultados indican que *F. graminearum* RH1 afectó los parámetros biométricos (altura y peso fresco) de las plantas de maíz ( $p \leq 0.05$ ) y ocasionó necrosis en las raíces; estos daños fueron prevenidos por *Amycolatopsis* BX17. Respecto al perfil de antagonismo, se observó que los metabolitos (<3 kDa) secretados por la bacteria después de 48 h de crecimiento, inhibieron 100% el desarrollo del hongo. Por otra parte, el extracto metanólico mostró el mayor porcentaje de inhibición ( $p \leq 0.05$ ), indicando que los metabolitos con actividad antifúngica se recuperaron utilizando metanol como solvente de extracción. El perfil global de metabolitos reveló la identificación de 72 compuestos. Entre los metabolitos hallados se encuentran los antibióticos tobramicina, neomicina B, tetronasina, blasticidina S y aframodial. Asimismo, se encontraron compuestos utilizados como aditivos alimentarios, fármacos y la hormona vegetal ácido indolacético. El análisis MS/MS dirigido indicó que la cepa BX17 posiblemente está sintetizando el antifúngico equinosporina. *Amycolatopsis* sp. BX17 ejerce un efecto protector *ex situ* en las plantas de maíz contra la infección por *F. graminearum* RH1. La posible identificación

de la equinosporina, indica que la cepa BX17 sintetiza al menos un tipo de molécula responsable del efecto antagónico sobre el hongo fitopatógeno.

**Palabras clave:** Compuestos antifúngicos; Biocontrol; Hongos fitopatógenos.

## ABSTRACT

Plant diseases caused by fungi represent the main economic threat to agriculture worldwide. Against this background, chemical fungicides have been widely used. However, their excessive use wreaks havoc on the environment. Therefore, there is a need to seek alternative sustainable methods for the biological control of these diseases. In the work group, there is a strain of *Amycolatopsis* sp. BX17, isolated from milpa soils and which showed antagonistic activity against the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum* RH1. The aim of this work was to evaluate the antifungal activity and identify the metabolites secreted by *Amycolatopsis* sp. BX17. It was evaluated the capacity of *Amycolatopsis* BX17 to control *F. graminearum* RH1 through *ex situ* experiments in maize plants. Later, it was designed a cultivation system to recover the metabolites secreted by strain BX17 and it was evaluated its antagonistic profile. Then, it was carried out the sequential extraction of the antifungal metabolites and the activity of the obtained extracts was evaluated. Finally, it was determined the global profile of extracellular metabolites of strain BX17 by metabolomic analysis and it was carried out a directed mass spectrometry analysis for the identification of antifungal compounds. Results indicate that *F. graminearum* RH1 affected biometric parameters (height and fresh weight) of maize plants ( $p \leq 0.05$ ) and caused necrosis in roots; these damages were prevented by *Amycolatopsis* BX17. Regarding the antagonism profile, it was observed that the metabolites (<3 kDa) secreted by bacteria after 48 h of growth, inhibited 100% the development of the fungus. On the other hand, the methanolic extract showed the highest percentage of inhibition ( $p \leq 0.05$ ), indicating that the metabolites with antifungal activity were recovered using methanol as extraction solvent. The global metabolite profile revealed the identification of 72 compounds. Among the metabolites found are the antibiotics tobramycin, neomycin B, tetronasin, blasticidin S and aframodial. Also, compounds used as food additives, drugs and the vegetable hormone indolacetic acid were found. Directed MS/MS analysis indicated that strain BX17 is possibly synthesizing the echinosporin antifungal. *Amycolatopsis* sp. BX17 exerts an *ex situ* protective effect in maize plants against *F. graminearum* RH1 infection. The possible identification of echinosporin, indicates that strain BX17 synthesizes at least one type of molecule responsible for the antagonistic effect on the phytopathogenic fungus.

**Key words:** Antifungal metabolites; Biocontrol; Phytopathogenic fungus.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos representan la principal amenaza ecológica y económica en la agricultura a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012; Doehlemann *et al.*, 2017). Ante este escenario, los fungicidas químicos se han utilizado ampliamente. Sin embargo, su uso excesivo ha provocado afectaciones en la salud humana, contaminación ambiental y desarrollo de resistencia a los fungicidas en los microorganismos plaga (Aktar *et al.*, 2009; Foley *et al.*, 2005; Prapagdee *et al.*, 2008). Debido a lo anterior, es importante buscar métodos alternativos sustentables que permitan el control biológico de dichas enfermedades, por lo que el uso de antagonistas naturales emerge como una opción factible.

En la búsqueda de nuevos compuestos de interés agrícola, los microorganismos del suelo desempeñan un papel preponderante. Particularmente las actinobacterias, un grupo de bacterias filamentosas conocidas por su capacidad para producir diversos compuestos bioactivos (Barka *et al.*, 2016; Hamedi *et al.*, 2017). Se ha descrito que algunas cepas de este grupo bacteriano son capaces de inhibir el crecimiento de fitopatógenos en la rizósfera. Asimismo, favorecen el desarrollo de los cultivos agrícolas participando en el reciclaje de la materia orgánica, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos y fitohormonas (Bhatti *et al.*, 2017; van der Meij *et al.*, 2017). Dentro de las actinobacterias, el género *Amycolatopsis* se ha posicionado como un importante productor de compuestos bioactivos (Kumari *et al.*, 2016; Tan y Goodfellow, 2012). Sin embargo, la mayor parte de los metabolitos obtenidos a partir de este género son de uso clínico, mientras que son escasos los reportes acerca de compuestos bioactivos que puedan aplicarse en la agricultura.

Hasta el momento se han descrito seis cepas de *Amycolatopsis* productoras de metabolitos antifúngicos. Beemelmans y colaboradores (2017), reportaron que *Amycolatopsis* sp. M39 produce las macrotermicinas A y C, dos compuestos con actividad contra el hongo *Pseudoxylaria* sp. Por otra parte, *Amycolatopsis* sp. K16-0194, produce la dipirimicina A, un metabolito que antagoniza el crecimiento de *Candida albicans* y *Mucor racemosus* (Izuta *et al.*, 2018). Asimismo, se describió que *Amycolatopsis* sp. IRD, produce la pradimicina-IRD, un compuesto utilizado para el tratamiento de micosis oportunistas (Bauermeister *et al.*, 2018; Walsh y Giri, 1997). Dentro de las cepas de *Amycolatopsis* productoras de antifúngicos, tres sintetizan compuestos con capacidad

para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Las octacosamicinas A y B, obtenidas de *Amycolatopsis azurea* MG398-hf9, inhiben el crecimiento de *Pyricularia oryzae* y *Helminthosporium oryzae*, hongos patógenos del arroz (Dobashi *et al.*, 1988). Mientras que las equinosporinas producidas por *Amycolatopsis* YIM PH20520, presentan actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria panax* y *Phoma herbarum*, hongos patógenos del *Panax notoginseng* (Xu *et al.*, 2019). Finalmente, la 2-fenilacetamida y la 2-carbamoil-3-hidroxi-1,4-naftoquinona, producidas por *Amycolatopsis* sp. YIM 130687, inhiben el crecimiento de *F. graminearum* y *Botrytis cinerea*, hongos patógenos de cereales y vid, respectivamente (Liu *et al.*, 2020).

En el grupo de investigación se cuenta con la cepa de *Amycolatopsis* sp. BX17, aislada de suelos de milpa que ha mostrado actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum* RH1 (Cabrera *et al.*, 2020). Sin embargo, hasta el momento se desconoce la naturaleza química de los compuestos antifúngicos que secreta esta actinobacteria. Por lo que el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antifúngica e identificar los metabolitos secretados por *Amycolatopsis* sp. BX17.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Microbioma del Suelo

El suelo es un cuerpo natural, formado en la superficie terrestre como resultado de complejos procesos bioquímicos y físicos, es pues, producto de la transformación de compuestos minerales y orgánicos bajo la influencia de procesos naturales controlados por el clima, la topografía, los organismos y el material parental (Bhattacharyya y Pal, 2015). Dependiendo el contexto, la palabra “suelo” puede tener distintos significados, pero en un concepto general, el suelo es el material en que crecen las plantas y les proporciona soporte físico, agua y nutrientes (Nortcliff *et al.*, 2011).

Respecto a sus componentes, el suelo está formado de cinco elementos principales: aire, agua, minerales, materia orgánica, y macro- y microorganismos, todos los cuales funcionan como un conjunto e interactúan estrechamente. Además, las plantas y animales que crecen y mueren dentro y sobre el suelo son degradados por los microorganismos e incorporados en forma de materia orgánica (FAO, 1996). Todos estos procesos naturales que ocurren en el suelo determinan la disponibilidad de nutrientes y agua para la productividad agrícola (Bot y Benites, 2005).

Los microorganismos, como componente del suelo, constituyen una parte importante de la biodiversidad y desempeñan un papel fundamental en diversos procesos ecológicos como la mineralización de la materia orgánica y el ciclo del carbono y nitrógeno; además, brindan protección a las plantas contra el estrés biótico y abiótico (Chen *et al.*, 2019). Los microorganismos se encuentran organizados e interactúan en complejas comunidades microbianas conformando el microbioma del suelo. La distribución de estas comunidades puede alterarse por las propiedades del suelo, el tipo de plantas y los exudados de sus raíces, así como la temperatura, las precipitaciones y las condiciones climáticas (Lin *et al.*, 2019; Sergaki *et al.*, 2018). Las actividades humanas, como las prácticas agrícolas convencionales, inducen la degradación del suelo, causando el declive de la diversidad microbiana benéfica (Singh, 2015). Diversos estudios han reportado a las actinobacterias como el segundo grupo microbiano más abundante en el suelo, solo después de las proteobacterias. Otros grupos bacterianos abundantes en el suelo son las acidobacterias y los bacteroidetes (Lin *et al.*, 2019; Baldrian *et al.*, 2012).

## 2.2. Biología del Phylum Actinobacteria

Como parte del componente microbiano benéfico del suelo se encuentran las actinobacterias, un amplio grupo de bacterias filamentosas pertenecientes al phylum Actinobacteria. Algunos de los géneros más representativos de este grupo son *Streptomyces*, *Nocardia*, *Frankia*, *Micromonospora*, *Amycolatopsis* y *Rhodococcus* (Ludwing *et al.*, 2012). Los miembros de este taxón se caracterizan por crecer en forma de hifas ramificadas; característica que les confirió su nombre, el cual deriva de las palabras griegas aktis o aktin (rayo) y mukos (hongo) (Barka *et al.*, 2016).

Las actinobacterias son organismos Gram-positivos, con alto contenido de guanina y citosina en su genoma (>55%) y pared celular rígida por la presencia de ácido murámico. Además, son aerobias y quimio-organótrofas, habitualmente crecen en ambientes con pH neutro y generalmente son mesófilas. Respecto a su morfología, son organismos fenotípicamente diversos, extendiéndose desde cocos, bacilos cortos, micelio fragmentado en cocos y elementos similares a bacilos, hasta micelios ramificados y altamente diferenciados. La mayoría de los géneros son capaces de formar esporas que pueden estar organizadas en cadenas o vesículas (Goodfellow, 2012; Goodfellow, 1983).

Con relación a su distribución, las actinobacterias son ubicuas y forman poblaciones estables y persistentes en varios ecosistemas, principalmente en el suelo donde constituyen un componente significativo de la población microbiana con recuentos en el orden de  $10^6$  a  $10^9$  células por gramo; predominando el género *Streptomyces* con más del 95% de las actinobacterias presentes en este ambiente (Barka *et al.*, 2016). La mayoría de las cepas son saprófitas estrictas, pero algunas forman asociaciones parasitarias o mutualistas con plantas y animales (Goodfellow, 1983). En este contexto, se sabe que en el ecosistema del suelo las actinobacterias proveen de beneficios a las plantas (Figura 1). Por ejemplo, algunas cepas de actinobacterias son capaces de inhibir el crecimiento de organismos fitopatógenos en la rizósfera. Además, pueden producir sideróforos y fitohormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas, contribuyendo así al efecto promotor del crecimiento que las actinobacterias ejercen en las plantas. Adicionalmente, las actinobacterias participan en el reciclaje de la materia orgánica mediante la producción de enzimas extracelulares que degradan mezclas complejas de polímeros como la quitina y la celulosa. Asimismo, algunas cepas poseen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, favoreciendo así la disponibilidad de

nutrientes necesarios para el desarrollo adecuado de las plantas (Bhatti *et al.*, 2017; van der Meij *et al.*, 2017). De manera interesante, se ha observado que los nutrientes presentes en los exudados de las plantas como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y metabolitos secundarios pueden ser utilizados por las actinobacterias como fuente de carbono y energía. Lo anterior indica una estrecha relación entre las plantas y actinobacterias (Baudoin *et al.*, 2003; Steinauer *et al.*, 2016).

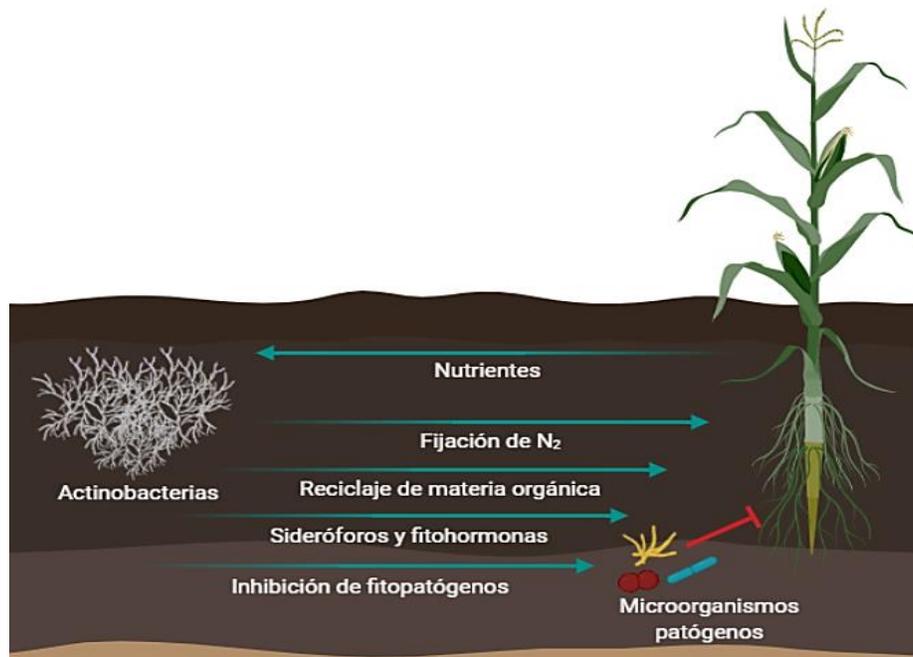


Figura 1. Beneficios de la interacción planta-Actinobacterias.

### 2.2.1. Importancia Biotecnológica de las Actinobacterias

El potencial metabólico de las actinobacterias ha generado gran interés desde una perspectiva biotecnológica debido a su capacidad para producir diversos compuestos bioactivos utilizados en el área médica, industrial, agrícola y ambiental. Hasta el año 2017 se conocían alrededor de 16 000 compuestos bioactivos producidos por actinobacterias, siendo *Streptomyces* el principal género productor con aproximadamente 12 400 compuestos. Del total de metabolitos, 14 500 corresponden a antibióticos (Hamedi *et al.*, 2017).

Dentro de los metabolitos secundarios de importancia médica producidos por actinobacterias se

encuentran antibióticos, antifúngicos, antivirales, anticancerígenos, anticolesterolémicos, antitumorales e inmunosupresores (Barka, *et al.*, 2016). En la industria, las actinobacterias son fuente importante de enzimas extracelulares como proteasas, amilasas, celulasas, lipasas y quitinasas. Además, algunas cepas se utilizan para la producción de ácidos orgánicos, así como en procesos de biotransformación y para la obtención de biocombustibles (Hamedi *et al.*, 2017). En la agricultura estos organismos son relevantes por su potencial para inhibir el crecimiento de patógenos de plantas, por estimular el crecimiento vegetal y por la producción de herbicidas e insecticidas (Bhatti *et al.*, 2017). En este contexto, se han realizado diversos estudios sobre el efecto antifúngico de las actinobacterias. Dentro de los microorganismos fitopatógenos que las actinobacterias son capaces de antagonizar se encuentran especies de *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Gibberella*, *Mucor*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Sclerotinia*, entre otros (Barka *et al.*, 2016; Hamedi *et al.*, 2017; Quiñones-Aguilar *et al.*, 2016).

Es importante destacar que además de *Streptomyces*, otros géneros como *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* y *Actinoplanes* son importantes productores de compuestos bioactivos (Goodfellow, 2012; Solanki *et al.*, 2008). Además, las secuencias del genoma de algunas actinobacterias indican que hasta el 90% del potencial químico de estos organismos permanece sin descubrir, por lo que actualmente se indaga en mecanismos que induzcan la producción de estos metabolitos secundarios (Abdelmohsen *et al.*, 2015; Barka *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2010). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas cepas con capacidad para producir compuestos bioactivos puede contribuir al descubrimiento de metabolitos con actividades biológicas novedosas (Hill *et al.*, 2011).

### 2.3. Características Generales del Género *Amycolatopsis*

El género *Amycolatopsis* corresponde a la familia *Pseudonocardaceae*, orden *Pseudonocardiales*, uno de los 16 taxones en los que se divide la clase *Actinobacteria* (Ludwing *et al.*, 2012). Las cepas de este género son Gram-positivas, aerobias o anaerobias facultativas, no ácido-alcohol resistentes, no móviles, catalasa-positivas y generalmente mesófilas. Se desarrollan adecuadamente en

ambientes con pH 6.5 a 7.5, pero son capaces de crecer en rangos de pH de entre 5.0 y 10.0. Respecto a su morfología, las especies de este género forman micelio de sustrato y micelio aéreo, ambos ramificados y ocasionalmente fragmentados en elementos cuadrangulares y bacilares. El micelio aéreo de *Amycolatopsis* puede desarrollar esporas de forma elipsoidal o cuadrangular, y generalmente se organizan en cadenas (Tan y Goodfellow, 2012).

Hasta el año 2021 se han reportado 82 especies de *Amycolatopsis* con nombres válidamente publicados (<https://lpsn.dsmz.de/genus/amycolatopsis>). Cuando los aislados de *Amycolatopsis* son cultivados en el laboratorio utilizando medios de cultivo estándar para actinobacterias, forman colonias bien desarrolladas y presentan abundante micelio de sustrato y aéreo, ambos micelios pueden presentar distintas tonalidades. Además, suelen producir pigmentos difusibles en el medio. *Amycolatopsis* crece adecuadamente en agar Bennett modificado suplementado con manitol (0.5% p/v) y harina de soya (0.5% p/v), así como en agar nutritivo, agar glucosa-asparagina, agar mineral de caseína y agar HV. Generalmente tienen un periodo de incubación de 14 días a 28 °C (Tan y Goodfellow, 2012; Tan *et al.*, 2006).

### **2.3.1. Ecología de las Cepas de *Amycolatopsis***

Las especies del género *Amycolatopsis* se distribuyen ubicuamente, pero la mayoría de los miembros han sido aislados del suelo y material vegetal. También se han encontrado en hábitats acuáticos, fuentes clínicas, suelos desérticos, regiones polares y en asociaciones mutualistas con plantas e insectos (Adamek *et al.*, 2018; Okoro *et al.*, 2009; Tan y Goodfellow, 2012). Aunque el papel que desempeñan los miembros de este género en los ambientes donde se han encontrado no se ha estudiado a profundidad; existe evidencia de que *Amycolatopsis* está implicada en procesos de biorremediación, bioconversión, biodegradación y antibiosis (Dávila y Amoroso, 2014). Respecto a su patogenicidad, hasta el momento se conocen únicamente cuatro especies con propiedades patógenas. Tres se aislaron de lesiones en placentas equinas y una más se obtuvo de la mucosa palatofaríngea infectada de un paciente humano de edad avanzada (Huang *et al.*, 2004; Labeda *et al.*, 2003).

