



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp DE  
EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *Solanum pimpinellifolium* “tomate  
silvestre” SOMETIDOS A ESTRÉS SALINO

**Línea de investigación:**

**Genética, bioquímica y biotecnología**

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

**Autora:**

Palacios Alejo, Lucero Dayanara

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

**Jurado:**

Robles Román, Margarita Elena

Rodrigo Rojas, María Elena

Yana Neira, Evelin Amparo

**Lima - Perú**

**2024**



# ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp DE EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *Solanum pimpinellifolium* "tomate silvestre" SOMETIDOS A ESTRÉS SALINO.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

24%

INDICE DE SIMILITUD

23%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Fuente de Internet	6%
2	<a href="#">Submitted to Universidad de la Amazonia</a> Trabajo del estudiante	2%
3	<a href="http://aulavirtual2.unfv.edu.pe">aulavirtual2.unfv.edu.pe</a> Fuente de Internet	2%
4	<a href="http://www.powershow.com">www.powershow.com</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://repositorio.uta.edu.ec">repositorio.uta.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://repositorio.unfv.edu.pe">repositorio.unfv.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080">dgsa.uaeh.edu.mx:8080</a> Fuente de Internet	1%



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Aspergillus flavus* y *Rhizopus*  
sp DE EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE *Solanum*  
*pimpinellifolium* “tomate silvestre” SOMETIDOS A ESTRÉS SALINO

Línea de Investigación:  
Genética, bioquímica y biotecnología  
Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora  
Palacios Alejo, Lucero Dayanara

Asesor  
Salas Asencios, Ramsés  
ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado  
Robles Román, Margarita Elena  
Rodrigo Rojas, María Elena  
Yana Neira, Evelin Amparo

Lima – Perú

2024

## **Dedicatoria**

Deseo dedicar el presente trabajo a mi madre Norma Alejo, quien estuvo constantemente insistiendo en redactar y levantar las observaciones que me enviaban; además, estuvo detrás de los trámites administrativos dado que constantemente no me encontraba en Lima por mi trabajo.

También la dedico a mi mentor el Mg. Rámses Salas porque no sólo fue un asesor sino fue como un padre, estuvo en mis inicios como profesional y sigue siendo uno de mis pilares con sus consejos.

Además, no quiero perder la oportunidad para dedicarlo a mi bebé estrella quien en su momento me impulsó a terminar la tesis aún con su pequeña presencia.

Finalmente, pero no menos importante a Miguel, quien me apoyó en el tratamiento de mis resultados y su presentación. Gracias por tu tiempo y enseñanza, de todo corazón lo agradezco.

## **Agradecimientos**

Quisiera comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a mi tutor de tesis, el Mg. Ramsés Salas, cuya experiencia, apoyo incondicional y principalmente su paciencia fueron fundamentales para este trabajo. Su guía no solo me proporcionó conocimientos, sino también motivación para superar los desafíos que se me han venido presentando.

A mi madre, le agradezco profundamente que me haya estado insistiendo desde que despertaba, fue el motor para culminar las observaciones de la tesis.

A los Mg. Vilma Béjar y Obert Marín por brindarme las cepas de los hongos con los que se hizo la tesis, gracias por apoyar a jóvenes investigadores.

A mi alma máter la Universidad Nacional Federico Villarreal y al Laboratorio de Biotecnología, gracias por brindarme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente, darme un espacio para la investigación y culminación de esta tesis.

Esta tesis ha sido y es el resultado de un esfuerzo colectivo, y su colaboración en cada aspecto de mi vida fue crucial para su realización.

A todos, gracias por ser parte de este viaje.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Descripción y formulación del problema .....	1
1.2. Antecedentes .....	3
1.3. Objetivos .....	5
<i>1.3.1 Objetivo general</i> .....	5
<i>1.3.2 Objetivos específicos</i> .....	5
1.4. Justificación .....	5
1.5. Hipótesis .....	6
II. MARCO TEÓRICO .....	7
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación .....	7
<i>2.1.1 Generalidades sobre hongos</i> .....	7
<i>2.1.2 Actividad antifúngica en plantas</i> .....	17
<i>2.1.3 Generalidades sobre osmotina como posible agente antifúngico</i> .....	18
III. MÉTODO .....	20
3.1. Tipo de investigación .....	20
3.2. Ámbito temporal y espacial .....	20
3.3. Variables .....	20
<i>3.3.1 Variable dependiente</i> .....	20
<i>3.3.2 Variable Independiente</i> .....	20
<i>3.3.3 Otras variables</i> .....	20

3.4. Población y muestra .....	21
3.5. Instrumentos .....	21
3.6. Procedimientos .....	22
3.6.1 Preparación del medio de cultivo .....	22
3.6.2 Macrocultivo .....	22
3.6.3 Microcultivo (según Ridell, 1950) .....	22
3.6.4 Preparación del extracto acuoso de hojas de <i>Solanum pimpinellifolium</i> “tomate silvestre” .....	23
3.6.5 Inhibición del crecimiento de colonias de hongos por el método de pozos de difusión en placa (Araujo y Salas, 2009) para análisis de actividad antifúngica de extractos acuosos de <i>S. pimpinellifolium</i> “tomate silvestre” .....	23
3.6.6 Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento de colonias por difusión en pozo .....	25
3.7. Análisis de datos .....	26
IV. RESULTADOS .....	28
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
VI. CONCLUSIONES .....	38
VII. RECOMENDACIONES .....	39
VIII. REFERENCIAS .....	40