## 2.4. Metabolismo del Género *Amycolatopsis* Para la Biosíntesis de Metabolitos Primarios y Secundarios

En actinobacterias, la regulación del metabolismo primario refleja su adaptación para sobrevivir en condiciones limitadas de nutrientes, esto debido a los sistemas catabólicos de carbohidratos y nitrógeno bien coordinados que permiten la utilización eficiente de los recursos del medio para mantener el crecimiento y generar biomasa (Genilloud, 2017). Estudios proteómicos en *Amycolatopsis* han revelado que las proteínas más abundantes están relacionadas con el metabolismo central del carbono, metabolismo de aminoácidos y biosíntesis de proteínas (Gallo *et al.*, 2010a). Adicionalmente, se ha reportado que en *Amycolatopsis*, al igual que en otras actinobacterias, la regulación positiva de las enzimas del metabolismo central del carbono conduce a una mayor disponibilidad de NAD(P)H, FADH<sub>2</sub>, GTP y ATP, así como de intermediarios del metabolismo primario. Como ejemplo de esto último, se puede mencionar el requerimiento de piruvato y acetil-CoA, de la glucólisis, eritrosa-4-fosfato, de la vía de las pentosas fosfato y alfa-cetoácidos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para rutas anabólicas como la biosíntesis de aminoácidos (Gallo *et al.*, 2010b).

Además de producir energía, el metabolismo primario proporciona no solo intermediarios esenciales para la síntesis de los constituyentes celulares, sino también precursores ampliamente utilizados en el metabolismo secundario. Se ha reportado que en *Amycolatopsis mediterranei* U32, existen al menos cuatro grupos de genes que codifican los complejos acetil-CoA y propionil-CoA carboxilasa, que se utilizan para proporcionar malonil-CoA y (S)-metilmalonil-CoA para la síntesis de ácidos grasos y policétidos como el antibiótico rifamicina (Zhao *et al.*, 2010). Asimismo, en *Amycolatopsis balhimycina* se reportó que la ruta del shikimato, la cual provee de precursores para la síntesis de aminoácidos aromáticos, proporciona precursores para la producción del antibiótico balhimicina (Thykaer *et al.*, 2010). La observación de que las rutas anabólicas y catabólicas primarias están naturalmente orientadas a dirigir los intermediarios metabólicos primarios hacia la producción de metabolitos secundarios en *Amycolatopsis*, es consistente con lo reportado sobre otras actinobacterias (Gallo *et al.*, 2010a).

A diferencia de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios no son necesarios para la supervivencia inmediata de la bacteria, pero son importantes porque le confieren ventajas

adaptativas en sus hábitats naturales (Kumari *et al.*, 2016; Traxler y Kolter, 2015). Estos metabolitos generalmente poseen estructuras inusuales y complejas, son de bajo peso molecular y no están directamente involucrados en el crecimiento, desarrollo o reproducción (Adamek *et al.*, 2018; Netzker *et al.*, 2015). En actinobacterias, la capacidad para producir metabolitos secundarios múltiples puede reflejar el uso selectivo de algunos metabolitos de acuerdo con el flujo metabólico primario y los precursores disponibles en la célula (Genilloud, 2017).

En este contexto, miembros del género *Amycolatopsis* son una fuente importante de metabolitos secundarios. En el Cuadro 1 se enlistan algunos de los compuestos bioactivos producidos por este género, entre los cuales se encuentran compuestos de relevancia clínica como los antibióticos balhimicina, vancomicina y rifamicina, así como algunos antifúngicos, agentes anticancerígenos y antivirales (Barna y Williams, 1984; Nadkarni *et al.*, 1994; Sensi *et al.*, 1959; Tan y Goodfellow, 2012). Asimismo, algunas cepas de *Amycolatopsis* se emplean en procesos de bioconversión como la producción de vainillina a partir de ácido ferúlico (Meyer *et al.*, 2018). Es importante señalar que la mayoría las cepas de *Amycolatopsis* con importancia biotecnológica se utilizan en el área médica e industrial, mientras que son escasos los reportes sobre cepas con capacidades metabólicas que puedan aplicarse en la agricultura.

Respecto a la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Amycolatopsis*, existen progresos en la comprensión de las vías biosintéticas, particularmente para la obtención de antibióticos. Por ejemplo, la biosíntesis del glicopéptido vancomicina involucra tres pasos generales. Primero, se sintetizan siete precursores de aminoácidos, incluyendo una leucina, una asparagina, dos  $\beta$ -hidroxitirosinas, dos 4-hidroxifenilglicinas y una 3,5-dihidroxifenilglicina. Enseguida, los siete precursores se ensamblan para formar una estructura principal de heptapéptido, esto es catalizado por sintetetasas peptídicas no ribosomales. El último paso implica modificaciones posteriores al ensamblaje de la cadena principal del heptapéptido, incluida su ciclación, halogenación, metilación y glicosilación (Chen *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2014). La ruta para la biosíntesis de la balhimicina, otro antibiótico glicopéptido de relevancia, es similar a la vía biosintética de la vancomicina, difiriendo solamente en el patrón de la glicosilación (Alduina *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Metabolitos secundarios sintetizados por cepas del género *Amycolatopsis*.

Cepa	Compuesto bioactivo	Aplicación
<i>A. balhimycina</i>	Balhimicina	Antibióticos
<i>A. mediterranei</i>	Rifamicinas	
<i>A. orientalis</i>	Vancomicina	
<i>A. orientalis</i>	Orienticina	
<i>A. lurida</i>	Ristocetina	
<i>A. tolypomycina</i>	Tolipomicina	
<i>A. azurea</i>	Azureomicinas A y B	
<i>A. coloradensis</i>	Avoparcina	
<i>A. sp. K16-0194</i>	Dipirimicina A	Antifúngicos
<i>A. azurea</i>	Octacosamicina A y B	
<i>A. sp. YIM PH20520</i>	Equinosporinas	
<i>A. sp. M39</i>	Macrotermicinas A y C 2-fenilacetamida	
<i>A. sp. YIM 130687</i>	2-Carbamoil-3-hidroxi-1,4-naftoquinona	
<i>A. sp. IRD-009</i>	Pradimicina-IRD	Inmunosupresor Antiviral Antitumoral
<i>A. japónica</i>	Detimicina	
<i>A. orientalis</i>	Quartromicin	
<i>A. regifaucium</i>	Kigamicinas	

Fuente: Bauermeister *et al.* (2018), Beemelmans *et al.* (2017), Dobashi *et al.* (1988), Izuta *et al.* (2018), Liu *et al.* (2020), Tan y Goodfellow (2012), Xu *et al.* (2019).

Por otra parte, no se han encontrado reportes acerca de rutas metabólicas para la biosíntesis de antifúngicos en el género *Amycolatopsis*. Sin embargo, la biosíntesis de la equinosporina, un antifúngico producido por la cepa de *Amycolatopsis* YIM PH2052 (Xu *et al.*, 2019), se elucidó en otro microorganismo productor filogenéticamente relacionado. Dübeler y colaboradores (2002), demostraron que en *Streptomyces erythraeus*, la equinosporina se produce por la vía del shikimato, a partir de dos moléculas de fosfoenolpiruvato (PEP) y la unidad de cuatro carbonos eritrosa 4-fosfato (Figura 2). Estos autores proponen además que una enzima corismato mutasa cataliza reacciones de desprotonación y protonación del corismato, molécula resultante de la vía del shikimato, cambiando su conformación y favoreciendo una vía de reacción con 3 intermediarios para la síntesis de la equinosporina.

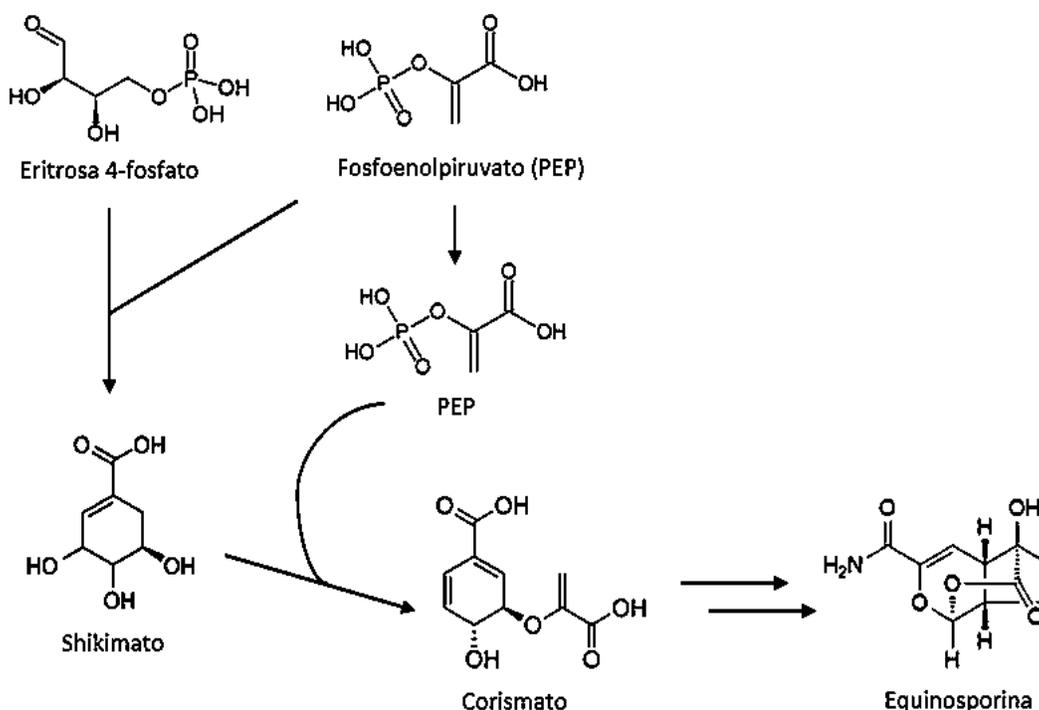


Figura 2. Visión general de la síntesis de equinosporina en *S. erythraeus* por la vía del shikimato. Fuente: Dübeler *et al.* (2002).

Finalmente, el género *Amycolatopsis* se ha considerado en los últimos años como un grupo bacteriano con gran potencial para la producción de metabolitos secundarios. Análisis genómicos realizados en la cepa productora de vancomicina *A. orientalis* ATCC 43491, revelaron la presencia de locis genéticos para la producción de al menos 10 metabolitos secundarios distintos a la vancomicina (Banskota *et al.*, 2006). Asimismo, la detección por PCR reveló el potencial biosintético de la cepa *A. sp.* UM16 para producir antibióticos glicopéptidos y policétidos del tipo II (Wood *et al.*, 2007). Recientemente, un estudio de genómica comparativa empleando 43 cepas de *Amycolatopsis* mostró el potencial del género para producir una gran diversidad de metabolitos secundarios. Esta evidencia demuestra que procesos de transferencia horizontal y vertical de genes son importantes para la adquisición y mantenimiento de metabolitos secundarios valiosos en este género (Adamek *et al.*, 2018).

### 2.4.1. Compuestos Antifúngicos Sintetizados por el Género *Amycolatopsis*

Hasta la fecha se han reportado seis cepas de *Amycolatopsis* productoras de compuestos con actividad antifúngica. En la Figura 3 se muestra su estructura química. Dobashi y colaboradores (1988), reportaron que *Amycolatopsis azurea* MG398-hF9 produce las octacosamicinas A y B. Estos compuestos tienen una estructura de cadena lineal única con un grupo terminal N-hidroxiguanidilo. La actividad antimicrobiana de estos compuestos se probó contra bacterias, levaduras y hongos, exhibiendo poca o nula actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En contraste, estos metabolitos mostraron fuerte actividad inhibitoria contra hongos y levaduras. Entre las cepas fúngicas que inhibieron se encuentran *Aspergillus niger*, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pyricularia oryzae* y *Helminthosporium oryzae*. Por otro lado, Beemelmans y colaboradores (2017), reportaron que *Amycolatopsis* sp. M39 produce las macrotermicinas A y C. Estas moléculas estructuralmente corresponden a policétidos macrolactamas. La macrotermicina A mostró actividad antimicrobiana de moderada a buena contra bacterias y levaduras, por el contrario, la macrotermicina C solo mostró actividad débil contra estos microorganismos. Mientras que ambos compuestos inhibieron moderadamente al hongo *Pseudoxylaria* sp., un hongo parásito del “jardín de hongos” de la termita *Macrotermes natalensis*. Por su parte, Izuta y colaboradores (2018), reportaron que *Amycolatopsis* sp. K16-0194 produce la dipirimicina A, una molécula con una estructura central única 2,2'-bipiridina. Este compuesto mostró actividad citotóxica y potente actividad contra bacterias y levaduras. Además, inhibió el desarrollo de los hongos *Mucor racemosus* y *Candida albicans*, agentes causantes de infecciones micóticas en humanos. Asimismo, Xu y colaboradores (2019), identificaron a la equinosporina y a la 7-desoxiequinosporina producidas por la cepa de *Amycolatopsis* sp. PH20520. Estos compuestos poseen estructuras tricíclicas acetal-lactona. La equinosporina mostró potente actividad contra *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria panax* y *Phoma herbarum*. Por su parte, la 7-desoxiequinosporina exhibió actividad antifúngica débil contra las mismas cepas fúngicas.

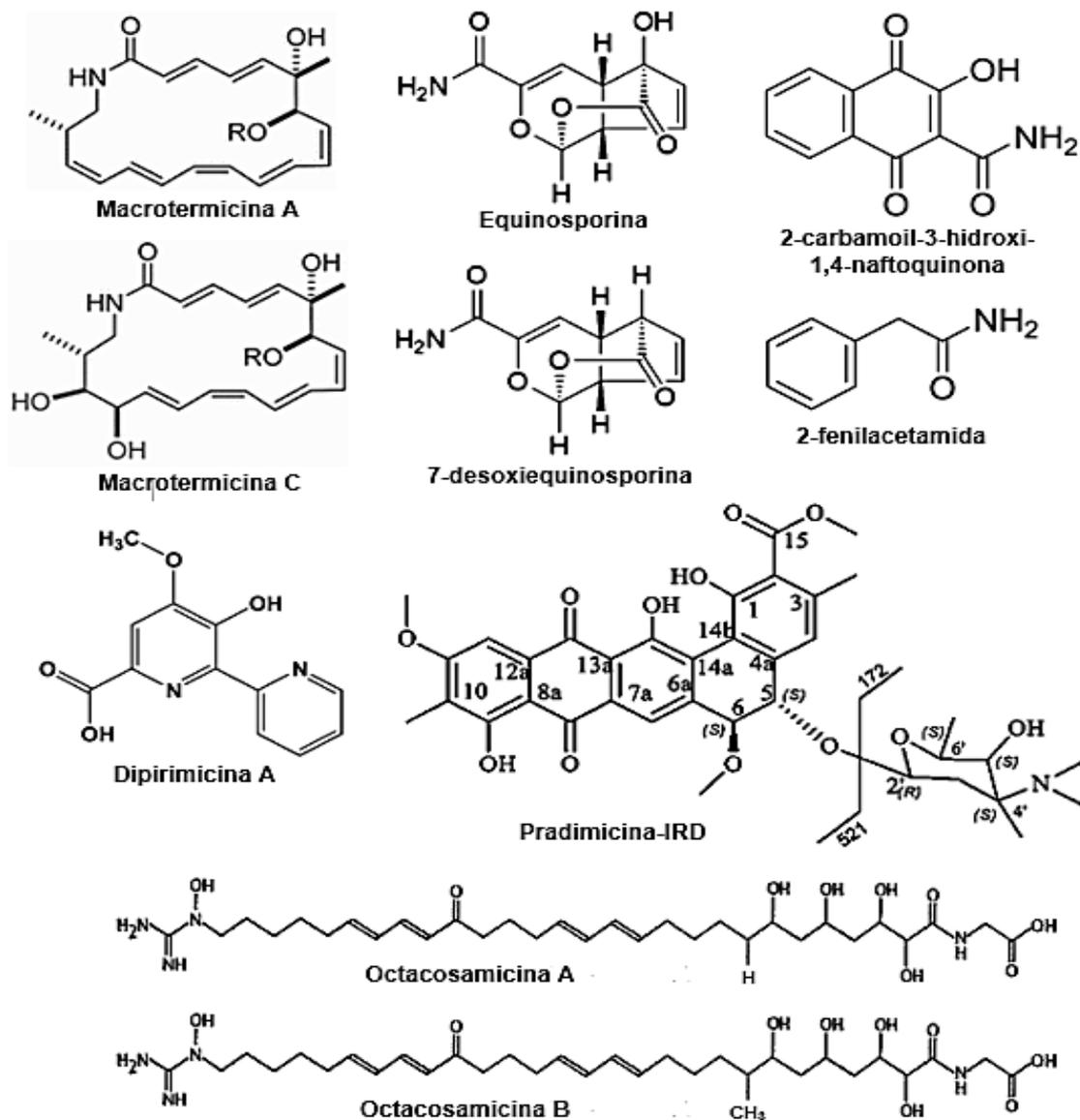


Figura 3. Compuestos antifúngicos producidos por cepas del género *Amycolatopsis*. Fuente: Bauermeister *et al.* (2018), Beemelmans *et al.* (2017), Dobashi *et al.* (1988), Izuta *et al.* (2018), Liu *et al.* (2020), Xu *et al.* (2019).

También, se describió el aislamiento de la 2-fenilacetamida y de la 2-carbamoyl-3-hidroxi-1,4-naftoquinona, producidas por *Amycolatopsis* sp. YIM 130687. Estructuralmente, la primera molécula corresponde a una acetamida sustituida por un grupo fenilo en la posición 2, mientras que la segunda pertenece al grupo de las naftoquinonas. Ambos compuestos presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus*. Asimismo, inhibieron el crecimiento de *F. graminearum* y *Botrytis cinerea* (Liu *et al.*, 2020). Finalmente, se reportó que *Amycolatopsis* sp. IRD-009 produce la

pradimicina-IRD. Esta molécula posee una estructura policíclica con un resto aminoglucósido. La pradimicina-IRD presentó potente actividad contra bacterias causantes de la mastitis bovina y considerable actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas. Además, estudios previos corroboraron las propiedades antifúngicas y antivirales de esta molécula (Bauermeister *et al.*, 2018). Adicionalmente, es el único de los compuestos con actividad antifúngica producidos por cepas de *Amycolatopsis* del que se conoce su mecanismo de acción. Los estudios en *Candida albicans* indican que existe un reconocimiento de unión específico de la pradimicina a los D-manósidos terminales de la pared celular. Esta unión resulta en la formación de un complejo ternario con el D-manósido, la pradimicina y el calcio. Este complejo se forma dentro de la pared celular y se internaliza, lo que resulta en la afectación de la integridad de la membrana fúngica (Walsh y Giri, 1997).

#### **2.4.2. Compuestos Antifúngicos Producidos por *Amycolatopsis* para el Control Biológico de Hongos Fitopatógenos**

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos representan la principal amenaza ecológica y económica en la agricultura a nivel mundial (Doehlemann *et al.*, 2017). Se ha reportado que al menos 10 000 especies de hongos atacan a las plantas alrededor del mundo (Agris, 2005). Dentro de los principales hongos fitopatógenos se encuentran *Magnaporthe oryzae*, *B. cinerea*, *Puccinia* spp., *F. graminearum* y *F. oxysporum* (Dean *et al.*, 2012). En México, hasta el año 2014 se reportó la presencia de 1 500 hongos fitopatógenos (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). Entre los más persistentes se encuentran *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* spp. y *Macrophomina* sp. (Rodríguez-Guzmán, 2001). Para tratar de mitigar el impacto negativo que ejercen estos hongos fitopatógenos en las plantas de cultivo, se han utilizado ampliamente fungicidas químicos. Sin embargo, el uso excesivo de estos agentes químicos ha provocado afectaciones en la salud humana, contaminación ambiental y disminución de las poblaciones de microorganismos benéficos del suelo (Aktar *et al.*, 2009; Foley *et al.*, 2005). Ante este escenario, surge la necesidad de buscar métodos alternativos sustentables que permitan el control biológico de dichas enfermedades, por lo que el uso de antagonistas microbianos representa una opción factible (Prapadgee *et al.*, 2008).

En este contexto, algunas actinobacterias, principalmente del género *Streptomyces*, son bien conocidas por su capacidad para sintetizar compuestos bioactivos que permiten antagonizar el desarrollo de hongos fitopatógenos (Bhatti *et al.*, 2017; Quiñones-Aguilar *et al.*, 2016). Dentro del género *Amycolatopsis* se tiene conocimiento de únicamente tres cepas con esta capacidad. Las octacosamicinas producidas por *A. azurea* MG398-hF9 inhibieron el crecimiento de *Pyricularia oryzae* y *Helminthosporium oryzae*, dos hongos patógenos de la planta de arroz (Dobashi *et al.*, 1988). Por otra parte, las equinosporinas producidas por *A. sp.* PH20520 mostraron actividad antifúngica contra *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. panax* y *P. herbarum*, hongos patógenos del notoginseng, planta de origen chino con propiedades medicinales ampliamente usada en países asiáticos (Zhao *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019). También, la 2-fenilacetamida y la 2-carbamoil-3-hidroxi-1,4-naftoquinona, sintetizadas por *A. sp.* YIM 130687, presentaron actividad antifúngica contra el patógeno de cereales, *F. graminearum*, y contra *B. cinerea*, un hongo que afecta a diversas plantas, aunque su hospedador económicamente más importante es la vid (Liu *et al.*, 2020). Adicionalmente, en el grupo de trabajo se cuenta con la cepa de *Amycolatopsis sp.* BX17 aislada de suelos de milpa y la cual posee actividad antagonista contra *Fusarium graminearum* RH1 y otros fitopatógenos como *Alternaria sp.* (Cabrera *et al.*, 2020; García-López, 2017). Con el objetivo de continuar las investigaciones relacionadas con el estudio de la capacidad antifúngica de la cepa BX17 y el mecanismo de acción de las moléculas responsables de ejercer dicha actividad, en el presente trabajo de investigación se planteó evaluar la actividad antifúngica e identificar los metabolitos secretados por *Amycolatopsis sp.* BX17. La información generada permitirá estudiar en un futuro, los procesos de interacción actinobacteria-fitopatógeno.

### **3. HIPÓTESIS**

*Amycolatopsis* sp. BX17 secreta metabolitos con actividad antifúngica y estos compuestos corresponden a moléculas pertenecientes a la familia de lactonas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica e identificar los metabolitos secretados por *Amycolatopsis* sp. BX17.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad de *Amycolatopsis* sp. BX17 para controlar a *Fusarium graminearum* mediante experimentos *ex situ* en plantas de maíz.
2. Evaluar la actividad de los compuestos extracelulares producidos por *Amycolatopsis* sp. BX17 en cultivo sólido sobre *F. graminearum* RH1.
3. Determinar el perfil global de metabolitos extracelulares de *Amycolatopsis* sp. BX17 mediante análisis metabolómico.
4. Identificar el o los compuestos antifúngicos producidos por *Amycolatopsis* sp. BX17 mediante un análisis de espectrometría de masas dirigido.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cepas Microbianas

Para este estudio se utilizó la cepa de *Amycolatopsis* sp. BX17 previamente aislada de suelos de milpa de la comunidad El Boxo, localizada en la región Valle del Mezquital, en el estado de Hidalgo, México. Así como el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum* RH1, aislado de maíz recolectado en campos agrícolas del municipio de Mixquiahuala de Juárez, Hidalgo, México (Cabrera *et al.*, 2020; García-López, 2017). Ambas cepas se encuentran depositadas en el Cepario de Aislados Ambientales del CIDEA. Se utilizó medio Agar Papa Dextrosa (PDA Difco™, BD) para la reactivación y crecimiento de ambas cepas microbianas. El pH del medio se ajustó a 7.

### 5.2. Bioensayo de Antagonismo *ex situ* en Plantas de Maíz (*Zea mays* L.)

Se realizaron experimentos de antagonismo de la cepa de *Amycolatopsis* sp. BX17 contra *Fusarium graminearum* RH1 bajo condiciones gnotobióticas en plantas de maíz. Para este propósito, se utilizaron semillas de maíz blanco cuya superficie fue previamente esterilizada mediante un lavado con solución jabonosa por 20 min, seguido de un lavado con etanol 70% 1 min e hipoclorito de sodio 4.5% durante 20 min. Entre cada paso se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Enseguida, las semillas se sembraron en macetas con sustrato estéril.

Posteriormente, las macetas se transfirieron a cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas; la temperatura diurna y nocturna se mantuvo a 25 °C con un fotoperiodo de 12 h. La irradiación se realizó mediante tubos fríos fluorescentes blancos OSRAM FH 28W/865 HE para obtener una densidad de flujo de fotones de 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Las plantas de maíz en el estado fenológico de desarrollo V<sub>3</sub> – V<sub>4</sub> (etapa vegetativa temprana) se inocularon con una suspensión bacteriana de *Amycolatopsis* BX17. Para esto, la cepa se cultivó previamente en PDA durante 7 días a 25 °C. Enseguida, las células de *Amycolatopsis* se suspendieron en solución salina estéril y

se adicionaron al sustrato de las plantas de maíz a una concentración final de  $10^4$  UFC/mL. A los 3 días post-inoculación con *Amycolatopsis* BX17, las plantas se inocularon con una suspensión de  $10^6$  UFC/mL de macroconidios de *F. graminearum* RH1. Los tratamientos fueron: 1) plantas de maíz co-inoculadas con *Amycolatopsis* BX17 y *F. graminearum* RH1, 2) plantas de maíz inoculadas con *Amycolatopsis* BX17 (control negativo), 3) plantas de maíz inoculadas con *F. graminearum* RH1 (control positivo), y 4) plantas de maíz sin inoculación (control negativo). Al final del bioensayo (9 semanas post-inoculación) se evaluó el desarrollo de síntomas de la enfermedad y parámetros biométricos como la altura de la planta y el peso fresco aéreo (hoja + tallo).

Las cepas bacteriana y fúngica se re-aislaron del sustrato. Para ello, se suspendió 1 mg del sustrato en 0.9 mL de solución salina estéril y enseguida se inoculó 0.1 mL de la suspensión en placas con agar nutritivo y PDA. La identidad de las colonias se verificó con base en su morfología macroscópica y microscópica.

### 5.3. Diseño de Sistema de Cultivo Para la Recuperación de los Metabolitos Antifúngicos Secretados por *Amycolatopsis* BX17

Para recuperar los metabolitos antifúngicos secretados por *Amycolatopsis* BX17, se diseñó un sistema de cultivo que consistió en colocar dos capas de agar separadas por una membrana. Para ello, se adicionó una primera capa de agar con 20 mL de medio PDA en placas Petri, se dejó solidificar y enseguida se colocó una membrana con punto de corte de 3 kDa. Finalmente, se agregó una segunda capa de agar con 15 mL más del medio. Una vez que el sistema de cultivo estuvo listo, se sembró por extensión en superficie 1 mL de una suspensión bacteriana de la cepa BX17 ( $10^7$  UFC/mL) y se incubó a  $26 \pm 1$  °C por 7 días. Transcurrido el periodo de incubación, se retiró la segunda capa de agar junto con la biomasa bacteriana y la membrana. Posteriormente, se inoculó un explante de 1 cm<sup>2</sup> con crecimiento micelial de *F. graminearum* RH1 en la capa de agar donde se acumularon los compuestos secretados por la bacteria. Como control, se sembró al hongo en medio PDA libre de los metabolitos secretados por la cepa BX17. Las placas se incubaron a  $26 \pm 1$  °C y se monitoreó el crecimiento radial del hongo. Después de 5 días incubación, se determinó

el porcentaje de inhibición mediante el Software ImageJ 1.43, midiendo las áreas del crecimiento fúngico y utilizando la siguiente ecuación (Hernández *et al.*, 2014; Tejera *et al.*, 2012):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Tratamiento}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

Donde,  $A_{\text{Control}}$  es el área del crecimiento fúngico en el medio de cultivo sin los metabolitos secretados por la bacteria y  $A_{\text{Tratamiento}}$  es el área del crecimiento fúngico en el medio de cultivo conteniendo los metabolitos secretados por la bacteria.

#### 5.4. Perfil Antagónico de *Amycolatopsis* sp. BX17

El perfil antagónico de los metabolitos secretados por la bacteria se determinó mediante una cinética de antagonismo. Para ello, se sembró a la cepa BX17 en el sistema de cultivo previamente diseñado. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de una suspensión bacteriana con  $10^7$  UFC/mL y se inocularon uniformemente en una de las mitades de la capa de agar del sistema de cultivo. Las placas se incubaron a  $26 \pm 1$  °C. A partir del día 2 de crecimiento, se tomó una de las placas con el sistema de cultivo y se descartó la segunda capa de agar junto con la biomasa bacteriana y la membrana, para así utilizar únicamente la capa de agar conteniendo los metabolitos secretados por la bacteria. En esta capa se inoculó un explante de 7 mm ( $\emptyset$ ) del hongo *F. graminearum* RH1. Como control, se sembró al hongo en medio PDA libre de los metabolitos secretados por la bacteria. Las placas se incubaron a  $26 \pm 1$  °C y se monitoreó el crecimiento fúngico. El porcentaje de inhibición se determinó 4 días después de la inoculación del hongo mediante el Software ImageJ 1.43, midiendo las áreas del crecimiento fúngico y utilizando la ecuación previamente descrita.

La cinética de antagonismo se evaluó a partir del día 2 y hasta el día 9 post-inoculación de la cepa BX17, realizando cada 24 h el procedimiento previamente descrito para calcular el porcentaje de inhibición causado por los metabolitos secretados diariamente por la bacteria.

## 5.5. Cultivo de *Amycolatopsis* BX17 y Extracción de Metabolitos Extracelulares

A partir de una suspensión bacteriana de *Amycolatopsis* BX17 con  $10^7$  UFC/mL, se sembró por extensión en superficie 1.0 mL del inóculo en el sistema de cultivo diseñado para recuperar los metabolitos secretados por la bacteria. En total, 3 placas se inocularon y se incubaron a  $26 \pm 1$  °C durante 5 días. Transcurrido el periodo de incubación, se eliminó la segunda capa de agar junto con la membrana y a partir de la capa de agar que contenía los metabolitos secretados por la bacteria, se realizó la extracción secuencial mediante maceración utilizando 3 solventes en orden decreciente de polaridad. Para esto, la capa de agar con los metabolitos acumulados se cortó en pequeños trozos y se colocó en un recipiente junto con el solvente en proporción 1:2 (medio agarizado:solvente). La extracción inició con metanol (Sigma-Aldrich grado HPLC,  $\geq 99.9\%$ ), para ello, el medio agarizado y el solvente se dejaron en agitación constante a 50 rpm durante 72 h. Enseguida, se recuperó el extracto metanólico y se continuó la extracción con acetato de etilo (Sigma-Aldrich grado HPLC,  $\geq 99.8\%$ ) y posteriormente con 1-butanol (Sigma-Aldrich grado HPLC, 99.8%), siguiendo el mismo procedimiento. Los solventes se eliminaron al vacío en un concentrador (Vacufugue Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 45 °C. Los extractos crudos obtenidos se almacenaron en refrigeración a 4 °C (Beemelmans *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019). A continuación, los extractos se sometieron a análisis de infrarrojo medio ( $4\ 000 - 500\ \text{cm}^{-1}$ ) en un espectrómetro FTIR Nicolet-iS50 (ThermoScientific, Massachusetts, EUA).

### 5.5.1. Evaluación de Actividad Antifúngica de los Extractos

La actividad antifúngica de los extractos obtenidos se evaluó utilizando concentraciones de 2 mg/mL. Para su aplicación, cada extracto se suspendió en el respectivo solvente con el que fue extraído. Posteriormente, se adicionó en la superficie de las placas con medio PDA y se dejó secar por 30 min para eliminar los restos de solvente. Enseguida, las placas se inocularon con explantes de 4 mm ( $\emptyset$ ) de *F. graminearum* RH1 y se incubaron a  $26 \pm 1$  °C durante 2 días. Como control, se inoculó al hongo en placas con medio PDA sin la presencia de los extractos bacterianos. El

porcentaje de inhibición se determinó mediante el Software ImageJ 1.43, midiendo las áreas del crecimiento fúngico y utilizando la ecuación descrita anteriormente.

### 5.6. Extracción Metanólica de Metabolitos Antifúngicos

Con base en los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos, se seleccionó al metanol como solvente de extracción para recuperar los metabolitos con actividad antifúngica producidos por la cepa BX7 en cultivo sólido. Para esto, 9 placas con el sistema de cultivo se inocularon con una suspensión bacteriana de la cepa BX17 ( $10^7$  UFC/mL) y se incubaron a  $26 \pm 1$  °C por 5 días. A continuación, se realizó la extracción metanólica siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.5. El extracto obtenido se centrifugó a 8 000 rpm durante 5 min, se descartó el precipitado y el solvente se eliminó al vacío a 45 °C. Posteriormente, el extracto se sometió a un proceso de pre-purificación. Para ello, se suspendió en metanol (100  $\mu$ L de metanol por cada 10 mg de extracto) agitando y homogeneizando vigorosamente hasta suspender la mayor cantidad de extracto posible. Después, se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min, se recuperó el sobrenadante y se concentró al vacío a 45 °C. La actividad antifúngica del extracto pre-purificado se evaluó suplementando 0.25, 0.5 y 1 mg/mL del extracto en el medio de cultivo según el protocolo descrito en la sección 5.5.1. El porcentaje de inhibición se determinó mediante el Software ImageJ 1.43, midiendo las áreas del crecimiento fúngico y utilizando la ecuación descrita en la sección 5.3.

### 5.7. Perfil Global de Metabolitos Extracelulares de *Amycolatopsis* BX17

El perfil global de metabolitos secretados por *Amycolatopsis* BX17 se obtuvo mediante cromatografía de líquidos (ACQUITY UPLC I-Class System, Waters Milford, MA, U.S.A.) acoplada a espectrometría de masas (Synapt G1 QTOF, Waters). Esto se realizó en el Laboratorio de Mebolómica y Espectrometría de Masas Langebio, Cinvestav, Irapuato, Guanajuato. Para lo cual, se obtuvieron tres réplicas biológicas del extracto metanólico pre-purificado. Las muestras

secas se reconstituyeron en una solución compuesta de agua Milli-Q y acetonitrilo en proporción 90:10, agregando primero el acetonitrilo, mezclando en vortex, y después agregando agua. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12 000 rpm por 25 min, el sobrenadante se recuperó y se filtró con una membrana con punto de corte de 0.22  $\mu\text{m}$ . Enseguida, la solución obtenida se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 10 min. Finalmente, el sobrenadante se colocó en un vial ámbar para su análisis.

Para el análisis por espectrometría de masas exploratorio ( $\text{MS}^E$ ) se realizó una calibración multipuntos del equipo, en modo W (+) y calibración multipuntos en modo W (-), ambas con formiato de sodio. Para una determinación precisa de masa, durante la adquisición los datos fueron centrados y corregidos utilizando el software PROGENESIS QI, utilizando un estándar de referencia externo (leucina-encefalina) como lock mass, con valor  $m/z$  de 556.2771 para ESI (+) y valor  $m/z$  de 554.2615 para ESI (-). Para la cromatografía líquida se utilizó una columna ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm) como fase estacionaria. Las fases móviles fueron agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B), utilizando un flujo de 0.20 mL/min y un programa de gradiente. Las muestras se inyectaron por duplicado bajo las condiciones mostradas en el Cuadro 2.

Para la identificación de compuestos se utilizó el software PROGENESIS QI y las bases de datos ChemSpider y The Human Mebalome Database (HMDB). Como criterio de identificación se consideró un score  $\geq 50$ .

Cuadro 2. Condiciones del análisis MS<sup>E</sup>.

<b>Cromatografía de líquidos</b>		<b>Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> Class I</b>		
<b>Columna:</b>	ACQUITY UPLC <sup>®</sup> HSS T3 1.8 µm 2.1 x 100 mm			
<b>Fase móvil A:</b>	H2O con 0.1% ácido fórmico			
<b>Fase móvil B:</b>	ACN			
<b>Flujo:</b>	0.2 mL/min			
<b>Gradiente:</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Flujo (mL/min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
	Inicial	0.20	90	10
	0.5	0.20	90	10
	17.00	0.20	20	80
	18.00	0.20	20	80
	18.10	0.20	0	100
	20.10	0.20	0	100
	20.20	0.20	90	10
	25.00	0.20	90	10
<b>Volumen de inyección:</b>	5 µL			
<b>Temperatura de columna:</b>	40 °C			
<b>Temperatura autosampler:</b>	6 °C			
<b>Espectrometría de Masas (MS<sup>E</sup>)</b>		<b>Waters Synapt G1 Q-TOF</b>		
<b>Polaridad:</b>	ES+	ES-		
<b>Analizador:</b>	Modo W	Modo W		
<b>Capilar (kV):</b>	2.5	2.3		
<b>Cono de muestreo (V):</b>	40	35		
<b>Cono de extracción (V):</b>	4.0	3.5		
<b>Temperatura de la fuente (°C):</b>	120	120		
<b>Temperatura de desolvatación (°C):</b>	300	300		
<b>Flujo de gas de cono (L/h):</b>	0.0	0.0		
<b>Flujo de gas de desolvatación (L/h)</b>	500.0	500.0		
<b>Resolución LM:</b>	4.7	4.7		
<b>Resolución HM:</b>	15.0	15.0		
<b>Trampa CE:</b>	4.0	4.0		
<b>Transferencia CE:</b>	20.0	20.0		
<b>Fuente (mL/min):</b>	0.0	0.0		
<b>Trampa (mL/min):</b>	1.5	1.5		
<b>IMS (mL/min):</b>	24.0	-		
<b>Detector:</b>	1950	1850		
<b>Multiplicador:</b>	650	650		

### 5.7.1. Identificación de Compuestos Antifúngicos Mediante Análisis por Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS) Dirigido

Para identificar la posible presencia de compuestos de interés, se determinaron sus perfiles de abundancia. Para ello, se calculó el valor  $m/z$  de los compuestos a partir de su fórmula química. Enseguida, se utilizaron los cromatogramas de iones totales del análisis  $MS^E$  y se indagó la presencia de cada  $m/z$ , esto con la finalidad de identificar el pico y tiempo de retención. Finalmente, se obtuvieron las gráficas de abundancia de los compuestos mediante el software Progenesis QI. Una vez conocido el perfil de abundancia de los compuestos de interés y su presencia o ausencia en las muestras, se realizó un análisis dirigido mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) utilizando los datos de  $m/z$  calculado y el tiempo de retención de cada compuesto. Dicho análisis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones del análisis  $MS^E$  (Cuadro 2), y añadiendo los siguientes perfiles de Energía de Colisión (CE): 10, 20, 30 y 40 electron-volts.

## 5.8. Análisis de Datos

El diseño experimental de los ensayos de antagonismo *ex situ* en plantas de maíz y actividad biológica de los metabolitos extracelulares producidos por *Amycolatopsis* BX17, correspondió a un diseño completamente al azar. Para el bioensayo de antagonismo *ex situ* en plantas de maíz, se utilizaron 5 unidades experimentales por tratamiento. Las variables de respuesta fueron los parámetros antropométricos altura (cm) y peso fresco (g) de las plantas. Por otra parte, para la cinética de antagonismo se realizaron 4 réplicas por tratamiento y la variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición de los metabolitos secretados por la bacteria. Finalmente, para evaluar la actividad antifúngica de los extractos y fracciones aisladas, se realizaron 3 réplicas por tratamiento. La variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición calculado después del periodo de incubación. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA). Cuando existieron diferencias entre tratamientos, las medias se compararon por la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ ). Los datos se procesaron en el programa estadístico NCSS-2020 versión 20.0.1 (NCSS 2020 Statistical Software).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Antagonismo de *Amycolatopsis* sp. BX17 Contra la Infección por *Fusarium graminearum* RH1 en Plantas de Maíz

En estudios previos se demostró que *in vitro*, *Amycolatopsis* BX17 inhibe el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *F. graminearum* RH1 (Cabrera *et al.*, 2020; García-López, 2017). Sin embargo, fue necesario evaluar si la bacteria es capaz de prevenir la infección de la cepa fúngica directamente *ex situ* en plantas de maíz. Esto debido a que el ciclo de infección de *F. graminearum* inicia con la germinación de macroconidios, seguido de la penetración directa o a través de heridas, y posterior colonización de tejidos como las raíces jóvenes de las plántulas de maíz (Agrios, 2005; He *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2013).

Los resultados indican que las plantas de maíz inoculadas con *F. graminearum* RH1 mostraron una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) en la altura y el peso fresco en comparación con los demás tratamientos, incluyendo las plantas sin inocular (Figura 4A y 4B). En contraste, cuando se añadió *Amycolatopsis* sp. BX17 antes que la cepa fúngica, estas plantas co-inoculadas conservaron su crecimiento normal y no presentaron diferencias ( $p \geq 0.05$ ) en sus parámetros biométricos con respecto a las plantas sin inocular (Figura 4B). Asimismo, las plantas inoculadas únicamente con la cepa BX17 tuvieron un crecimiento similar a las plantas sin inocular (Figura 4B).