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1 Resultados del análisis ANOVA de dos vías .....	29
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Las esporas de hongos .....	9
Figura 2 Reproducción de la zigospora y sus fases .....	10
Figura 3 Características microscópicas para el género <i>Rhizopus</i> .....	12
Figura 4 Esporangios de zigomiceto .....	12
Figura 5 Fotografía de colonia cultivada de <i>Rhizopus</i> .....	13
Figura 6 Esquema del ciclo de vida del género <i>Rhizopus</i> .....	14
Figura 7 Fotografía de conidióforo de <i>Aspergillus flavus</i> .....	15
Figura 8 Colonias de <i>Aspergillus flavus</i> .....	16
Figura 9 Mecanismo de acción de la osmotina contra los hongos .....	19
Figura 10 Fotografías de colonias cultivadas de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Rhizopus</i> sp. ....	24
Figura 11 Medidas tomadas para hallar el porcentaje de inhibición .....	26
Figura 12 Porcentaje de inhibición en <i>Aspergillus flavus</i> considerando tratamiento y tiempo de incubación .....	30
Figura 13 Porcentaje de inhibición en <i>Rhizopus</i> sp. considerando tratamiento y tiempo de incubación .....	31
Figura 14 Efecto del volumen de extracto de hojas de tomate silvestre sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Rhizopus</i> sp. y <i>Aspergillus flavus</i> .....	32
Figura 15 Efecto de la distancia del extracto de hojas de tomate silvestre sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Rhizopus</i> sp. y <i>Aspergillus flavus</i> .....	33
Figura 16 Efecto del tiempo de incubación sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Rhizopus</i> sp. y <i>Aspergillus flavus</i> , expuestos a un extracto acuoso de hojas de tomate silvestre .....	34

## Resumen

Se realizó el cultivo de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre” a diferentes concentraciones de estrés salino con cloruro de sodio (NaCl), los cuales fueron 0, 80, 120, y 160 mM, para luego obtener extractos vegetales a partir de las hojas, los cuales presentan como metabolito secundario el osmolito, y a partir del cual se midió su actividad antifúngica, aplicándose a las especies de *Rhizopus sp* y *Aspergillus flavus*, en ambos casos se estimó dos tiempos de incubación que fueron 24 y 48 h, donde se determinó que la mayor actividad antifúngica se presentó en el tiempo de incubación de 24 h entre las concentraciones de 80 mM y 120 mM, a comparación de las relaciones de concentraciones de 0, 80, y 160 mM de NaCl. La especie que presentó mayor porcentaje de inhibición fue la *Rhizopus sp* a comparación con el *Aspergillus flavus*.

*Palabras clave:* estrés salino, antifúngico, osmolito, *Solanum*, metabolito secundario

### Abstract

A *Solanum pimpinellifolium* culture was done for different concentrations of saline stress of sodium chloride, which was 0 mM, 80 mM, 120 mM and 160 mM, after that its vegetative extract from the leaves, and from which its antifungal activity was measured and applied to the species *Rhizopus* sp and *Aspergillus flavus*, in both cases its estimated two incubation times were 24 h and 48 h, where it is estimated that the greater antifungal activity is presented at the 24 h of incubation time for the concentrations between 80 mM and 120 mM, in comparison of the concentrations between 0 mM and 80 mM and 120 mM and 160 mM of saline solution.

The species that presented a higher percentage of inhibition was the *Rhizopus* sp in comparison with *Aspergillus* sp.

*Key words:* saline stress, antifungal, osmolyte, *Solanum*, secondary metabolite

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Descripción y formulación del problema

La contaminación de los productos alimenticios puede provenir de cinco fuentes principales como: componentes de la materia prima, superficies, personas, animales, y ambiente (Enríquez, 2010; Garcinuño, 2019; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2016). La contaminación se genera debido a la participación de bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Los hongos filamentosos, también llamados mohos, causan la descomposición de alimentos, invadiendo con rapidez cualquier sustrato y modifican las características físicas y químicas de los alimentos, debido a que poseen una rica carga enzimática (Navas y Morales, 2016).

La importancia de la contaminación fúngica de un alimento radica en su acción deteriorante de materias primas y productos manufacturados; además, por la capacidad de algunos hongos para sintetizar una gran variedad de micotoxinas provocando infecciones o reacciones alérgicas a los antígenos fúngicos (Antón y Lizaso, 2001; Martínez Padrón et al., 2013; Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

Para contrarrestar la contaminación microbiana y fúngica de los alimentos, se utilizan métodos de prevención que incluyen el uso de agentes antimicrobianos, tales como el uso de sorbatos, propionatos y parabenos, usados como preservantes durante la preparación de los panes, así como el uso de agentes naturales, como aceites esenciales, y productos con actividad antifúngica (Alfaro, 2018; Baroni y Segura, 2019; Pérez, 2017; Rodríguez, 2011).

Una alternativa para el tratamiento antimicrobiano es el uso de extractos de plantas en la cual existan moléculas con esta actividad, como es el caso de la osmotina, cuya expresión genética

se incrementa también como respuesta al estrés salino e hídrico (Valpuesta et al., 1992). Esta proteína mayormente es aislada a partir de tejidos vegetales principalmente de solanáceas y que tiene reconocida actividad antifúngica contra especies de *Phytophthora infestans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma reesei* (Carreño et al., 2007; Mizubuti y Hora-Júnior, 2015; Moreno, 2015).

El tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium* es una planta muy cercana al tomate comercial (*S. lycopersicum*) y la única que presenta frutos rojos, por lo que ha sido utilizada para generar híbridos con el tomate comercial para incrementar diversos rasgos, como el contenido de sólidos solubles en fruto (Wang et al., 2020), incremento de resistencia a diversos patógenos, incluyendo hongos como *Cladosporium fulvum* (Iriti et al., 2007). Diaz y Salas (2007) demostraron que esta especie de tomate silvestre presenta una gran resistencia al estrés salino, desarrollándose en presencia de concentraciones de sales altas como los 205 mM gracias a la acumulación de diversos osmolitos, como prolina y azúcares reductores.