Adicionalmente, en las plantas inoculadas con *F. graminearum* RH1 se observaron células exodérmicas de la raíz encogidas y múltiples lesiones de color marrón-oscuro, es decir, necrosis (Figura 4C). Mientras que las plantas que se co-inocularon con la cepa bacteriana y con el hongo fitopatógeno no presentaron daño celular, y mostraron una apariencia similar a las plantas sin inocular, al igual que las plantas inoculadas solamente con la cepa BX17 (Figura 4C). Estos resultados confirman que *Amycolatopsis* BX17 ejerció un efecto protector hacia las plantas de maíz contra la infección del fitopatógeno *F. graminearum* RH1.

Es importante mencionar que tanto la actinobacteria como el hongo permanecieron latentes en el sustrato al final del experimento, ya que ambas cepas fueron re-aisladas.

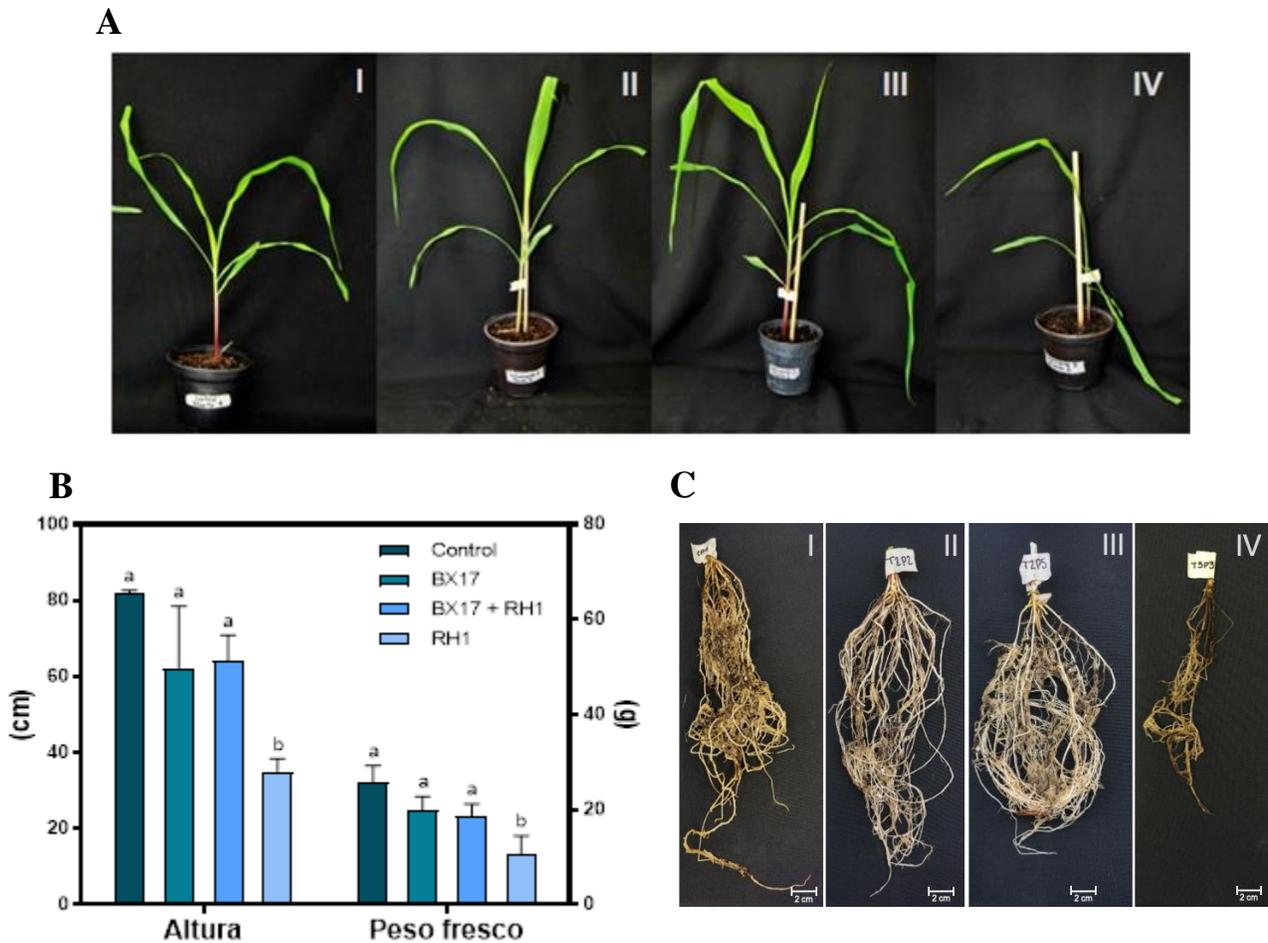


Figura 4. Efecto de la inoculación con la cepa *Amycolatopsis* BX17 sobre la infección en plantas de maíz por *Fusarium graminearum* RH1. A. Características morfológicas de las plantas de maíz. B. Parámetros biométricos. C. Integridad de la raíz. I. Plantas sin inocular (control); II. Plantas inoculadas con *Amycolatopsis* BX17; III. Plantas co-inoculadas con *Amycolatopsis* BX17 y *F. graminearum* RH1; IV. Plantas inoculadas con *F. graminearum* RH1.

## 6.2. Actividad Antifúngica de los Metabolitos Secretados por *Amycolatopsis* sp. BX17

Para determinar si el efecto protector que mostró la cepa BX17 en plantas de maíz contra la infección de *F. graminearum* RH1 es atribuido a la acción de compuestos antifúngicos. Se cultivó a la bacteria en un sistema de cultivo diseñado para recuperar los metabolitos extracelulares. Los resultados muestran que cuando se inoculó el hongo en el agar que contenía los metabolitos secretados por la bacteria, el desarrollo micelial de *F. graminearum* RH1 se inhibió completamente (Figura 5).



Figura 5. Actividad antifúngica de metabolitos extracelulares secretados por *Amycolatopsis* BX17 contra *Fusarium graminearum* RH1. Crecimiento micelial de *F. graminearum* en un medio de cultivo conteniendo los metabolitos extracelulares (izquierda). Control: crecimiento micelial de *F. graminearum* RH1 en un medio sin los metabolitos extracelulares (derecha).

Lo anterior indica que el sistema de cultivo diseñado permitió recuperar los metabolitos secretados por *Amycolatopsis* BX17, y que la inhibición del crecimiento micelial de *F. graminearum* es debido a la acción de compuestos antifúngicos secretados por la bacteria.

### 6.3. Cinética de Crecimiento y Perfil Antagónico de *Amycolatopsis* BX17

Después de confirmar que el sistema de cultivo permitió recuperar los metabolitos extracelulares producidos por *Amycolatopsis* BX17, se evaluó el perfil antagónico de los compuestos secretados por la bacteria mediante una cinética de antagonismo. Los resultados muestran que después de dos días de crecimiento, los compuestos antifúngicos secretados por la cepa BX17 en cultivo sólido, inhibieron el crecimiento micelial de *F. graminearum* RH1 78% (Figura 6). Mientras que, después del tercer día de crecimiento, los metabolitos secretados por la bacteria inhibieron 100% el desarrollo del hongo, y no hubo diferencias ( $p \geq 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición hasta el día 9 post-inoculación de la bacteria (Figura 6).

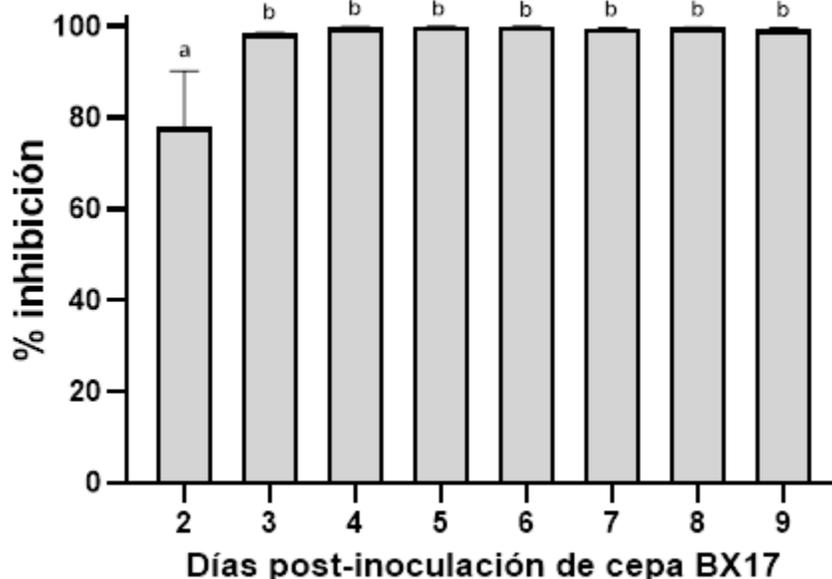


Figura 6. Porcentaje de inhibición de los compuestos secretados por *Amycolatopsis* BX17 sobre el crecimiento de *F. graminearum* RH1.

Además de no presentar crecimiento, los explantes de *F. graminearum* RH1 inoculados en la capa de agar con los metabolitos secretados por la bacteria, mostraron una apariencia pálida y polvosa (Figura 7). En contraste, cuando se inoculó al hongo en medio PDA libre de los compuestos secretados, este se desarrolló rápidamente y produjo abundante micelio denso que varió de color naranja pálido a rojo (Figura 7). Estas características de crecimiento son consistentes con lo reportado para cepas de *F. graminearum* cuando son cultivadas bajo condiciones similares en medio PDA (Leslie y Summerell, 2006).

La cinética de antagonismo permitió determinar que después de dos días de crecimiento, *Amycolatopsis* BX17 inició con la secreción de compuestos que afectaron el desarrollo de *F. graminearum* RH1. Además, el efecto antifúngico de los metabolitos secretados por la cepa BX17 prevaleció al final del experimento, es decir, 9 días después de su inoculación.

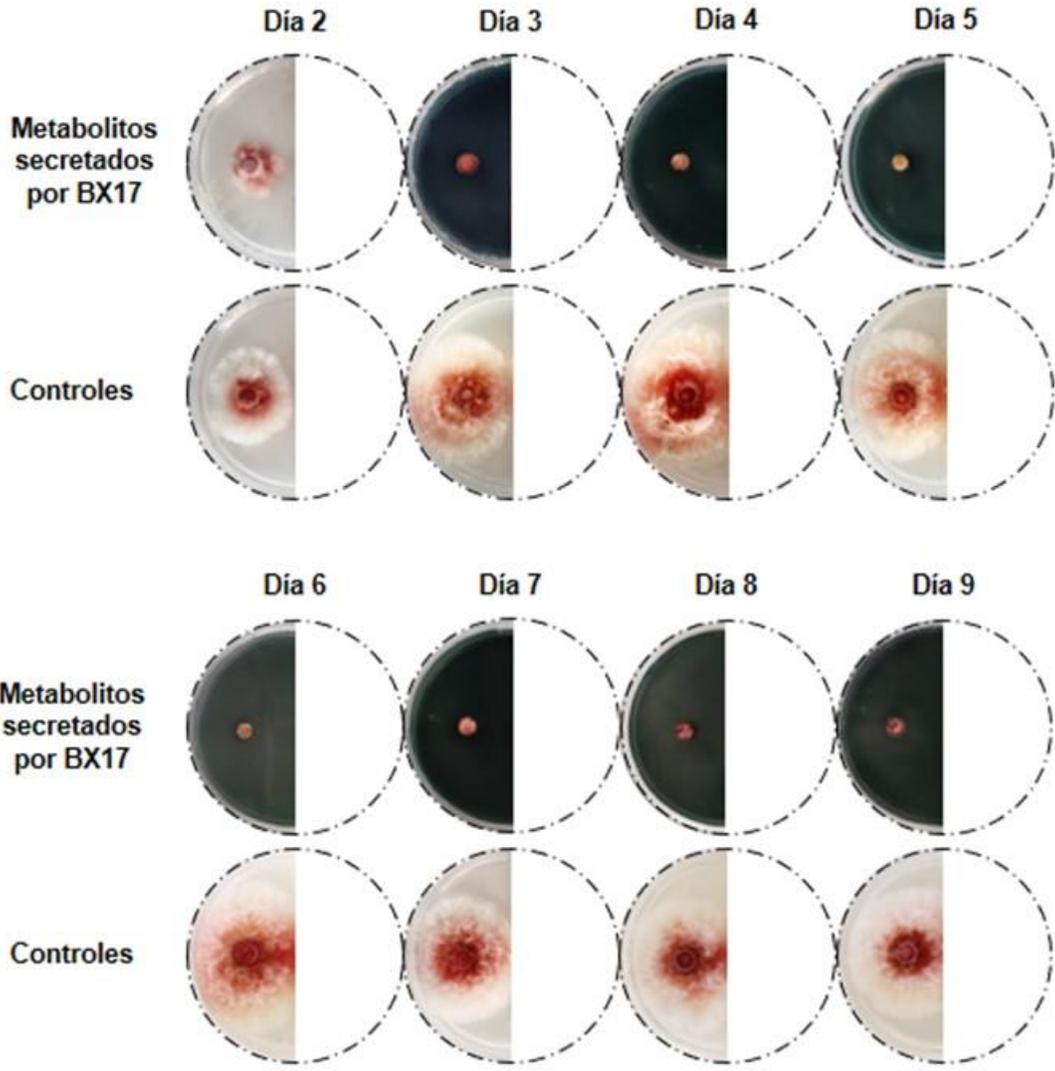


Figura 7. Crecimiento de *F. graminearum* RH1 en el agar conteniendo los metabolitos secretados por *Amycolatopsis* BX17 con respecto al control (agar sin metabolitos).

6.4. Extracción de Metabolitos Secretados por *Amycolatopsis* BX17

Después de determinar el tiempo en que *Amycolatopsis* BX17 secreta los compuestos de interés, se seleccionó el día 5 post-inoculación para realizar la extracción de los compuestos antifúngicos secretados mediante extracción secuencial con metanol, acetato de etilo y 1-butanol. El rendimiento y características de los extractos obtenidos se muestran en el Cuadro 3. Posteriormente, se sometieron a análisis de FTIR medio (4 000 – 500 cm<sup>-1</sup>; Figura 8). En las tres fracciones se

identificaron las bandas correspondientes al estiramiento del enlace O-H, el cual aparece como una banda ancha alrededor de  $3350\text{ cm}^{-1}$  (Stuart, 2004). Asimismo, en los tres extractos se observó la banda característica del estiramiento del enlace C-H, el cual puede observarse entre  $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  (Mistry, 2009; Smith, 1999). Por otra parte, en el espectro del extracto obtenido con acetato de etilo se observó una banda en  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Este número de onda corresponde al estiramiento del enlace C=O, el cual se presenta entre  $1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  en el carbonilo de ácidos carboxílicos y ésteres (Mistry, 2009; Stuart, 2004). También, en los espectros de los extractos obtenidos con metanol y acetato de etilo se identificaron bandas en  $1651$  y  $1662\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Ambas bandas pueden asociarse al estiramiento del enlace C=O de amidas primarias y secundarias, las cuales se presentan entre  $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  (Mistry, 2009; Lin-Vien *et al.*, 1991; Pavia *et al.*, 2001). Finalmente, se detectó una banda en los extractos metanólico y butanólico a  $1579$  y  $1564\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Ambos picos se encuentran en la región asociada a la flexión del enlace N-H de amidas, la cual se presenta entre  $1640\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  para amidas primarias y secundarias (Pavia *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Rendimiento y características de los extractos obtenidos.

Solvente de extracción	Rendimiento extracto crudo*	Características	Rendimiento extracto pre-purificado*	Características
Metanol	4.4 mg/mL	Extracto viscoso de color verde oscuro	1.33 mg/mL	Polvo amorfo de color amarillo
Acetato de etilo	0.25 mg/mL	Extracto viscoso de color marrón claro	-----	-----
1-butanol	0.47 mg/mL	Extracto viscoso de color amarillo claro	-----	-----

\*mg de extracto por mL de medio agarizado.

La estructura química de los compuestos antifúngicos producidos por especies de *Amycolatopsis* es diversa. No obstante, en general se trata de moléculas cíclicas, excepto las octacosamicinas A y B. Además, la mayoría posee en su estructura amidas primarias y secundarias, carbonilos e hidroxilos. Por lo tanto, la presencia de bandas asociadas a grupos hidroxilo, carbonilo y amidas en los espectros de infrarrojo de los extractos obtenidos, sugiere la posible presencia de compuestos químicamente similares a las moléculas previamente descritas. Sin embargo, son necesarios pasos de purificación para asignar bandas de manera precisa.

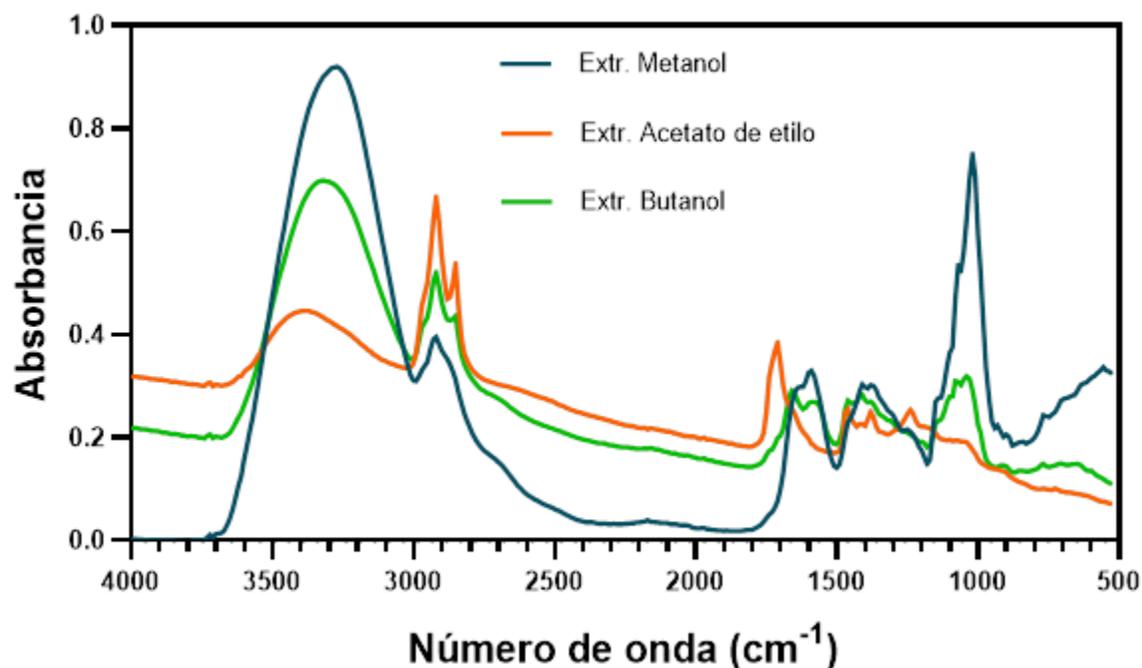


Figura 8. Espectro de absorción infrarroja de los extractos obtenidos.

### 6.5. Actividad Antifúngica de los Extractos Obtenidos

Para determinar si los solventes utilizados durante la extracción secuencial permitieron recuperar los compuestos de interés, se evaluó la actividad antifúngica de los extractos obtenidos. Los resultados muestran que a una concentración de 2 mg/mL, el extracto metanólico inhibió 100% el crecimiento de *F. graminearum* RH1 (Figura 9). En contraste, los extractos obtenidos con acetato de etilo y butanol presentaron porcentajes de inhibición del 4 y 28%, respectivamente. Estos valores fueron menores ( $p \leq 0.05$ ) al observado en el extracto metanólico (Figura 9). Lo anterior sugiere que la mayor parte de los compuestos antifúngicos secretados por *Amycolatopsis* BX17, se lograron recuperar utilizando metanol como solvente de extracción.

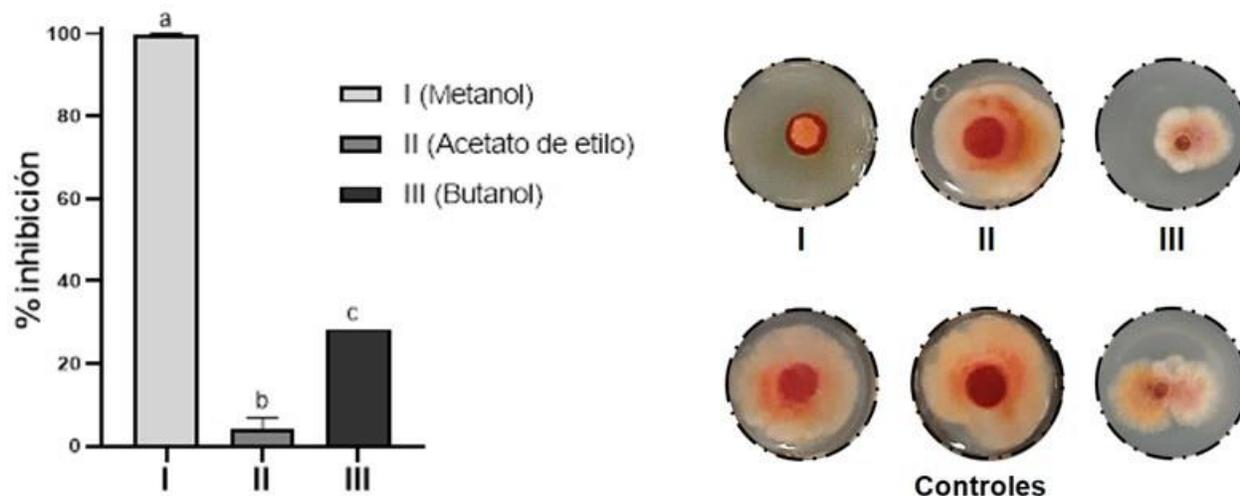


Figura 9. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos con extractos de distinta polaridad. Porcentaje de inhibición de los extractos sobre el crecimiento de *F. graminearum* RH1 (izquierda). Crecimiento de *F. graminearum* RH1 en presencia de los extractos (derecha). Concentración de solventes: 2 mg/mL

Una vez determinado que el extracto metanólico contiene los compuestos de interés, se decidió escalar la extracción de los metabolitos antifúngicos utilizando únicamente metanol como solvente de extracción. Inicialmente, el extracto crudo resultante presentó una apariencia de color verde oscuro y consistencia viscosa. Mientras que, después del proceso de pre-purificación, se obtuvo un polvo amorfo de color amarillo. Los rendimientos y características del extracto se muestran en el Cuadro 3.

Para confirmar la obtención de los metabolitos antifúngicos, se evaluó la actividad del extracto metanólico pre-purificado utilizando distintas concentraciones. Se observó que suplementando al medio de crecimiento con 0.5 y 1 mg/mL del extracto, el crecimiento de *F. graminearum* RH1 se inhibió 100% (Figura 10). Mientras que a una concentración de 0.25 mg/mL, el porcentaje de inhibición fue del 91% y existen diferencias ( $p \leq 0.05$ ) respecto a las dos concentraciones más altas usadas (Figura 10).

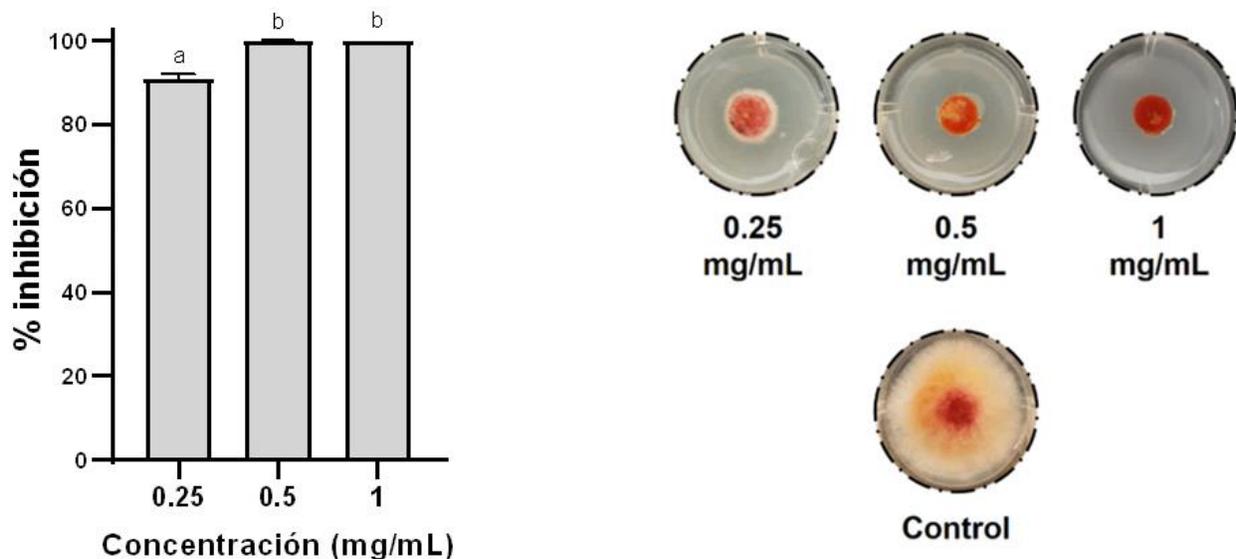


Figura 10. Actividad antifúngica del extracto metanólico pre-purificado. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico sobre el crecimiento de *F. graminearum* RH1 (izquierda). Crecimiento de *F. graminearum* RH1 en presencia del extracto metanólico a distintas concentraciones (derecha).

#### 6.6. Perfil Global de Metabolitos Extracelulares de *Amycolatopsis* BX17

En las Figuras 11 y 12 se muestran los cromatogramas típicos de los experimentos MS<sup>E</sup>, correspondientes a los triplicados del extracto pre-purificado en modo ESI W (+) y ESI W (-), respectivamente. Como se observa, la distribución de picos y su intensidad fue similar en los triplicados en ambos modos.

En modo ESI W (+) se detectaron 429 biomoléculas en un rango de  $m/z$  85.0306 - 1210.704, de los cuales, 62 compuestos fueron identificados. En modo ESI W (-) se detectaron 162 biomoléculas en un rango de  $m/z$  80.9652 - 1354.747, de los cuales, 10 compuestos fueron identificados (Anexo 11.1 y 11.2). En los Cuadros 4 y 5 se enlistan los compuestos con actividad biológica identificados en polaridad ESI (+) y ESI (-), respectivamente. En total, se encontraron 20 compuestos bioactivos, 15 en modo positivo y 5 en modo negativo. Respecto a las aplicaciones de los metabolitos hallados, la tobramicina y la neomicina B se utilizan como antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de infecciones bacterianas (Vardanyan y Hruby, 2006). Por su parte, la tetronasina, el aframodial y la blasticidina S presentan actividad antibacteriana y antifúngica (Ayafor *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1988; Takeuchi *et al.*, 1958). Adicionalmente, compuestos como la estaquiosa, el levan y el

ácido benzoico se utilizan como aditivos alimentarios. Mientras que metabolitos como el ácido siálico, el miglitol, la piridoxamina, la lactulosa y el acebutolol se emplean como fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades. Otras moléculas como el fenilacetato de rodinilo, el 3-fenilpropanol y el N-metilantranilato de etilo se usan como agentes aromatizantes (Kim *et al.*, 2019; Royal Society of Chemistry., 2020; Wishart *et al.*, 2018). Finalmente, se identificó la presencia de ácido indolacético (AIA), hormona vegetal que desempeña un papel clave en el desarrollo de raíces y brotes (Prusty *et al.*, 2004).

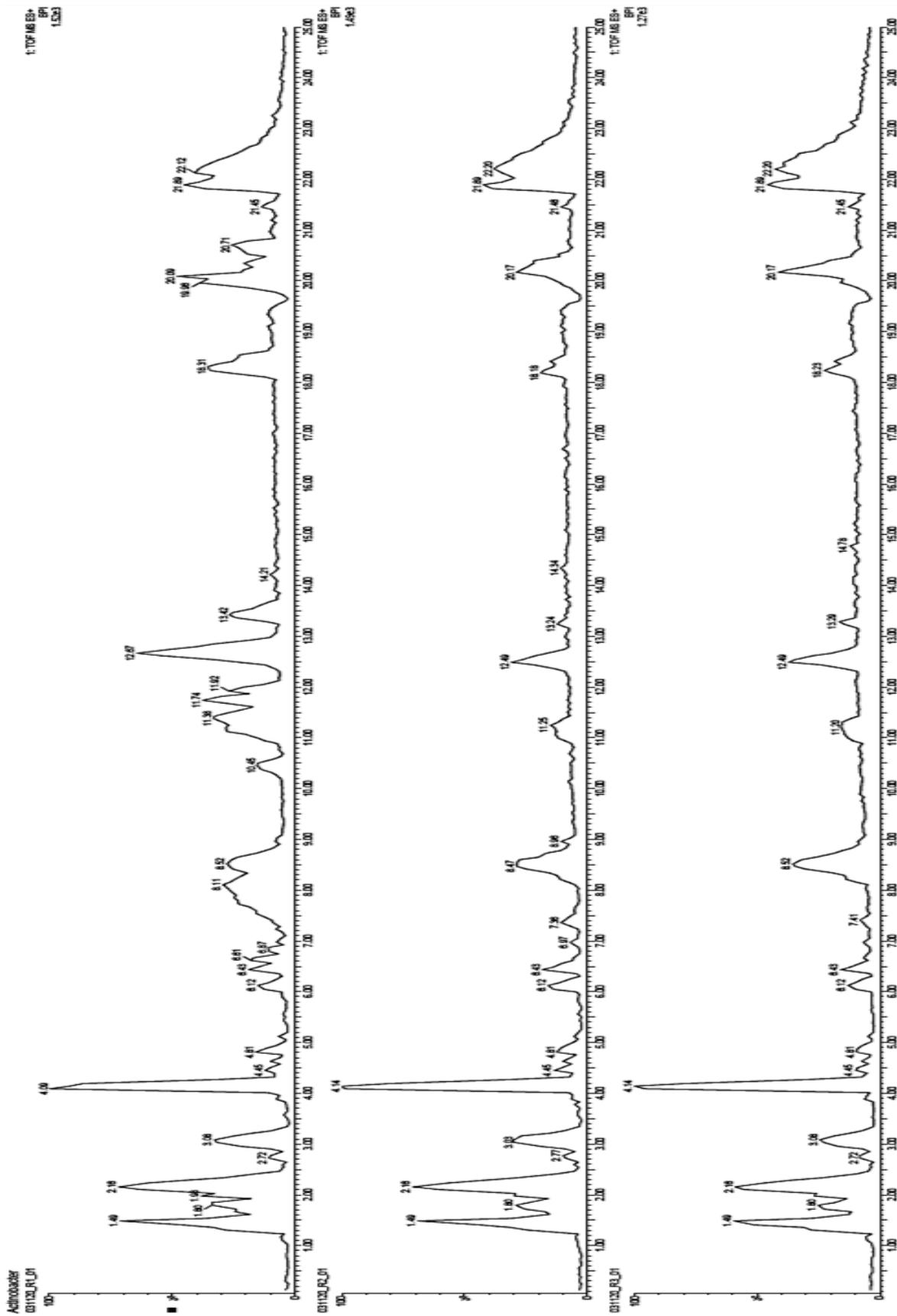


Figura 11. Cromatograma típico de iones totales comparativo entre las muestras R1, R2 y R3 en modo ESI W (+).

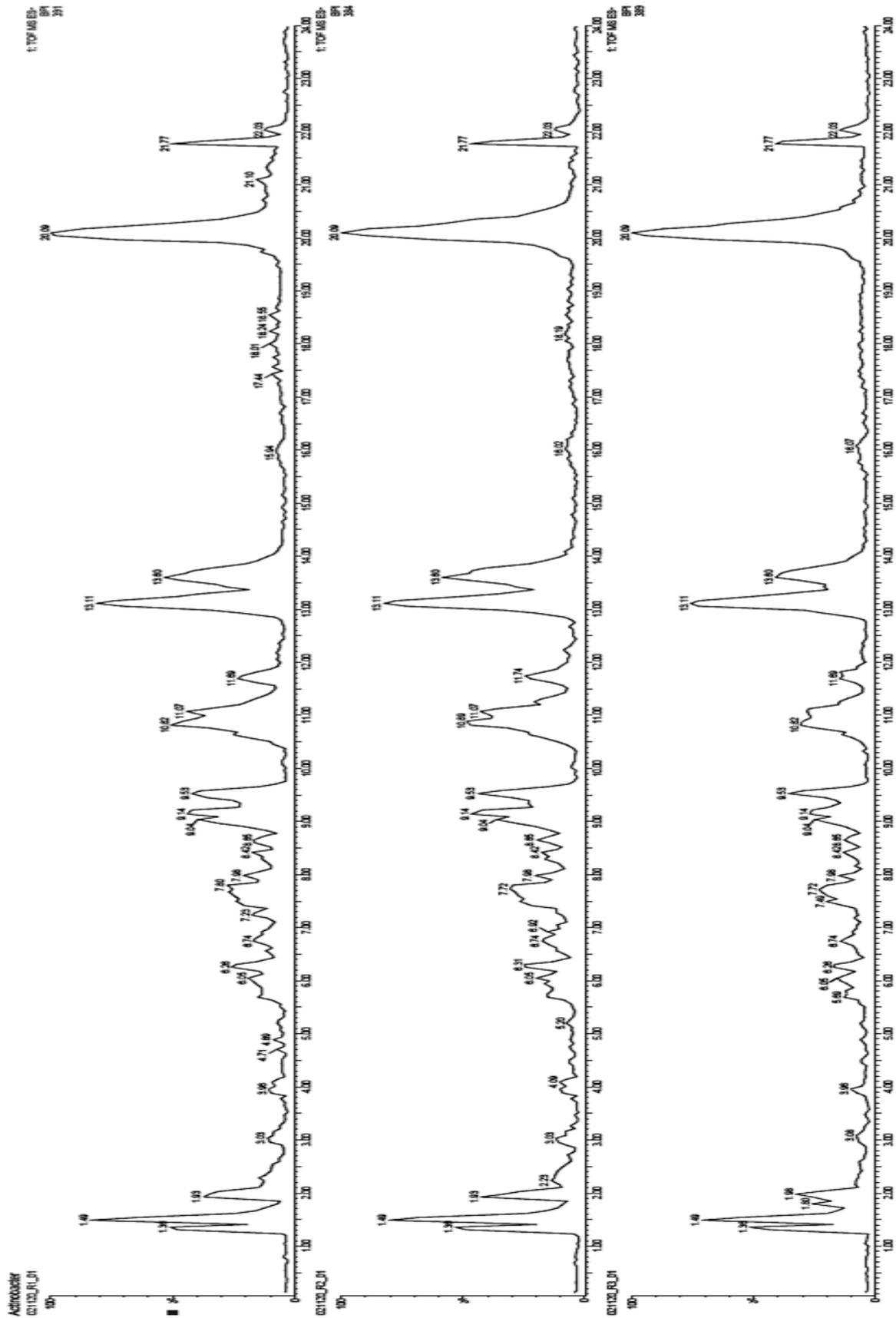


Figura 12. Cromatograma típico de iones totales comparativo entre las muestras R1, R2 y R3 en modo ESI W (-).

Cuadro 4. Compuestos con actividad biológica identificados en polaridad ESI (+).

#	m/z	Carga	Tiempo de retención (min)	Descripción aceptada	Aductos	Fórmula	Score	Error de masa (ppm)	Aplicaciones
1	689.2143	1	1.41	Estaquiosa	M+Na	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>21</sub>	53.4	4.824336	Edulcorante, prebiótico
2	292.1036	1	1.49	Ácido N-acetil-alfa-neuramínico (ácido siálico)	M+H-2H <sub>2</sub> O, M+H-H <sub>2</sub> O, M+H	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>9</sub>	52.7	2.959273	Tratamiento de la miopía distal
3	527.16	1	1.49	Levan	M+Na, M+K	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	56.4	3.532561	Encapsulante, espesante
4	707.225	1	1.49	Melibiosa	2M+Na	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	53.6	4.854575	Separación de proteínas en columna
5	450.2519	1	2.28	Tobramicina	M+H-H <sub>2</sub> O	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	51.7	-8.489586	Antibiótico aminoglucósido
6	423.1984	1	2.34	Blasticidina S	M+H-2H <sub>2</sub> O, M+H-H <sub>2</sub> O, M+H	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	50.5	-26.926463	Antifúngico peptídil nucleósido, antibiótico
7	172.0973	1	2.54	Miglitol	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	54.4	2.278885	Antihiperglucémico
8	189.1243	1	3.08	(D)-fagomina	M+ACN+H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	50	6.135140	Reductor de glucosa en sangre postprandial, modula la adhesión bacteriana
9	201.1239	1	3.65	Piridoxamina	M+CH <sub>3</sub> OH+H	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53	3.282599	Vitamina B6
10	197.1293	1	4.89	N-metilntranilato de etilo	M+NH <sub>4</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	57.9	4.599104	Agente aromatizante
11	176.072	1	5.38	Ácido indolacético	M+H	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	50.5	7.972104	Fitohormona
12	357.1821	1	5.38	Aframodial	M+K	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	56.6	-1.665825	Antifúngico, antibacteriano, citotóxico
13	297.1825	1	5.51	Fenilacetato de rodinilo	M+Na	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	56	-0.044461	Agente aromatizante
14	105.035	1	11.12	Ácido benzoico	M+H-H <sub>2</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	55.4	12.075786	Conservante de alimentos
15	119.0871	1	14.39	3-fenil-1-propanol	M+H-H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	54.3	11.473428	Agente aromatizante

Fuente: Kim *et al.*, 2019; Royal Society of Chemistry., 2020; Wishart *et al.*, 2018.

Cuadro 5. Compuestos con actividad biológica identificados en polaridad ESI (-).

#	m/z	Carga	Tiempo de retención (min)	Descripción aceptada	Aductos	Fórmula	Score	Error de masa (ppm)	Aplicaciones
1	217.0293	1	1.49	Ácido glucónico	M-H, M+Na-2H	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	50.2	-7.073718	Fármaco, antiséptico, aditivo alimentario
2	377.0847	1	1.49	Lactulosa	M-H, M+Cl, M+K-2H	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	52.1	-2.658010	Fármaco (laxante)
3	671.3914	1	7.05	Acebutolol	2M-H	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	55.7	-16.457516	Antihipertensivo y antiarrítmico
4	613.3092	1	8.42	Neomicina B	M-H	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub>	52.6	6.845016	Antibacteriano aminoglucósido
5	623.3681	1	9.35	Tetronasina	M+Na-2H	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	53.8	19.183878	Antibiótico ionóforo, antifúngico, citotóxico

Fuente: Kim *et al.*, 2019; Royal Society of Chemistry., 2020; Wishart *et al.*, 2018.

## 6.7. Identificación de Compuestos Antifúngicos Mediante Análisis por Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS) Dirigido

A partir del perfil global de metabolitos extracelulares de *Amycolatopsis* BX17 mediante el análisis MS<sup>E</sup>, utilizando los valores m/z de los compuestos de interés, se identificó la presencia de una molécula posiblemente correspondiente al metabolito equinosporina (Cuadro 6). Con base en su fórmula química, la equinosporina posee un valor m/z teórico de 224.0559, mientras que el valor m/z encontrado fue de 224.0560 en un tiempo de retención de 3.08 min en el modo ESI W (+). En la Figura 13 se presenta el perfil de abundancia y el montaje tridimensional del compuesto encontrado. Como se observa, en las tres muestras fue posible identificar la presencia de dicha molécula y, además, con abundancias similares.

Cuadro 6. Posible antifúngico encontrado mediante el análisis MS<sup>E</sup>, modo ESI W (+).

Compuesto	Fórmula	m/z teórico	m/z encontrado	Tiempo de retención (min)	Presente en muestra:
Equinosporina	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	224.0559	224.0560	3.08	R1, R2 y R3

Una vez conocida la posible presencia de la equinosporina y su perfil de abundancia en las muestras, se realizó un análisis MS/MS dirigido utilizando los datos de m/z calculada y el tiempo de retención. En las Figuras 14 y 15 se presenta el cromatograma de iones extraídos y el espectro de masas de la posible identificación de la equinosporina, respectivamente. Como se señala en el espectro de masas, el ion molecular presentó un valor m/z (%) = 224.4472 (10) [M + H]<sup>+</sup> (Calculado para C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>H, 224.0559). Además, se observaron iones fragmento en 196.4069 (35), 178.3682 (18) [M – CHO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 161.3221 (5), 151.3052 (68), 133.2726 (25), 123.2615 (100) y 107 (10).