Por lo tanto, la presente Tesis intentará responder la siguiente pregunta:

¿Existe actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. de los extractos acuosos de hojas de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre” sometido a estrés salino?

## 1.2 Antecedentes

Es muy escasa la investigación e información sobre la actividad antifúngica en extractos acuosos de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre”, la cual presenta un porcentaje de germinación de 98% y, al ser de un crecimiento rápido por presentar hojas verdaderas entre la tercera y cuarta semana de germinación, se considera como un sistema más ideal para demostrar la actividad antifúngica de sus extractos al someterse a estrés salino (Ortega, 2024).

Históricamente, desde 1984 hasta la actualidad se han publicado diversos trabajos sobre la respuesta de las plantas a diferentes factores físicos y químicos que causan un estrés ambiental, dichos cambios ambientales inducen en la expresión de genes que pueden reflejarse en la síntesis de proteínas nuevas o en la actividad de enzimas, las cuales pueden ser específicas para un tipo de estrés en particular.

Okigbo y Emoghene (2004), realizaron ensayos *in vivo* e *in vitro* sobre los conidios de *Mycosphaerella fijiensis*, con extractos acuosos de las especies *Vernonia amigdalina*, *Ocinum gratissimum* y *Azadirachta indica*, y reportaron actividad antifúngica sobre el hongo.

Lizcano-González (2007), demostró que el extracto de *Thymus vulgaris* (tomillo) inhibe el 74% de crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* luego de un periodo de 7 días de incubación.

Moreno-Limón et al. (2011), evaluaron la actividad fungicida de extractos alcohólicos de *Larrea tridentata* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.*, y observaron inhibiciones de hasta el 100% para ambas cepas de hongos.

Por otro lado, Ruiz-Quiroz (2013), evaluó extractos etanólico, metanólico e hidroalcohólico de las hojas de *Terminalia catappa* (castañilla), las cuales mostraron muy buena actividad inhibitoria (Concentración Mínima Inhibitoria: CMI  $\leq$  100  $\mu\text{g/mL}$ ) contra las especies

de *Candida albicans* y *Microsporium canis*, pero no se observó actividad en contra *Aspergillus niger*.

En trabajos realizados anteriormente, por Hurkman y Tanaka (1987), Singh y Anwar (1985), Ramagopal (1986), y por Singh et al. (1987), se logró comprobar que la salinidad promueve la síntesis de proteínas específicas de estrés por salinidad (SSS) como la osmotina. Posteriormente, en el trabajo realizado por Woloshuk et al. (1991), se demostró la actividad antifúngica de la proteína osmotina de tabaco (osmotina II) y de tomate (NP24/AP24). Dichas proteínas causaron la lisis de esporangios de *Phytophthora infestans* e inhibieron el crecimiento de la hifa. Asimismo, en el trabajo realizado por Vigers et al. (1992), se reportó que la osmotina de tabaco inhibió el crecimiento de *Candida albicans*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma reesei*.

Subramanyam et al. (2012), demostraron que la osmotina secretada en la matriz extracelular de las plantas de *Glycine max* generaron una resistencia significativa a patógenos fúngicos como: *Microsphaera difusa*, *Septoria glycinas*, y *Phakopsora pachyrhizi*.

Por último, Menéndez et al. (2020) indicaron que, las proteínas relacionadas con la patogenicidad (Proteínas PR) como la osmotina pueden desarrollarse como respuesta en diversas especies de plantas que se encuentran afectadas por patógenos u otros agentes químicos. Estas proteínas fueron clasificadas en cinco grupos: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 y PR-5, tomando en cuenta su funcionalidad y reacción inmunoserológica.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 *Objetivo General*

Evaluar la actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. de extractos acuosos de hojas de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre” inducido por estrés salino.

### 1.3.2 *Objetivos Específicos*

a) Obtener plantas de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre” expuestas a diferentes concentraciones de salinidad (0, 80, 120, y 160 mM) de concentración de cloruro de sodio disuelto en solución hidropónica.

b) Evaluar la actividad antifúngica de extractos acuosos de hojas de los cultivos de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre” utilizando los métodos de difusión en pozo.

## 1.4 Justificación

Los hongos contaminantes de alimentos no sólo alteran la calidad, consistencia y aspecto de los productos alimenticios mayormente consumidos por la población, sino también son patógenos activos o potenciales para el ser humano (Gómez, 2010), dado que sintetizan una gran variedad de micotoxinas, provocan infecciones o reacciones alérgicas en personas hipersensibles a los antígenos fúngicos; además, el género *Aspergillus* es considerado como uno de los principales hongos productores de micotoxinas y generador de problemas de salud. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados durante el proceso de degradación de la materia orgánica, utilizadas como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos (Santos et al., 2011).

El Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (Midagri) informó de un crecimiento del 17% en las agroexportaciones durante los ocho primeros meses del año 2021 en comparación al 2020, llegando a la suma de US\$ 4,982 millones en ventas, mientras que en el caso de exportaciones no

tradicionales existió un aumento del 19% y una suma en ventas de US\$ 259 millones FOB (FOB: valor de la mercadería puesta a bordo de un transporte marítimo). Entre los diez principales países compradores de nuestros productos se encuentran: Estados Unidos con 27%, Holanda con 18%, España con 7%, Chile con 5%, Ecuador con 4% al igual que China e Inglaterra, Hong Kong con 3% al igual que Corea del Sur y México con 2%, los cuales concentran el 79% del total del valor FOB. Los productos que tuvieron mayor demanda fueron paltas, uvas frescas, mango fresco, espárrago y preparaciones para la alimentación de animales, entre otros alimentos. Estos productos, para su exportación, necesitan contar con regulaciones técnicas y estándares con garantía de inocuidad y calidad, mediante el cumplimiento y la certificación del protocolo privado de Buenas Prácticas Agrícolas GlobalGap (*Global G.A.P.*, 2017), el cual, por ejemplo no permite el ingreso a diversos países debido a la contaminación de alimentos por hongos, lo cual genera pérdidas aproximadas de hasta 31 millones de soles. Por ello, es muy importante encontrar alternativas para controlar y detener la acción de patógenos activos o potenciales en la contaminación de alimentos sin hacer uso de sustancias químicas.

## 1.5 Hipótesis

Existe actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. de extractos acuosos de hojas de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre” sometido a estrés salino.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

#### 2.1.1 Generalidades sobre hongos

Los hongos son organismos microscópicos y macroscópicos compuestos por células eucarióticas con paredes celulares, carentes de clorofila, y su nutrición es heterótrofa obligada (Casas, 1989).

Los hongos están constituidos por filamentos llamados hifas que se extienden y ramifican formando redes, que reciben el nombre de micelio. Pueden reproducirse tanto sexual como asexualmente, de las cuales la última forma es más común y en la cual se producen esporas que al encontrar un medio propicio, germinan formando una hifa y posteriormente micelio (Garcés de Granada et al., 2003).

El desarrollo y crecimiento en redes filamentosas es un mecanismo que permite al hongo un mayor aprovechamiento de los nutrientes necesarios para su supervivencia y proliferación (Ferreira, 2003).

El crecimiento del micelio se debe a la combinación del crecimiento apical de las hifas, que permite la exploración en busca de nutrientes, y la ramificación que es la invasión de las áreas exploradas por las hifas (Bartnicki-Garcia et al., 2000). Este crecimiento permite que el micelio se expanda simétrica y radialmente (Edelstein, 1982). El crecimiento del radio de la colonia depende de la extensión y ramificación de las hifas, el micelio adopta rápidamente una forma circular cuyo radio aumenta al inicio de manera exponencial, seguido de un crecimiento lineal (Prosser, 1995).

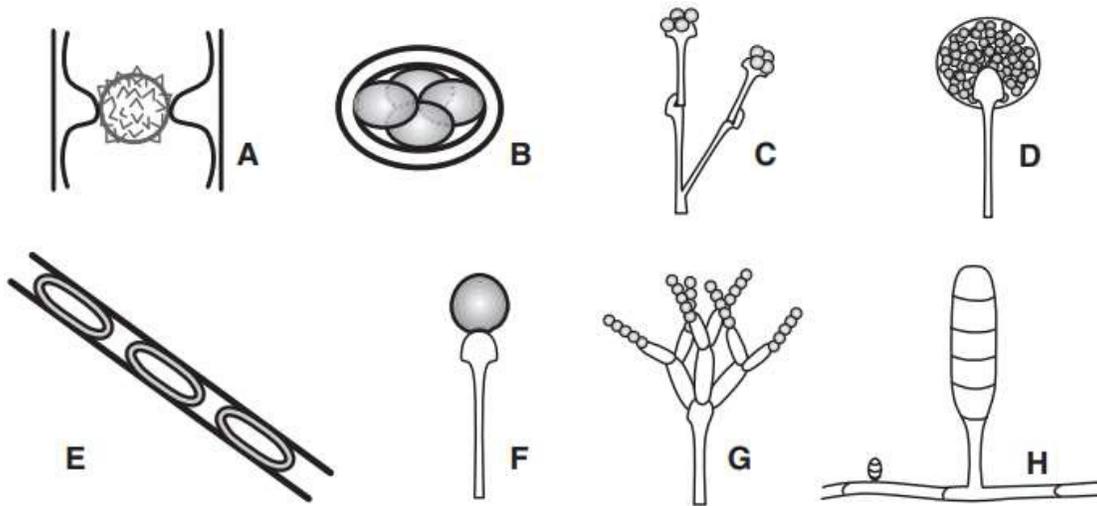
El proceso de ramificación y extensión de las hifas que caracterizan el crecimiento del micelio puede ser bastante complejo (Bezzi, 2004). La morfología de una colonia, depende de la

elongación y de la ramificación de las hifas. Estos dos procesos son esencialmente distintos, uno es el crecimiento apical continuo y el otro es un evento discreto (Davidson et al., 1996).

Los hongos presentan reproducción sexual y asexual por medio de esporas, en el caso de la reproducción asexual se realiza mediante fragmentación de las hifas y cada fragmento forma una nueva colonia. Los hongos poseen varios tipos de esporas sexuales originadas a partir de la fusión de los núcleos de dos hifas o dos levaduras y la posterior meiosis. La morfología de dichas esporas permite la identificación fúngica. Tomando en cuenta ello, los Zygomycota producen cigosporas, los Ascomycota producen ascosporas ubicadas en el interior de una estructura llamada asca, y los Basidiomycota producen basidiosporas en el exterior de la estructura llamada basidio (Figura 2) (San Emeterio, 2022). Además, presentan esporas asexuales que se originan en hifas especializadas que reciben diferente nombre de acuerdo a su morfología, en el caso de los Zygomycota producen esporangiosporas en el interior de un saco llamado esporangio. Los Ascomycota y en Basidiomycota producen conidios dentro de la estructura conidióforo (Figura 2) (San Emeterio, 2002; Martínez et al., 2013).