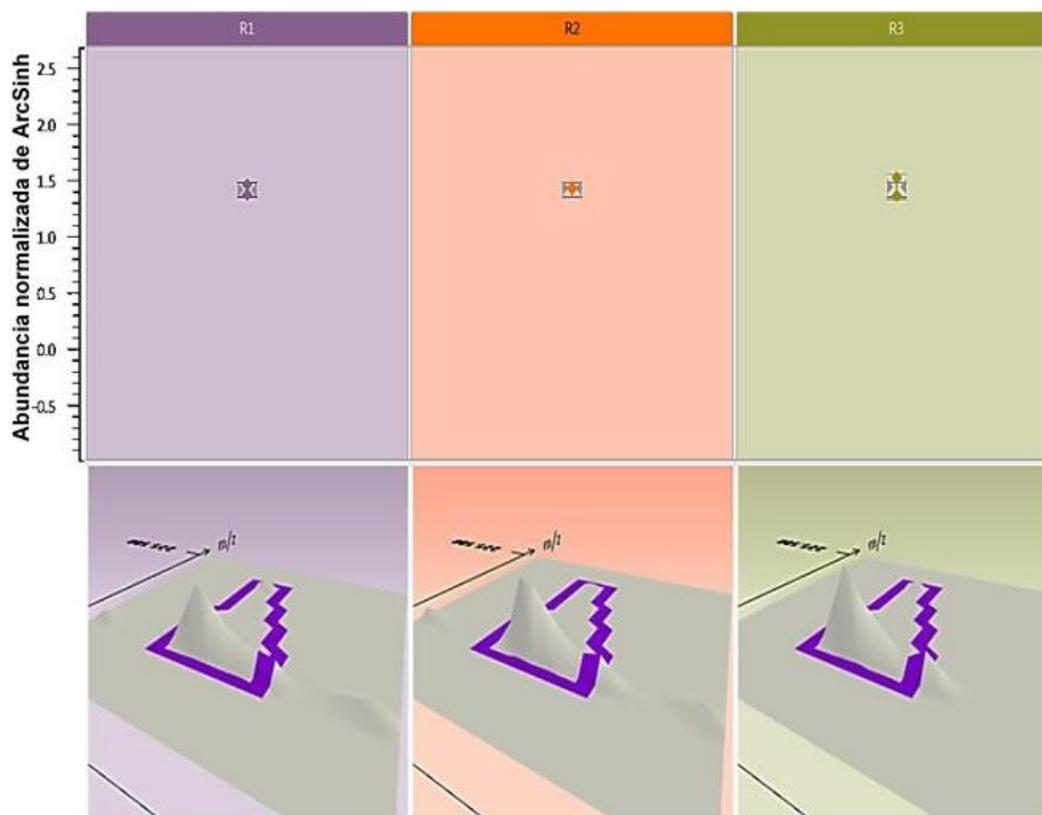


Figura 13. Perfil de abundancia de la posible identificación de Equinosporina.  $R_t = 3.08$  min,  $m/z$  detectado = 224.0560.

101120\_MSMS\_W+\_R1\_05

1: TOF MSMS ES+  
TIC  
400

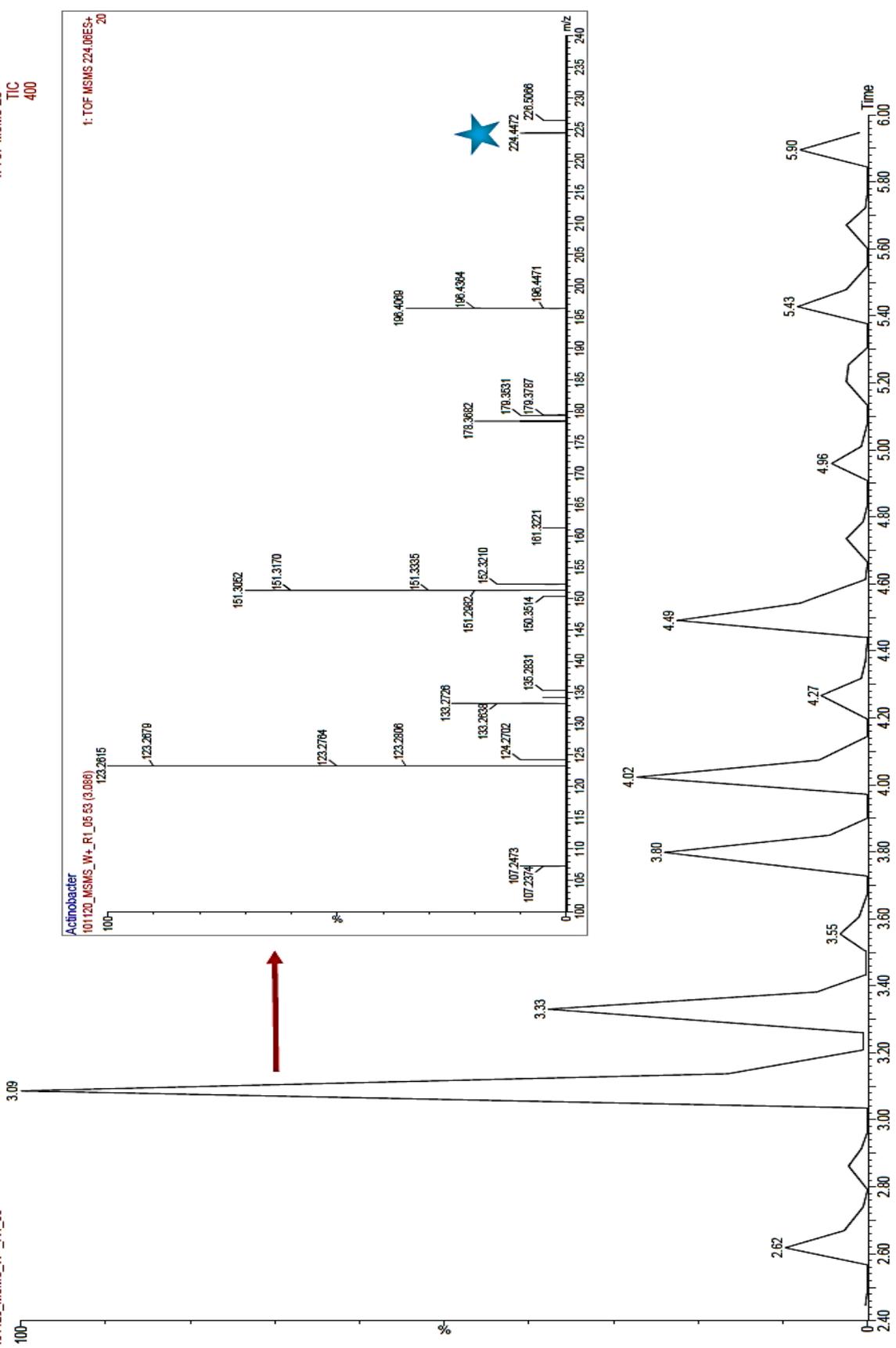


Figura 14. Cromatograma de iones extraídos y espectro de masas de la posible identificación de la Equinosporina.  $R_t = 3.086$  min,  $m/z$  cal = 224.0559, en la muestra R1.

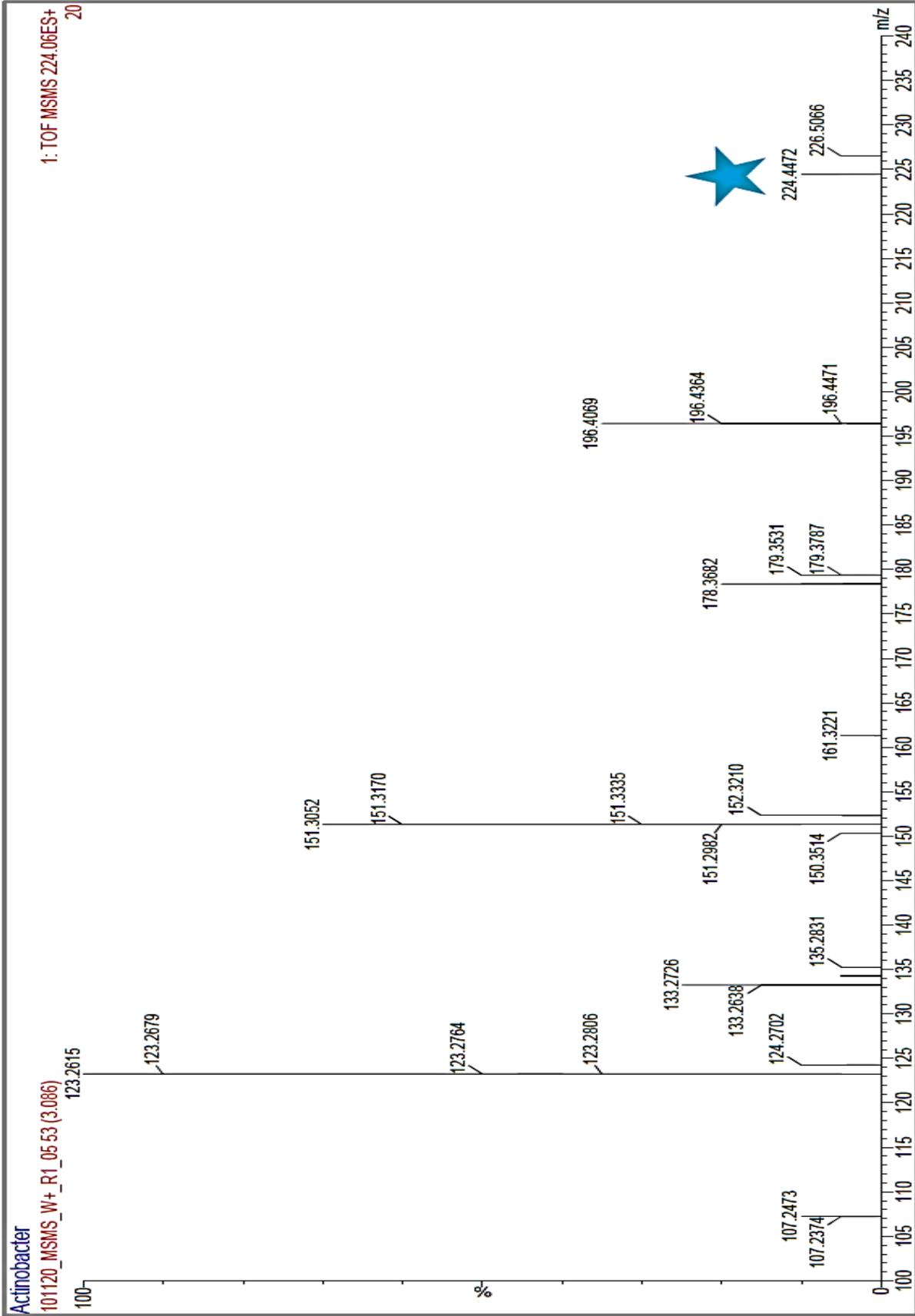


Figura 15. Espectro de masas de la posible identificación de la Equinosporina. Rt= 3.086 min, m/z cal= 224.0559 en la muestra R1.

## 7. DISCUSIÓN

Actualmente, los hongos fitopatógenos son los principales agentes causantes de enfermedades en la agricultura, provocando pérdidas económicas y ecológicas a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012; Doehlemann *et al.*, 2017). En este contexto, se conoce que *Fusarium graminearum* es un importante patógeno de cereales. Particularmente en maíz, causa pudrición de raíz, tallo y mazorca (Agrios, 2005; Ye *et al.*, 2013). Para el manejo de estas enfermedades se han utilizado ampliamente fungicidas químicos. No obstante, su aplicación inadecuada en altas dosis puede promover el desarrollo de resistencia en los hongos. Además, el uso de agentes químicos ha causado daños al medio ambiente y a la salud humana (Aktar *et al.*, 2009). Por lo tanto, es importante la búsqueda de alternativas sustentables que permitan el control de *Fusarium* en la agricultura.

Previamente, nuestro grupo de investigación reportó que *Amycolatopsis* BX17 antagoniza a *F. graminearum* RH1 en ensayos de cultivo dual (Cabrera *et al.*, 2020). Los mecanismos de acción mediante los cuales las actinobacterias inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos incluyen la antibiosis, competición por nutrientes, parasitismo, producción de sideróforos y producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas (Bhatti *et al.*, 2017; Doumbou *et al.*, 2001; El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006). Debido a la capacidad de las actinobacterias para producir diversos compuestos bioactivos, se ha planteado que la antibiosis es su principal mecanismo de acción para inhibir a organismos fitopatógenos (Barka *et al.*, 2016).

Para utilizar cepas con actividad antifúngica en estrategias de biocontrol, es importante realizar experimentos que contribuyan a comprender las complejas interacciones entre la planta, el patógeno, el antagonista y el medio ambiente. Esto permite aumentar la eficacia de las cepas durante su aplicación en campo. Considerando lo anterior, se evaluó el efecto de *Amycolatopsis* BX17 sobre la infección por *F. graminearum* RH1 mediante experimentos *ex situ* en plantas de maíz (Figura 4). Se observó que la cepa BX17 ejerció un efecto protector en las plantas de maíz contra la infección por *F. graminearum* RH1. Por otro lado, los síntomas observados en las raíces de las plantas infectadas con *F. graminearum* RH1 (Figura 4C), fueron consistentes con lo reportado por Ye y colaboradores (2013), quienes realizaron una caracterización citológica del maíz durante la infección por *F. graminearum* utilizando líneas isogénicas cercanas (NIL).

Encontraron que las raíces de las plantas sensibles S-NIL fueron colonizadas por el hongo, causando necrosis, contracción y oscurecimiento de las células de la raíz. Adicionalmente, Zhou y colaboradores (2018), informaron que la infección por *F. graminearum* indujo la elongación de brotes e inhibió el crecimiento de las raíces en plántulas de maíz.

Para determinar si el efecto protector que mostró la cepa BX17 en plantas de maíz contra la infección de *F. graminearum* RH1 es debido a la acción de compuestos antifúngicos secretados por la bacteria, se desarrolló un sistema de cultivo en medio agarizado que permitió recuperar los metabolitos secretados por la bacteria. Se observó que al inocular el hongo en el medio agarizado conteniendo los metabolitos extracelulares de la cepa BX17, el desarrollo fúngico se inhibió completamente (Figura 5). Esta evidencia confirma que la inhibición del crecimiento del hongo es debido a la acción de compuestos antifúngicos secretados por la cepa BX17. Diversos estudios han propuesto que la capacidad de las actinobacterias para colonizar la rizósfera y la raíz de cultivos agrícolas es esencial para el control biológico de fitopatógenos (Barka *et al.*, 2016; Doumbou *et al.*, 2001). Esta interacción con las raíces desempeña un papel importante en la salud de las plantas debido a la capacidad de las actinobacterias para producir diversos metabolitos primarios y secundarios, incluidos antifúngicos que previenen la invasión y el establecimiento de patógenos (van der Meij *et al.*, 2017). Por lo tanto, se propone que el efecto protector de *Amycolatopsis* BX17 se ejerció activamente creciendo en la raíz o alrededor de ella, evitando así la colonización de los tejidos vegetales de la planta de maíz por el fitopatógeno *F. graminearum* RH1 mediante la secreción de compuestos antifúngicos que inhiben el crecimiento del hongo.

Con el objetivo de caracterizar los compuestos antifúngicos sintetizados y secretados por *Amycolatopsis* BX17, primero se realizó una cinética de antagonismo en medio agarizado. Esto coadyuvó a establecer el tiempo en que el sistema de cultivo permite una mayor acumulación de metabolitos extracelulares con actividad antifúngica, lo cual se puede correlacionar con la mayor secreción de compuestos por la actinobacteria. Después de dos días de crecimiento, los metabolitos que secretó la cepa BX17 inhibieron 78% el crecimiento de *F. graminearum* RH1 (Figura 6 y 7). Mientras que, a partir del tercer día de crecimiento, los metabolitos secretados por la bacteria antagonizaron 100% el desarrollo del hongo (Figura 6 y 7). Este efecto prevaleció hasta el final del experimento, es decir, nueve días posterior a la inoculación de BX17 (Figura 6 y 7). En este contexto, se ha descrito que el ciclo de vida de las actinobacterias inicia con la germinación de las esporas para formar hifas vegetativas. Durante las primeras 30 h de desarrollo, ocurre un proceso

de extensión de las hifas y ramificación, resultando en la formación de un micelio vegetativo altamente ramificado (Angert, 2005). Posteriormente, en respuesta a factores de estrés, como el agotamiento de nutrientes, inicia una etapa de diferenciación celular donde una parte del micelio vegetativo se degrada de manera autolítica a través de la muerte celular programada; esto conduce a la liberación de nutrientes en el medio que se utilizarán para la formación de hifas aéreas y esporas (van der Meij *et al.*, 2017). Simultáneamente, ocurre una cascada de señalización compleja que desencadena la producción de un tensoactivo que recubre las hifas aéreas, ayudándolas a crecer lejos del sustrato vegetativo (Chater y Horinouchi, 2003; Claessen *et al.*, 2004). De manera interesante, el inicio de la diferenciación celular coincide con la producción de metabolitos secundarios bioactivos, que proporcionan protección contra los microorganismos competidores atraídos por los nutrientes liberados durante la apoptosis (Barka *et al.*, 2016; Flärdh y Buttner, 2009). Esta particularidad en el ciclo de vida de las actinobacterias, sugiere que después de dos días de crecimiento, *Amycolatopsis* BX17 posiblemente se encontraba en una etapa de transición hacia el desarrollo de las hifas aéreas reproductivas, debido al agotamiento de nutriente en el medio. De esta forma, la etapa de diferenciación celular se coordinó con el inicio de la síntesis y secreción de los metabolitos antifúngicos que inhibieron a *F. graminearum* RH1.

Con base en la información de la cinética de antagonismo, se seleccionó el día cinco post-inoculación de BX17 para realizar la extracción de los compuestos antifúngicos secretados. Esto se hizo mediante extracción secuencial utilizando metanol, acetato de etilo y 1-butanol. Los extractos obtenidos se sometieron a análisis de FTIR medio ( $4\ 000 - 500\ \text{cm}^{-1}$ ). En este contexto, si bien la estructura química de los antifúngicos sintetizados por *Amycolatopsis* es diversa, se conoce que en general se trata de moléculas cíclicas. Además, la mayoría de los compuestos antifúngicos reportados poseen en su estructura amidas primarias y secundarias, así como grupos carbonilo e hidroxilo. Por lo tanto, la presencia de bandas asociadas a grupos hidroxilo, carbonilo y amidas en los espectros de infrarrojo de los extractos obtenidos (Figura 8), podrían indicar la extracción de moléculas químicamente similares a las moléculas previamente descritas, en el entendido de que cada extracto crudo se trata de un conjunto complejo de compuestos, por lo que son necesarios procesos de purificación para asignar bandas de forma precisa.

Para determinar si los solventes utilizados permitieron recuperar los compuestos de interés, se evaluó la actividad antifúngica de los extractos obtenidos. A una concentración de 2 mg/mL, se observó que el extracto metanólico inhibió 100% el crecimiento de *F. graminearum* RH1 (Figura

9). Mientras que los extractos obtenidos con acetato de etilo y butanol, antagonizaron el crecimiento del hongo 4 y 28%, respectivamente (Figura 9). Estos resultados indicaron que la mayor parte de los compuestos antifúngicos secretados por BX17, se lograron recuperar utilizando metanol como solvente de extracción. Por lo que enseguida se escaló la extracción metanólica de los metabolitos. Posteriormente, se observó que, al suspender el extracto en metanol, algunas partículas se precipitaban. Debido a esto, se decidió realizar una etapa de pre-purificación para eliminar las partículas no solubles en el solvente. Para confirmar que la fase soluble en metanol contiene los compuestos de interés, se determinó la actividad antifúngica de la fracción pre-purificada. Se observó que suplementando el medio de crecimiento con 0.5 y 1 mg/mL del extracto, el crecimiento de *F. graminearum* RH1 se inhibió 100% (Figura 10). Mientras que al suplementar 0.25 mg/mL del extracto, el porcentaje de inhibición fue del 91% ( $p \leq 0.05$ ; Figura 10). Lo anterior confirmó que los compuestos antifúngicos secretados por la bacteria están presentes en la fase soluble en metanol. Mientras que las partículas no solubles posiblemente corresponden a pigmentos melanoides, una clase de compuestos que producen las actinobacterias. Estos pigmentos pueden ser de color rojo, amarillo, naranja, rosa, verde marrón, marrón claro, marrón verdoso, azul o negro, según la cepa, el medio utilizado y la edad del cultivo (Barka *et al.*, 2016; Tan y Goodfellow, 2012). Esto es consistente con lo observado, ya que el agar donde se acumularon los metabolitos extracelulares de BX17 presentó un color verde oscuro; obteniéndose inicialmente un extracto metanólico con la misma coloración. Mientras que después de la pre-purificación, las características físicas del extracto fueron un polvo amorfo de color amarillo. Posiblemente debido la eliminación de los compuestos melanoides difundidos en el medio por la bacteria.

Posteriormente, el extracto metanólico pre-purificado se sometió a un análisis metabolómico para obtener el perfil global de metabolitos. En total, se identificaron 62 compuestos en modo ESI W (+) y 10 en modo ESI W (-) (Anexo 11.1 y 11.2). Del total de moléculas identificadas, 20 corresponden a compuestos bioactivos; 15 en modo positivo y 5 en modo negativo (Cuadro 4 y 5). Entre los metabolitos identificados se encuentran la tobramicina, la neomicina B, la tetronasina, la blasticidina S y el aframodial, los cuales se han descrito como metabolitos con actividad antifúngica y/o antibacteriana (Kim *et al.*, 2019; Wishart *et al.*, 2018). La tobramicina se ha reportado como un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro producido por *Streptomyces tenebrarius*, utilizado contra diversos tipos de infecciones bacterianas, en particular infecciones por microorganismos Gram negativos (Koch *et al.*, 1973). Tales como la prevención y el

tratamiento de infecciones pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística (Xiao *et al.*, 2014). Por su parte, la neomicina B es un antibiótico aminoglucósido aislado de cultivos de *Streptomyces fradiae* que presenta actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluidas *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Proteus*, *S. aureus* y especies de *Serratia* (O'Donnell *et al.*, 2015; Vardanyan y Hruby, 2006). La tetronasina es un antibiótico ionóforo producido por *Streptomyces longisporoflavus* que presenta actividad contra microorganismos ruminales como *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus casei*, *Lachnospira multiparus* y *Eubacterium ruminantium*, así como contra el hongo del rumen *Neocallimastix frontalis* RE1 y *N. sp.* LM1 (Phillips y Gordon, 1992; Newbold *et al.*, 1988). Por otra parte, la blasticidina S, producida por *Streptomyces griseochromogenes*, presentó actividad contra diversas bacterias, pero particularmente mostró una fuerte inhibición contra especies de *Pseudomonas*, y sobre los hongos *Pyricularia oryzae* y *Sclerotinia mali* (Takeuchi *et al.*, 1958). Finalmente, el aframodial, un dialdehído diterpenoide aislado de semillas de *Aframomum daniellii*, mostró importante actividad antifúngica contra *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula anomala* y *Candida utilis*. El aframodial también se ha aislado de otras especies de *Aframomum*, *Alpinia galanga* y *Zingiber officinale* (Ayafor *et al.*, 1994; Kimbu *et al.*, 1979). De manera interesante, se observó que cuatro de los cinco compuestos descritos se han aislado previamente a partir de cultivos de *Streptomyces* (*S. tenebrarius*, *S. fradiae*, *S. longisporoflavus* y *S. griseochromogenes*). En este contexto, se ha reportado ampliamente que, dentro de los procariotas, el género *Streptomyces* es el principal productor de compuestos bioactivos (Barka *et al.*, 2016; Hamedi *et al.*, 2017). Además, dado que los genes biosintéticos de antibióticos pueden ser compartidos mediante la transferencia horizontal de genes, no es un hecho aislado que cepas de diferentes especies e incluso de distintos géneros puedan producir los mismos antibióticos (Yutin, 2013). Sin embargo, es importante destacar que, además de *Streptomyces*, no se han reportado otros microorganismos capaces de producir estos compuestos. Lo que contribuye al potencial biotecnológico de la cepa BX17. Por otro lado, el aframodial se ha obtenido únicamente a partir de plantas, por lo que, de confirmarse su producción por la cepa BX17, sería la primera vez que este compuesto es sintetizado en procariotas.

Aunado a los compuestos descritos anteriormente, el perfil global de metabolitos reveló la presencia de moléculas empleadas como fármacos y aditivos alimentarios (Cuadro 4 y 5). Adicionalmente, es interesante la identificación del ácido indolacético (AIA), ya que se trata de

una hormona vegetal que regula muchos procesos celulares básicos, incluida la división, elongación y diferenciación celular. Esta hormona también conduce a la disminución de la longitud de las raíces y al aumento de la formación de pelos radicales, lo que mejora el potencial de la planta para absorber los nutrientes del suelo (Bhatti *et al.*, 2017; Prusty *et al.*, 2004). En este sentido, se ha documentado ampliamente la producción de AIA en actinobacterias, principalmente en especies de *Streptomyces* (Goudjal *et al.*, 2013; Myo *et al.*, 2019). Asimismo, se ha reportado que otras actinobacterias como *Actinomyces* spp., *Nocardia* sp., *Frankia* sp. y *Kitasatospora* sp. sintetizan AIA (Bhatti *et al.*, 2017; El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006). Es importante señalar que, en los experimentos *ex situ* en plantas de maíz, se observó que las plantas co-inoculadas con *F. graminearum* RH1 y la cepa BX17, al igual que las plantas inoculadas solamente con la bacteria, además de no presentar daño celular, aparentemente desarrollaron una mayor cantidad de pelos radicales, respecto a las plantas control (Figura 4C). Esto sugiere que además del efecto protector que ejerció *Amycolatopsis* BX17 hacia las plantas de maíz contra la infección del fitopatógeno RH1, posiblemente también estimuló el crecimiento del sistema radicular mediante la producción de AIA. Es necesario realizar experimentos adicionales para corroborar la presencia del AIA y su posible efecto.

Para identificar la posible presencia en el extracto pre-purificado, de compuestos antifúngicos producidos por *Amycolatopsis* spp. previamente reportados, se determinaron sus perfiles de abundancia. Para ello, se indagó su presencia en los cromatogramas de iones totales del análisis MS<sup>E</sup>, utilizando los valores m/z teóricos de cada compuesto. Derivado de lo anterior, se observó la posible presencia de la equinosporina (Cuadro 6). Por lo que enseguida se realizó un análisis MS/MS dirigido para su identificación, utilizando los datos de m/z calculada y el tiempo de retención. En el espectro de masas de la posible identificación de la equinosporina (Figura 15), se señala al ión molecular con un valor m/z de 224.4472 [M + H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>H, 224.0560). El ion molecular y el patrón de fragmentación observado es idéntico al reportado por Dübeler y colaboradores (2002), quienes determinaron la estructura de la equinosporina aislada a partir de *Streptomyces erythraeus*. También, Xu y colaboradores (2019), confirmaron estos datos en la equinosporina obtenida de un cultivo de *Amycolatopsis* sp. YIM PH20520.

Los resultados del análisis MS/MS indican que la cepa BX17 posiblemente está sintetizando a la equinosporina. Esto resulta interesante, ya que la cepa de *Amycolatopsis* YIM PH20520, aislada del suelo rizosférico de *Panax notoginseng*, mostró actividad antifúngica contra *Fusarium*

*oxysporum* y *Fusarium solani*, hongos causantes de la pudrición de la raíz de *P. notoginseng*. La inhibición de estos fitopatógenos fue mediante la acción de la equinosporina y la 7-desoxiequinosporina. Particularmente la equinosporina exhibió la actividad antifúngica más potente contra ambas cepas con una CMI de 64 µg/mL (Xu *et al.*, 2019). Lo anterior fortalece el argumento de que las moléculas responsables de antagonizar a *Fusarium graminearum* RH1, un hongo del mismo género que los patógenos de *P. notoginseng*, posiblemente correspondan a las equinosporinas, o bien, a moléculas químicamente similares. Cabe destacar que, hasta el momento, solo existen dos reportes donde se ha descrito la producción de moléculas tipo equinosporinas producidas por actinobacterias. Sin embargo, es necesario aislar y caracterizar la molécula sintetizada por *Amycolatopsis* BX17 para confirmar su estructura química. Conocer esta información permitirá proponer el mecanismo de acción mediante el cual estas moléculas inhiben el crecimiento micelial de *F. graminearum* RH1, y brindará información valiosa para profundizar acerca de la función ecológica que desempeña el género *Amycolatopsis* en suelos agrícolas, como el sistema milpa.

## 8. CONCLUSIONES

*Amycolatopsis* sp. BX17 ejerce *ex situ* un efecto protector en las plantas de maíz contra la infección por *F. graminearum* RH1. La recuperación de los metabolitos extracelulares (<3 kDa) de la cepa BX17 mediante el sistema de cultivo desarrollado, indica que el efecto protector es debido a la acción de compuestos antifúngicos sintetizados y secretados por la bacteria, cuya acción previene la invasión y el establecimiento del hongo fitopatógeno en los tejidos vegetales de la planta de maíz. La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos, indica que la mayor parte de los compuestos antifúngicos son solubles en metanol. Los compuestos bioactivos identificados en el perfil global de metabolitos del extracto metanólico pre-purificado, demuestran el potencial biotecnológico que posee la cepa BX17. Finalmente, la posible identificación de la equinosporina, revela que *Amycolatopsis* BX17 sintetiza al menos un tipo de moléculas responsables del efecto antagónico sobre *Fusarium graminearum* RH1. Es importante realizar estudios que permitan elucidar el mecanismo de acción de estos compuestos. Esto proporcionará información que coadyuve en la comprensión de las interacciones que *Amycolatopsis* BX17 establece con las comunidades microbianas presentes en el suelo del sistema milpa.

## 9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar experimentos *in situ* en plantas de maíz mediante pruebas en campo para confirmar el efecto protector de *Amycolatopsis* BX17 contra la infección por *Fusarium graminearum*. Esto contribuirá a determinar la estabilidad de la cepa BX17 en el suelo y proponer su posible aplicación en estrategias de biocontrol.

Caracterizar químicamente los compuestos antifúngicos sintetizados por la cepa BX17 mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). A partir de la información generada, se podrán realizar investigaciones enfocadas en interacciones moleculares, lo que permitirá comprender el mecanismo de acción mediante el cual estas moléculas inhiben a *Fusarium graminearum* RH1.

Confirmar la presencia de los compuestos bioactivos identificados en el perfil global de metabolitos mediante MS/MS y RMN, lo cual, contribuirá al potencial biotecnológico de *Amycolatopsis* BX17.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmohsen U.R., Grkovic T., Balasubramanian S., Kamel M.S., Quinn R.J. and Hentschel U. 2015. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances* 33:798–811.
- Adamek M., Alanjary M., Sale-Ortells H., Goodfellow, M., Bull A.T., Winkler M., Wibberg D., Kalinowski J. and Ziemert N. 2018. Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. *BMC Genomics* 19:426–441.
- Agrios G.N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. Fifth edition. New York. 386, 535 pp.
- Aguirre-Acosta E., Ulloa M., Aguilar S., Cifuentes J. y Valenzuela R. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85:76–81.
- Aktar M.W., Sengupta D. and Chowdhury A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2(1):1–12.
- Alduina R., Gallo G., Renzone G., Weber T., Scaloni A. and Puglia A.M. 2014. Novel *Amycolatopsis balhimycina* biochemical abilities unveiled by proteomics. *FEMS Microbiology Letters* 351:209–215.
- Angert E.R. 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature reviews* 3:214–224.
- Ayafor J.F., Tchuendem M.H.K., Nyasse B., Tillequin F. and Anke H. 1994. Aframodial and other bioactive diterpenoids from *Aframomum* species. *Pure and Applied Chemistry* 66(10-11): 2327–2330
- Baldrian P., Kolarík M., Stursová M., Kopecký J., Valásková V., Vetrovský T., Zifcaková L., Snajdr J., Rídl J., Vlcek C. and Vorísková J. 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The ISME journal* 6:248–258.
- Banskota A.H., McAlpine J.B., Sorensen D., Ibrahim A., Aouidate M., Pirae M., Alarco A.M., Farnet C.M. and Zazopoulos E. 2006. Genomic analyses lead to novel secondary metabolites part 3 ECO-0501, a novel antibacterial of a new class. *The Journal of Antibiotics* 59(9):533–542.
- Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y. and Wezel G.P. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(1):1–43.
- Baudoin E., Benizri E. and Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35(9):1183–1192.
- Bauermeister A., Calil F. A., Pinto F. das C. L., Medeiros T.C. T., Almeida L.C., Silva L.J., de Melo I.S., Zucchi T.D., Costa-Lotufo L.V. and Moraes L.A.B. 2018. Pradimicin-IRD from *Amycolatopsis* sp. IRD-009 and its antimicrobial and cytotoxic activities. *Natural Product Research* 33(12):1713–1720.
- Barna J.C. and Williams D.H. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics

of the vancomycin group. *Annual Review of Microbiology* 38:339–357.

- Beemelmans C., Ramadhar R.T., Kim K.H., Klassen J.L., Cao S., Wyche T.P., Hou Y., Poulsen M., Bugni T.S., Currie C.R. and Clardy J. 2017. Macrotermycins A-D, glycosylated macrolactams from a termite-associated *Amycolatopsis* sp. M39. *Organic Letters* 19(5):1000–1008.
- Bhattacharyya T. and Pal D.K. 2015. The soil: A natural resource. En: R. K. Rattan, J.C. Katyal, B.S. Dwivedi, A.K. Sarkar, T. Bhattacharyya, J.C. Tarafdar, y S.S. Kukal (Eds). *Soil science: An introduction*. Indian Society of Soil Science, New Delhi, 1–19 pp.
- Bhatti A.B., Haq S. and Bhat R.A. 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis* 111:458–467.
- Bot A. and Benites J. 2005. The importance of soil organic matter, key to drought-resistant soil and sustained food production. FAO. Roma. 5–9 pp.
- Cabrera R., García-López H., Aguirre-von-Wobeser E., Orozco-Avitia J.A. and Gutiérrez-Saldaña A.H. 2020. *Amycolatopsis* BX17: An actinobacterial strain isolated from soil of a traditional milpa agroecosystem with potential biocontrol against *Fusarium graminearum*. *Biological Control* 147:104285.
- Chater K.F. and Horinouchi S. 2003. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* 48(1):9–15.
- ChemSpider – Search and share chemistry. (Último acceso: diciembre de 2020). <http://www.chemspider.com/>
- Chen C., Chen H.Y.H., Chen X. and Huang Z. 2019. Meta-analysis shows positive effects of plant diversity on microbial biomass and respiration. *Nature Communications* 10:1332–1340.
- Chen S., Wu Q., Shen Q. and Wang H. 2016. Progress in understanding the genetic information and biosynthetic pathways behind *Amycolatopsis* antibiotics, with implications for the continued discovery of novel drugs. *ChemBioChem; a European journal of chemical biology* 17(2):119–128.
- Claessen D., Stokroos I., Deelstra H.J., Penninga N.A., Bormann C., Salas J.A., Dijkhuizen L. and Wösten H.A.B. 2004. The formation of the rodlet layer of streptomycetes in the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Molecular Microbiology* 53(2):433–443.
- Clark D. S. 1971. Studies on the surface plate method of counting bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 17:943–946.
- Cui C.B., Liu H.B., Gu J.Y., Gu Q.Q., Cai B., Zhang D.Y. and Zhu T.J. 2007. Echinospirins as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from marine-derived *Streptomyces albogriseolus*. *Fitoterapia* 78(3):238–240.
- Dávila A.J.S. and Amoroso M.J. 2014. Current biotechnological applications of the genus *Amycolatopsis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30:1919–1926.
- Dean R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack K.E., Piero A.D., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. and Foster G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(4):414–430.
- Dobashi K., Matsusa N., Hamada M., Naganawa H., Takita T. and Takeuchi T. 1988. Novel antifungal antibiotics octacomycins. *The Journal of Antibiotics* 41(11):1525–1532.

- Doehlemann G., Ökmen B., Zhu W. and Sharon A. 2017. Plant pathogenic fungi. *Microbiology Spectrum* 5(1):23
- Dübeler A., Krastel P., Floss H.G. and Zeeck A. 2002. Biosynthesis of the antibiotic echinosporin by a novel branch of the shikimate pathway. *European Journal of Organic Chemistry* 2002(6):983–987.
- Doumbou C.L., Hamby-Salove M.K., Crawford D.L. and Beaulieu C. 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82(3):85–102.
- El-Tarabily K.A. and Sivasithamparam K. 2006. Non-streptomycete actinomycete as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* 38(7):1505–1520.
- FAO. 1996. El suelo. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de [http://www.fao.org/3/w1309s/w1309s04.htm#P5\\_56](http://www.fao.org/3/w1309s/w1309s04.htm#P5_56)
- Flärdh K. y Buttner M.J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews. Microbiology* 7(1):36–49.
- Foley J.A., DeFries R., Asner G.P., Barford C., Bonan G., Carpenter S.R., Chapin F.S., Coe M.T., Daily G.C., Gibbs H.K., Helkowski J.H., Holloway T., Howard E.A., Kucharik C.J., Monfreda C., Patz J.A., Prentice I.C., Ramankutty N., Snyder P.K. 2005. Global consequences of land use. *Science* 309(5734):570–574.
- Gallo G., Renzone G., Alduina R., Stegmann E., Weber T., Lantz A.E., Thykaer J., Sangiorgi F., Scaloni A. and Puglia A.M. 2010a. Differential proteomic analysis reveals novel links between primary metabolism and antibiotic production in *Amycolatopsis balhimycina*. *Proteomics* 10(7):1336–1358.
- Gallo G., Alduina R., Renzone G., Thykaer J., Bianco L., Eliasson-Lantz A., Scaloni A. and Puglia A.M. 2010b. Differential proteomic analysis highlights metabolic strategies associated with balhimycin production in *Amycolatopsis balhimycina* chemostat cultivations. *Microbial Cell Factories* 9:95–110.
- García-Lopez H. (2017). Actinomicetos del Alto Mezquital con potencial biotecnológico: Aislamiento, caracterización e identificación (tesis de pregrado). Universidad Autónoma Chapingo – Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. México.
- Genilloud O. 2017. Physiology of Actinobacteria. En: J. Wink, F. Mahommadipanah and J. Hamedi (eds). *Biology and biotechnology of Actinobacteria*. Springer, Cham, 151–180 pp.
- Goodfellow, M. 2012. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. Nov. En: M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig y W. Whitman (Eds). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, second Edition, volume five, the *Actinobacteria*, part A and B. Springer, Georgia, 33–34 pp.
- Goodfellow M. 1983. Ecology of *Actinomycetes*. *Annual Review of Microbiology* 37:189–216.
- Goudjal Y., Toumatia O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F. and Zitouni A. 2013. Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(10):1821–1829.
- Hamedi J., Poorinmohammad N. and Wink J. 2017. The role of Actinobacteria in biotechnology.

- En: J. Wink, F. Mahommadipanah and J. Hamedi (eds). *Biology and biotechnology of Actinobacteria*. Springer, Cham, 269–328 pp.
- He J., Yuan T. and Tang W.H. 2016. *Fusarium graminearum* maize stalk infection assay and associated microscopic observation protocol. *Bio-protocol* 6(23):e2034.
- Hernández-Hernández H.M., Chanona-Pérez J.J., Calderón-Domínguez G., Perea-Flores M.J., Mendoza-Pérez J.A., Vega A., Ligeró P., Palacios-González E. and Farrera-Rebollo R.R. 2014. Evaluación of agave fiber delignification by means microscopy techniques and image analysis. *Microscopy and Microanalysis* 20(5):1436–1446.
- Hill P., Kristufek V., Dijkhuizen L., Boddy C., Kroetsch D. and van Elsas J.D. 2011. Land use intensity controls Actinobacterial community structure. *Microbial Ecology* 61(2):286–302.
- Huang Y., Pasciak M., Liu Z., Xie Q. and Gamian A. 2004. *Amycolatopsis palatopharyngis* sp. nov., a potentially pathogenic actinomycete isolated from a human clinical source. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:359–363.
- Izuta S., Kosaka S., Kawai M., Miyano R., Matsuo H., Matsumoto A., Nonaka K., Takahashi Y., Ömura S. and Nakashima T. 2018. Dipyrimicin A and B, microbial compounds isolated from *Amycolatopsis* sp. K16-0194. *The Journal of Antibiotics* 71(5):535–537.
- Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B.A., Thiese P.A., Yu B., Zaslavsky L., Zhang J., Bolton E.E. 2019. PubChem 2019 update: improved Access to chemical data. *Nucleic acids res.* 2019. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Kimbu S.F., Njimi T.K., Sondengam B.L., Akinniyi J.A. and Connolly J.D. 1979. The structure of a labdane dialdehyde from *Afromomum daniellii* (Zingiberaceae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1:1303–1304.
- Koch K.F., Davis F.A. and Rhoades J.A. 1973. Nebramycin: separation of the complex and identification of factors 4, 5 and 5'. *The Journal of Antibiotics* 26(12):745–751.
- Kumari R., Sing P. and Lal R. 2016. Genetics and genomics of the genus *Amycolatopsis*. *Indian Journal of Microbiology* 56(3):233–246.
- Labeda D.P., Donahue J.M., Williams N.M., Sells S.F. and Henton M.M. 2003. *Amycolatopsis kentuckyensis* sp. Nov., *Amycolatopsis lexingtonensis* sp. No. And *Amycolatopsis pretoriensis* sp. Nov., isolated from equine placentas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1601–1605.
- Leslie J.F. and Summerell B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Iowa. 179 pp.
- Lin Y.T., Lin Y.F., Tsai I.J., Chang E.H., Jien S.H., Lin Y.J. and Chiu C.Y. 2019. Structure and diversity of soil bacterial communities in offshore islands. *Scientific Reports* 9:4689.
- Lin-Vien D., Colthup N.B., Fateley W.G. and Grasselli J.G. 1991. *The handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules*. Academic Press, Cambridge. 503 pp.
- Liu C., Jiang Y., Huang R., Jiang B., Zheng K. and Wu S. 2020. Diverse secondary metabolites from a lichen-derived *Amycolatopsis* strain. *Current Microbiology* 77:2104–2110.
- LPSN - List of procaryotic names with standing in nomenclature (último acceso: enero de 2021). <https://lpsn.dsmz.de/genus/amycolatopsis>
- Ludwing W., Euzéby J., Shumann P., Busse H.J., Trujillo M.E., Kämpfer P. and Whitman W.B.