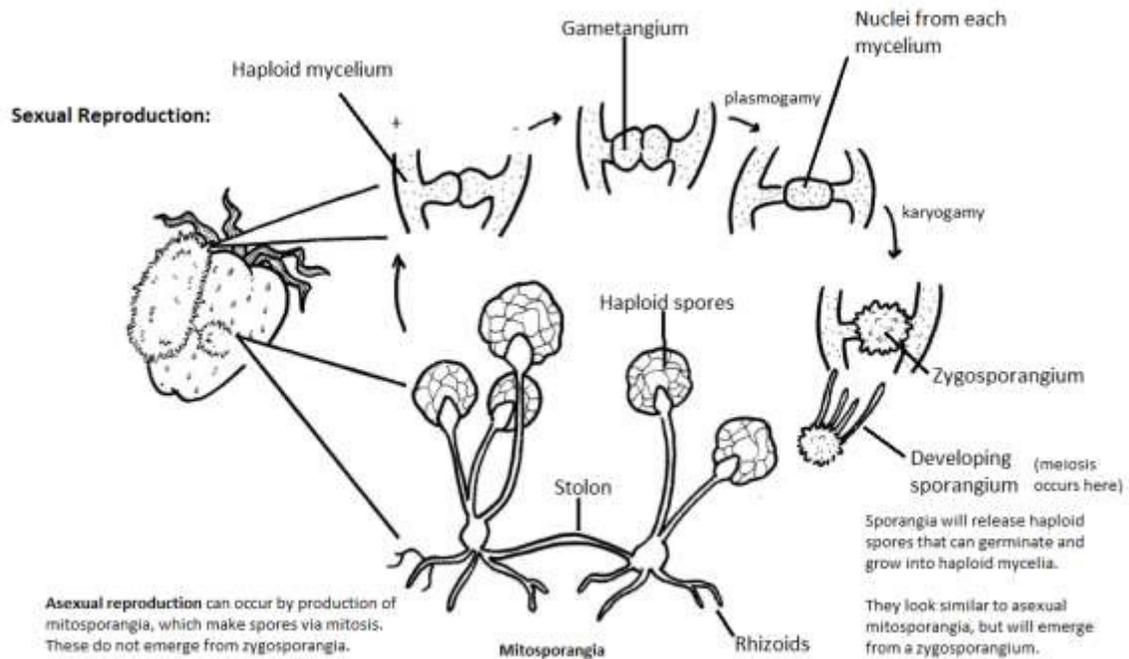
## Figura 1

### *Las esporas de hongos*



*Nota.* Las esporas de los hongos. A: cigospora. B: asca con ascosporas. C: basidio con basidiosporas. D: esporangio con esporangiosporas. E: artroconidios. F: clamidoconidio. G: conidióforo con conidios. H: macro y microconidio.

La clase Zygomycota se reproduce sexual y asexualmente, las zigosporas son hipnosporas sexuadas que se forman por isogamia (Figura 2).

**Figura 2***Reproducción de la zigospora y sus fases*

*Nota.* En reproducción sexual, dos micelios haploides compatibles se identifican entre sí. Donde se encuentran los dos micelios, se forman gametangios, cada uno con núcleos haploides. La pared entre las gametangias se disuelve y se produce plasmogamia. Los núcleos se fusionan para formar cigoesporas diploides dentro del cigosporangio. Un esporangio germina del zigosporangium y produce esporas haploides vía meiosis. Estas esporas haploides pueden germinar y crecer hasta convertirse en micelios nuevos. En la reproducción asexual, las mitosporangias producen esporas haploides por mitosis. Las mitosporangias no emergen de un cigosporangio. En cambio, tienen una red de hifas (rizoides) que parecen raíces y conexiones laterales (estolones) a racimos de otras mitosporangias. Tomado del trabajo realizado por Nikki Harris, CC BY con etiquetas agregadas por Maria Morrow.

### 2.1.1.1 Género *Rhizopus*

#### a) Taxonomía

Reino:	Fungi
Clase:	Zygomycetes
Orden:	Mucorales
Familia:	Mucoraceae
Género:	<i>Rhizopus</i>

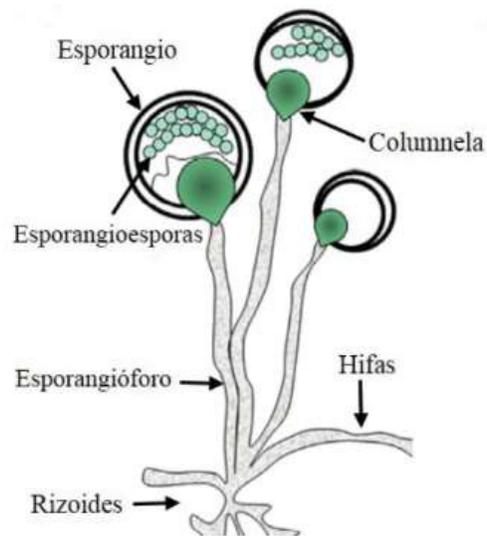
#### b) Características microscópicas

Presenta un micelio macrosifonado (5-10µm), hialino, cenocítico, en los puntos en donde se conectan los esporangióforos y los estolones que presentan, se forman rizoides (esta es una diferencia del género *Absidia*, en el cual se desarrollan internodales).

Los esporangióforos son largos y no se ramifican (a diferencia de *Mucor* spp.), y culminan en esporangios de gran tamaño (40-275µm) (Figura 2), con esporangiosporas hialinas o ligeramente cafés (Figura 3 y 4) (Bonifaz, 2000; Larone y Larone, 1987)

### Figura 3

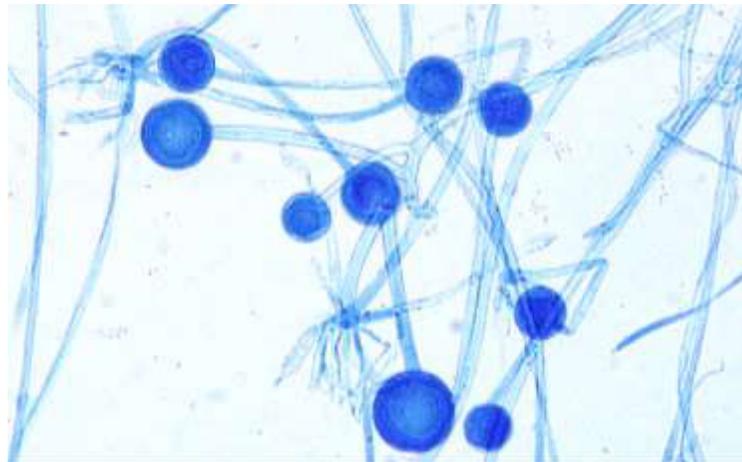
*Características microscópicas para el género Rhizopus*



*Nota.* Tomado del trabajo realizado por Ana Ríos-López 2023.

### Figura 4

*Esporangios de zigomiceto*



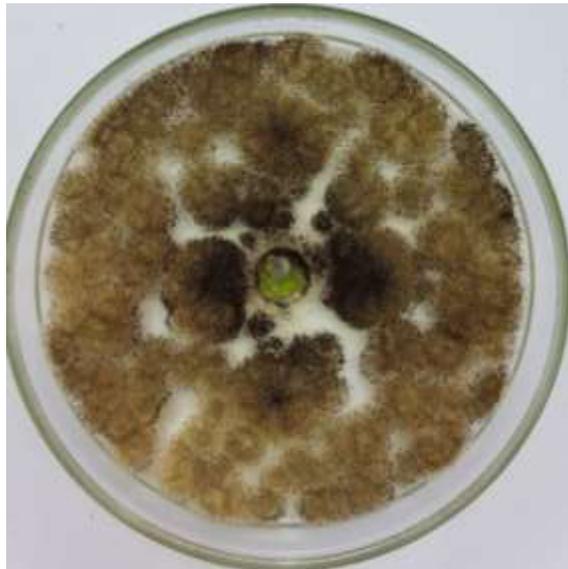
*Nota.* Se observan los esporangios del zigomiceto, así como algunos rizoides, en la base de los esporangióforos que no se ramifican. Tinción azul de algodón Lactofenol. Tomado del trabajo realizado por Bonifaz, 2000.

**c) Características macroscópicas**

Son colonias de rápido crecimiento y pueden llegar a ocupar toda una placa Petri en 4 días, las especies patógenas tienden a crecer mejor a 37°C, su crecimiento se inhibe con Cicloheximidas (Larone, 2011). Son de tamaño ilimitado (llegan a cubrir todo el medio de cultivo), son colonias blancas, al alcanzar la madurez (cuarto día) comienzan a adquirir una tonalidad gris oscura (la tonalidad se debe al desarrollo de las estructuras de reproducción asexual, las endosporas), Son vellosas algodonosas y secas (Figura 5) (Bonifaz, 2000).

**Figura 5**

*Fotografía de colonia cultivada de Rhizopus*

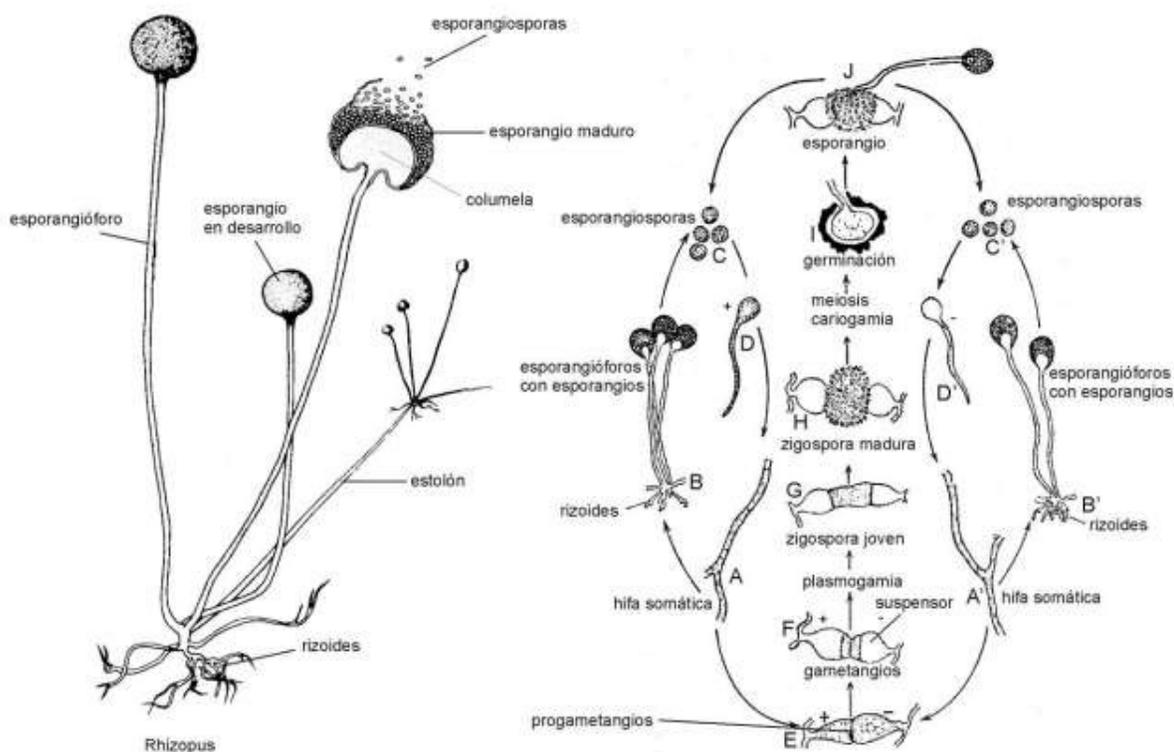


*Nota.* Colonias algodonosas laxas, de color blanco que se torna gris con puntos negros que corresponden a las esporangias. Cultivo propio para el trabajo de tesis.