- Roan map the phylum. 2012. *Actinobacteria*. En: M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig y W. Whitman (Eds). Bergey's manual of Systematic Bacteriology, second edition, volume five, the *Actinobacteria*, part A and B. Springer, Georgia, 1–28 pp.
- Meyer F., Netzer J., Mainert C., Coigt B., Riedel K. and Steinbüchel A. 2018. A proteomic analysis of ferulic acid metabolism in *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(14):6119–6142.
- Mistry B.D. 2009. A handbook of spectroscopic data chemistry (UV, IR, PMR, <sup>13</sup>CNMR and mass spectroscopy). Oxford Book Company. Edición 2009. Jaipur, India. 247 pp.
- Myo E.M., Ge B., Ma J., Cui H., Liu B., Shi L., Jiang M., Zhang K. 2019. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BCM Microbiology* 19(155).
- Nadkarni S.R., Patel M.V., Chatterjee S., Vijayakumar E.K., Desikan K.R., Blumbach J., Ganguli B.N. and Limbert M. Limbert. 1994. Balhimycin, a new glycopeptide antibiotic produced by *Amycolatopsis* sp. Y-86,21022. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *The Journal of Antibiotics* 47(3):334–341.
- NCSS 2020 Statistical Software. 2020. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, [ncss.com/software/ncss](http://ncss.com/software/ncss).
- Netzker T., Fischer J., Weber J., Mattern D.J., König C.C., Valiante V., Schroeckh V. and Brakhage A.A. 2015. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology* 6:299–312.
- Newbold C.J., Wallace R.J., Watt N.D. and Richardson A.J. 1988. Effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 54(2):544–547.
- Nortcliff S., Hulpke H., Bannick C.G., Terytze K., Knoop G., Bredemeier M., and Schulte-Bisping H. 2011. Soil, 1. Definition, function, and utilization of soil. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 43:399–420.
- O'Donnell J.A., Gelone S.P. and Safdar A. 2015. Chapter 37. Topical antibacterials. En Bennet, J.E., Dolin, R. y Blaser, M.J. (Eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Eighth Edition. Elsevier, 452.e1–462 pp.
- Ohno N. 2007. Yeast and fungal polysaccharides. En: Kamerling, H. (Eds.), *Comprehensive glycoscience: from chemistry to systems biology*. Elsevier, 559–577 pp.
- Okoro C. K., Brown R., Jones A.L., Andrews B.A., Asenjo J.A., Goodfellow M. and Bull A.T. 2009. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek* 95(2):121–133.
- Pavia D.L., Lampman G.M. and Kriz G.S. 2001. Introduction to spectroscopy, a guide for students of organic chemistry. Thomson Learning, Inc. Tercera edición. Australia. 680 pp.
- Phillips M.W. and Gordon G.L.R. 1992. Fungistatic and fungicidal effects of the ionophores monensin and tetronasin on the rumen fungus *Neocallimastix* sp. sp. LM1. *Letters in Applied Microbiology* 15:116–119.
- Prapagdee B., Kuekulvong C. and Mongkolsuk S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi.

International Journal of Biological Sciences 4(5):330–337.

- Prusty R., Grisafi P. and Fink G.R. 2004. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(12):4153–4157.
- Quiñones-Aguilar E.E., Evangelista-Martínez Z. y Rincón-Enríquez G. 2016. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. Elementos 101: 59–64.
- Rodríguez-Guzmán M. del P. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Acta Zoológica Mexicana (nueva serie) Es1:53–78.
- Sato T., Kawamoto I., Oka T. and Okachi R. 1981. A new antibiotic echinosporin (XK-213) – Producing organism, isolation and characterization. The Journal of Antibiotics 35(3):266–271.
- Sensi P., Greco A.M. and Ballotta R. 1959. Rifomycin. I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. Antibiotics Annual 7:262–270.
- Sergaki C., Lagunas B., Lidbury I., Gifford M.L. and Shafer P. 2018. Challenges and approaches in microbiome research: from fundamental to applied. Frontiers in Plant Science 9(1205):1–12.
- Singh J.S. 2015. Microbes: The chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment 203:80–82.
- Smith B. 1999. Infrared spectral interpretation: a systematic approach. CRC Press. Washington, D.C. 282 pp.
- Solanki R., Khanna M. and Lal R. 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. Indian Journal of Microbiology 48:410–431.
- Steinauer K., Chatzinotas A. and Eisenhauer N. 2016. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? Ecology and Evolution 6(20):7387–7396.
- Stuart B. 2004. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. John Wiley and Sons, Ltd. New Jersey. 208 pp.
- Takeuchi S., Hirayama K., Ueda K., Sakai H. and Yonehara H. 1958. Blastocidin S, a new antibiotic. The Journal of Antibiotics, Serie A 11(1):1–5.
- Tan G.Y.A. and Goodfellow M. 2012. Genus V. *Amycolatopsis*. En: M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig y W. Whitman (Eds). Bergey's manual of Systematic Bacteriology, second edition, volume five, the *Actinobacteria*, part A and B. Springer, Georgia, 1334–1378 pp.
- Tan G.Y.A., Ward A.C. and Goodfellow M. 2006. Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. Systematic and Applied Microbiology 29(7):557–569.
- Tejera B., Heydrich M. and Rojas M.M. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista de Protección Vegetal 27(2):117–122.
- Thykaer J., Nielsen J., Wohlleben W., Weber T., Gutknecht M., Lantz A.E. and Stegmann Evi. 2010. Increased glycopeptide production after over expression of shikimate pathway genes being part of the balhimycin biosynthetic gene cluster. Metabolic Engineering 12(5):455–

- Traxler M.F. and Kolter R. 2015. Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Natural Product Reports* 32(7):956–970.
- van der Meij A., Worsley S.F., Hutchings M.I. and van Wezel G.P. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 41(3):392–416.
- Vardanyan R. and Hruby V. 2006. Antibiotics. En: R. Vardanyan, and V. Hruby (Eds). *Synthesis of essential drugs* 1st edition. Elsevier Science, Boston, 425–498 pp.
- Walsh T.J. and Giri N. 1997. Pradimicins: a novel class of broad-spectrum antifungal compounds. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16:93–97.
- Wishart D.S., Feunang Y.D., Marcu A., Guo A.C. and Liang K. 2018. HMDB 4.0 – The human metabolome database for 2018. *Nucleic acids Res.* <https://hmdb.ca/>.
- Wood S.A., Kirby B.M., Goodwin C.M., Roes M.L. and Meyers P.R. 2007. PCR screenig reveals unexpected antibiotic biosynthetic potential in *Amycolatopsis* sp. strain UM16. *Journal of Applied Microbiology* 102:245–253.
- Xiao J., Li H., Wen S. and Hong W. 2014. Concentrated biosynthesis of tobramycin by genetically engineered *Streptomyces tenebrarius*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 60(6):256–261.
- Xu X., Han L., Zhao L., Chen X., Miao C., Hu L., Huang X., Chen Y. and Li Y. 2019. Echinospirin antibiotics isolated from *Amycolatopsis* strain and their antifungal activity against root-rot pathogens of the *Panax notoginseng*. *Folia Microbiologica* 64(2):171–175.
- Xu L., Huang H., Wei W., Zhong Y., Tang B., Yuan H., Zhu L., Huang W., Ge M., Yang S., Zheng H., Jiang, W., Chen D., Zhao G.P. and Zhao W. 2014. Complete genome sequence and comparative genomic analyses of the vancomycin-producing *Amycolatopsis orientalis*. *BMC Genomics* 15:363–381.
- Ye J., Guo Y., Zhang D., Zhang N., Wang C. and Xu M. 2013. Cytological and molecular characterization of quantitative trait locus qRfg1, which confers resistance to Gibberella stalk rot in maize. *Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI* 26(12):1417–1428.
- Yutin N. 2013. Horizontal gene transfer. En: Maloy, S. y Hughes K (Eds). *Brenner’s encyclopedia of genetics* (second edition). Academic Press, Cambridge, 530–532 pp.
- Zhao H., Han Z., Li G., Zhang S. and Luo Y. 2017. Therapeutic potential and cellular mechanisms of panax notoginseng on prevention of aging and cell senescence-associated diseases. *Aging and Disease* 8(6):721–739.
- Zhao W., Zhong Y., Yuan H., Wang J., Zheng H., Wang Y., Cen X., Xu F., Bai J., Han X., Lu G., Zhu Y., Shao Z., Yan H., Li C., Peng N., Zhang Z., Zhang Y., Lin W., Fan Y., Qin Z., Hu Y., Zhu B., Wang S., Ding X. and Zhao G.P. 2010. Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell Research* 20:1096–1108.
- Zhou S., Bae J.S., Bergstrom G.C., and Jander G., 2018. *Fusarium graminearum*-induced shoot elongation and root reduction in maize seedlings correlate with later seedling blight severity. *Plant Direct* 2(7):1–8.

## 11. ANEXOS

### 11.1. Compuestos Identificados en Polaridad ESI W (+).

#	m/z	Carga	Tiempo de retención (min)	Descripción aceptada	Aductos	Fórmula	Score	Error de masa (ppm)
1	203.0525	1	1.41	L-Galactopyranose	M+Na	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	52.1	-0.787985393
2	379.123	1	1.41	α-L-Arabinofuranosyl-(1->3)-[α-L-arabinofuranosyl-(1r5)]-L-arabinose	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	56.6	-1.272321751
3	381.0819	1	1.41	4-Phosphopantetheine	M+Na	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> PS	49.9	-10.234397723
4	689.2143	1	1.41	stachyose	M+Na	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>21</sub>	53.4	4.82433555
5	292.1036	1	1.49	N-Acetyl-α-neuraminic acid	M+H-2H <sub>2</sub> O, M+H-H <sub>2</sub> O, M+H	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>9</sub>	52.7	2.959273439
6	439.1427	1	1.49	α-L-Arabinofuranosyl-(1->2)-[α-D-mannopyranosyl-(1->6)]-D-mannose	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	50.8	-4.112158479
7	527.16	1	1.49	Levan	M+Na, M+K	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	56.4	3.532561128
8	707.225	1	1.49	Melibiose	2M+Na	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	53.6	4.854574874
9	85.0306	1	1.54	Purine	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	50.4	7.523555535
10	261.038	1	1.54	β-D-Ethyl glucuronide	M+K	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	52.3	3.755305756
11	280.1399	1	1.72	N-(1-Deoxy-1-fructosyl)valine	M+H	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>7</sub>	49.8	2.975990526
12	262.1285	1	1.8	Succinylcarnitine	M+H-H <sub>2</sub> O, M+H	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	53.3	2.141026233
13	276.1426	1	2.16	N-(1-Deoxy-1-fructosyl)leucine	M+H-2H <sub>2</sub> O, M+H-H <sub>2</sub> O, M+H	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	49.3	-5.323632287
14	125.0723	1	2.23	N5-METHYLGLUTAMINE	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	52.9	8.209429827
15	450.2519	1	2.28	Tobramycin	M+H-H <sub>2</sub> O	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	51.7	-8.489585913
16	339.1562	1	2.34	Niazirinin	M+NH <sub>4</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	51.6	3.600051504
17	423.1984	1	2.34	4-Amino-1-(4-[(3R)-3-amino-5-(N-methylcarbamimidamido)pentanoyl]amino)-2,3,4-trideoxy-β-D-erythro-hex-2-enopyranuronosyl)-2(1H)-pyrimidinone	M+H-2H <sub>2</sub> O, M+H-H <sub>2</sub> O, M+H	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	50.5	-26.92646316

#	m/z	Carga	Tiempo de retención (min)	Descripción aceptada	Aductos	Fórmula	Score	Error de masa (ppm)
18	172.0973	1	2.54	Miglitol	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	54.4	2.278885013
19	281.1505	1	2.54	4-Methylproline	2M+Na	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	53.9	13.05869374
20	351.1779	1	2.54	Arginyl-Hydroxyproline	M+ACN+Na	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	54.7	9.548738314
21	123.0454	1	2.72	(2E)-2-ethylidene-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone	M+H-H <sub>2</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	53.8	9.787054823
22	264.124	1	3.03	Dihydrouridine	M+NH <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	51.7	20.17984174
23	189.1243	1	3.08	(D)-fagomine	M+ACN+H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	50	6.135139904
24	310.1286	1	3.08	N-(1-Deoxy-1-fructosyl)phenylalanine	M+H-2H <sub>2</sub> O, M+H-H <sub>2</sub> O, M+H	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>7</sub>	55.7	0.30972281
25	281.1505	1	3.34	tyr-val	M+H	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	54.3	3.112814034
26	186.1137	1	3.52	4-Ethyl-6-methoxy-1,3-benzenediol	M+NH <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	54	7.026592057
27	240.0875	1	3.57	(2R,2S)-Isobutene	M+CH <sub>3</sub> OH+H	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S	55.7	-12.10886997
28	201.1239	1	3.65	PYRIDOXAMINE	M+CH <sub>3</sub> OH+H	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53	3.282599269
29	285.1364	1	3.7	5,8,12-Trihydroxy-2-oxododecanoic acid	M+Na	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	53.1	21.00439265
30	211.1086	1	3.78	4-Hydroxy-5-phenyl-1,3-oxazinan-2-one	M+NH <sub>4</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	56.1	4.508229229
31	268.1671	1	4.01	2-Heptyl-3-(2,4-pentadiyn-1-yl)oxirane	M+ACN+Na	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O	54.5	-0.494229077
32	429.1881	1	4.01	Estriol-16-Glucuronide	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	49.9	-5.843970924
33	281.1506	1	4.27	met-val	M+CH <sub>3</sub> OH+H	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	50.6	-9.51360795
34	295.1666	1	4.4	Butyrylcarnitine	M+ACN+Na	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	51.1	16.2571242
35	353.1723	1	4.45	Serotonin	M+CH <sub>3</sub> OH+H, 2M+H	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	54	2.74617489
36	197.1653	1	4.71	2,3,4,5,6,7-Hexahydro-6,7-dimethylcyclopent[b]azepin-8(1H)-one	M+NH <sub>4</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO	57.8	2.64129757

#	m/z	Carga	Tiempo de retención (min)	Descripción aceptada	Aductos	Fórmula	Score	Error de masa (ppm)
37	261.1249	1	4.71	N-(3-Aminopropyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanamide	M+Na	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	55.9	16.3173281
38	137.061	1	4.76	o-Toluic acid	M+H	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	50.7	9.39352627
39	197.1293	1	4.89	Ethyl N-methylanthranilate	M+NH <sub>4</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	57.9	4.59910427
40	176.072	1	5.38	Indoleacetic acid	M+H	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	50.5	7.97210398
41	181.0983	1	5.38	thr-pro	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	56.7	5.29291282
42	357.1821	1	5.38	Aframodiol	M+K	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	56.6	-1.66582487
43	441.225	1	5.38	1-[2,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl]-2-hydroxy-3-[4-hydroxy-3-methoxy-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl]propan-1-one	M+H-H <sub>2</sub> O, M+H	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	53.6	-7.73480294
44	255.1557	1	5.43	1-Octen-3-yl glucoside	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	53.5	-11.7316673
45	340.2609	1	5.43	sphinganine	M+K	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	57.7	-1.23097873
46	278.1401	1	5.51	N-Phenylacetyl pyroglutamic acid	M+CH <sub>3</sub> OH+H	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	56.8	5.62917206
47	297.1825	1	5.51	Rhodinyl phenylacetate	M+Na	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	56	-0.04446069
48	180.0821	1	5.69	Macaridine	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	53.6	6.36375998
49	292.156	1	5.87	4-Hydroxyprolylglutamine	M+CH <sub>3</sub> OH+H	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	53.5	22.0010534
50	329.194	1	5.94	3-(1,1-Dimethyl-2-propenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)xanthyletin	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	50.8	11.0854398
51	329.194	1	5.94	3-(1,1-Dimethyl-2-propenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)xanthyletin	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	50.8	11.0854398
52	427.1758	1	6.3	13-Hydroxy-5'-O-methylmelleonal	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	52	1.4368268
53	453.3459	1	6.3	Camelliagenin B	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	52.8	19.5793296
54	673.3918	1	6.74	Saponin H	M+Na	C <sub>36</sub> H <sub>58</sub> O <sub>10</sub>	51.2	-0.56743813
55	566.4307	1	6.79	Lysyl-Lysine	2M+NH <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	54.2	-7.481297677

#	m/z	Carga	Tiempo de retención (min)	Descripción aceptada	Aductos	Fórmula	Score	Error de masa (ppm)
56	740.4676	1	7.05	Ophiopogonin C'	M+NH <sub>4</sub>	C <sub>39</sub> H <sub>62</sub> O <sub>12</sub>	54	13.32822661
57	625.3835	1	8.6	brassinolide 23-O-alpha-D-glucoside	M+H-H <sub>2</sub> O	C <sub>34</sub> H <sub>58</sub> O <sub>11</sub>	54.5	-17.22835339
58	267.195	1	9.58	Lysyl-Arginine	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	55.6	7.307930701
59	105.035	1	11.12	Benzoic acid	M+H-H <sub>2</sub> O	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	55.4	12.07578628
60	119.0871	1	14.39	3-Phenyl-1-propanol	M+H-H <sub>2</sub> O	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O	54.3	11.47342833
61	315.1972	1	16.2	(5S)-hydroperoxy-18-hydroxy-EPE(1-)	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	52.8	4.959653568
62	365.1382	1	17.61	3,4,5-trihydroxy-6-[3-(2-phenylcyclobutyl)phenoxy]oxane-2-carboxylic acid	M+H-2H <sub>2</sub> O	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	55.8	-0.422993372

## 11.2. Compuestos Identificados en Polaridad ESI W (-).

#	m/z	Carga	Tiempo de retención (min)	Descripción aceptada	Aductos	Fórmula	Score	Error de masa (ppm)
1	217.0293	1	1.49	Gluconic acid	M-H, M+Na-2H	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	50.2	-7.07371755
2	377.0847	1	1.49	Lactulose	M-H, M+Cl, M+K-2H	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	52.1	-2.658010317
3	359.075	1	1.67	3,6-Anhydro-4-O-beta-D-galactopyranosyl-alpha-L-galactopyranose	M+Cl	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	54.5	-0.150421617
4	302.1614	1	5.95	Phenylalanyl-Arginine	M-H <sub>2</sub> O-H	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	55.1	-2.549123479
5	671.3882	1	6.67	acebutolol	2M-H	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	54.4	-21.34868981
6	671.3914	1	7.05	acebutolol	2M-H	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	55.7	-16.45751555
7	613.3092	1	8.42	Neomycin B	M-H	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub>	52.6	6.845015629
8	141.0555	1	8.91	Erinapyrone A	M-H	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	50.6	-1.750174753
9	623.3681	1	9.35	Tetronasin	M+Na-2H	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	53.8	19.18387837
10	637.3844	1	9.71	(2R)-3-(Phosphonoxy)-2-[(9Z)-9-tetradecenoyloxy]propyl (6Z,9Z,12Z,15Z)-6,9,12,15-octadecatetraenoate	M-H	C <sub>35</sub> H <sub>59</sub> O <sub>8</sub> P	56.3	-4.786530396