El ciclo de vida del género *Rhizopus* inicia cuando las esporas asexuales son liberadas por el esporangio y son transportadas por el aire. La reproducción sexual ocurre cuando las hifas de diferentes tipos se unen formando un gametangio, el cual da lugar al cigoto; este cigoto sufre meiosis y germina produciendo un nuevo esporangio (Figura 6) (Casas, 1989; Vazhacharickal, 2015)

**Figura 6**

*Esquema del ciclo de vida del género Rhizopus*



*Nota.* Tomado del trabajo realizado por la Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina

### 2.1.1.2 Género *Aspergillus*

## a) Taxonomía

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Clase: Eurotiomycetes  
Orden: Eurotiales  
Familia: Trichocomaceae  
Género: *Aspergillus*

## b) Características microscópicas

Presenta conidióforos incoloros de aproximadamente 400 a 800  $\mu\text{m}$  de largo, con una vesícula globosa o subglobosa de donde parte una o dos hileras de conidios; es decir, monoseriados o biseriados (Figura 7).

**Figura 7**

*Fotografía de conidióforo de Aspergillus flavus*



*Nota.* Observación microscópica del conidióforo de *Aspergillus flavus* teñido con azul de lactofenol, presenta hifas hialinas septadas, aumento 100X. Cultivo propio para el trabajo de tesis.

## c) Características macroscópicas

*Aspergillus flavus* presentan colonias de rápido crecimiento que pueden alcanzar su madurez a partir del tercer día posterior a su siembra. Son de color blanquecino que adquieren una tonalidad verde a grisácea al alcanzar su madurez; además, presentan una textura granulosa a pulverulenta (Figura 8) (Bonifaz, 2000; Larone y Larone, 1987).

### **Figura 8**

*Colonias de Aspergillus flavus*



*Nota.* Se observa colonias cultivadas de *Aspergillus flavus* para el trabajo de tesis con superficie granulosa blanquecina.

El género *Aspergillus* es considerado como uno de los principales productores de micotoxinas, los cuales son usados para degradar materia orgánica y como mecanismo de defensa. Las especies que conforman esta familia se diferencian según tamaño de colonia, tasa de crecimiento, textura y coloración, y pueden presentar reproducción sexual y asexual mediante ascosporas y de conidios respectivamente.

#### **2.1.2 Actividad antifúngica en plantas**

Los metabolitos secundarios no están presentes en todas las plantas, son producto de intermediarios biosintéticos obtenidos de la fotosíntesis; entre ellos, podemos encontrar a hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos que presentan propiedades fungicidas, además de cumarinas con propiedades antifúngicas y antibacterianas. Mientras que, los conjugados de fenilpropanoides con aminas, tienen la capacidad de incorporarse a la pared celular para hacerla rígida e impedir la entrada de patógenos. Por último, las fitoalexinas se sintetizan después de la infección e inhibe a los patógenos, siendo la pisatina la primera aislada y caracterizada (Gil, 2002).

Los metabolitos secundarios no sólo actúan destruyendo patógenos o restringiendo su invasión a otras zonas de la planta, y también, producen compuestos oxidantes como: superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidróxido ( $OH^-$ ), y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), como respuesta temprana de defensa ante dichos patógenos (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003).

En el trabajo realizado por Parihar et al., 2021, se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto de las hojas de *Maesa indica* contra varios microorganismos, siendo el extracto de éter de petróleo el que mostró la máxima zona de inhibición para ambos.

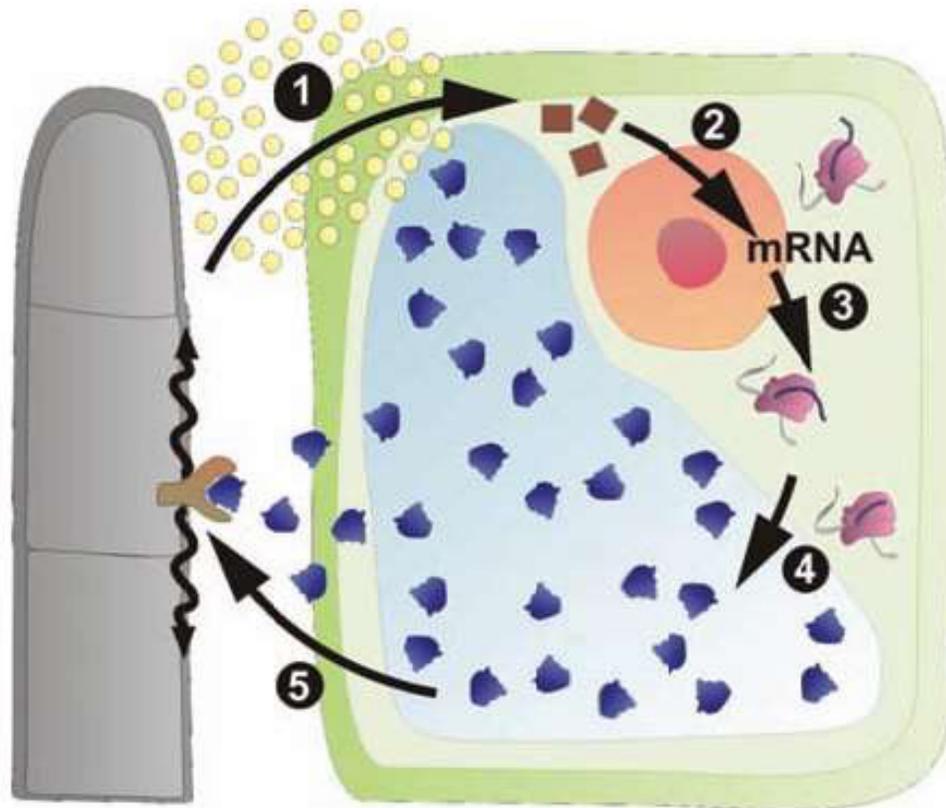
### 2.1.3 Generalidades sobre osmotina como posible agente antifúngico

La proteína osmotina y otras similares (OLP) pertenecen a la familia PR-5 y se caracterizan por presentar funciones osmoprotectoras y antifúngicas (Chowdhury et al., 2017). La presencia de la osmotina se debe a diversos factores bióticos y abióticos al que pueden estar sometidas las plantas y está relacionada con la tolerancia que estas presentan a la salinidad, es decir que su expresión está inducida por el estrés salino, entre ellas tenemos a varias especies como: *Nicotiana tabacum* “tabaco” (LaRosa et al., 1989; Takeda et al., 1991), *Atriplex nummularia* “tiple” (Casas et al., 1992), *Mesembryanthemum crystallinum* “anémona de tierra” (Thomas y Bohnert, 1993), *Withania somnifera* “ginseng indio” (Kaur et al., 2020), *Glycine max* “soja” (Onishi et al., 2006), *Anthemis nobilis* “manzanilla” (Siahsar et al., 2011), *Solanum tuberosum* “papa” (Evers et al., 1999), *Fragaria ananassa* “fresa” (Husaini y Abdin, 2008), *Solanum lycopersicum* “tomate” (Goel et al., 2010), *Morus indica* “mora” (Das et al., 2011), y *Capsicum annum* “ají” (Subramanyam et al., 2011).

El modelo de la acción antifúngica de la osmotina (Figura 9), consiste en su acumulación en las plantas como respuesta a muchos tipos de estrés biótico y abiótico. Las hifas del hongo liberan toxinas, lo cual causa la disrupción de la membrana; causando la fuga de nutrientes que el hongo utiliza. La célula pierde su rigidez y elasticidad, lo cual promueve la acumulación de la proteína osmotina. Posteriormente, la proteína sale de la célula y entra en contacto con el receptor fúngico de la membrana y facilita la formación de poros en la membrana del hongo, restituyendo su permeabilidad. Esta pérdida de integridad inhibe el crecimiento de la hifa y puede provocar la eliminación del patógeno.

## Figura 9

*Mecanismo de acción de la osmotina contra los hongos.*



*Nota.* Tomada del trabajo realizado por Viktorova, 2012.

(1) La célula fúngica libera toxinas que rompen la membrana de la planta e inducen la señalización a través de moléculas como el ácido abscísico, las citoquininas y otras. (2) Estas moléculas inducen la transcripción del gen de la osmotina. (3) El ARNm se traduce en secuencia de proteína. (4) La proteína osmotina se transfiere a la vacuola. (5) la osmotina se almacena en la vacuola hasta que se descompone y se libera al medio ambiente. La osmotina se une al receptor fúngico y provoca la ruptura de la membrana y la apoptosis

### III. MÉTODO

#### 3.1 Tipo de investigación

El presente trabajo es cuantitativo y experimental.

#### 3.2 Ámbito temporal y espacial

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, ubicada en el distrito de El Agustino. Los cultivos de tomate silvestre se mantuvieron en dicho laboratorio por un periodo de 30 días.

#### 3.3 Variables

##### 3.3.1 *Variable dependiente*

Actividad antifúngica, medida a través del porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia de hongos. La variable es numérica continua

##### 3.3.2 *Variable independiente*

Niveles de salinidad en la solución hidropónica, medidos a través de la concentración de cloruro de sodio (NaCl<sub>2</sub>). Se aplicaron 3 tipos de concentración (80, 120, y 160 mM) y un control (0 mM).

##### 3.3.3 *Otras variables*

Se consideraron las siguientes variables:

**3.3.3.1 Especie de hongo.** Se utilizaron cepas de *Rhizopus sp.* y *Aspergillus flavus*

**3.3.3.2 Tiempo de incubación:** Tiempo de evaluación del crecimiento de la colonia ante el extracto utilizado. Para este estudio se utilizaron los tiempos de 24 y 48 horas.

**3.3.3.3 Volumen del extracto:** Representa el volumen de *Solanum pimpinellifolium* que fue sometido al estrés salino. Para este estudio se evaluaron los volúmenes de 0,15 y 0,20 ml

**3.3.3.4 Distancia a la colonia:** Representa la distancia que existe entre el pocillo del extracto y el lugar de siembra de la colonia. Para este estudio se evaluaron las distancias de 1,5 y 2 cm.

### 3.4 Población y muestra

Se trabajó con un total de 100 plantas, distribuidas en 4 tratamientos: Tratamiento 1:....., 25 plantas por tratamiento de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre”, durante 3 semanas.

- Control: 25 plantas control con riego de solución hidropónica.
- Tratamiento 1. 25 plantas con solución hidropónica a una concentración de 80 mM de cloruro de sodio (4,6752 g/L).
- T2: 25 plantas con solución hidropónica a una concentración de 120 mM de cloruro de sodio (9,0128 g/L).
- T3: 25 plantas con solución hidropónica a una concentración de 160 mM de cloruro de sodio (9,3504 g/L).

### 3.5 Instrumentos

- Balanza analítica marca AND modelo GR 200
- Potenciómetro
- Conductímetro
- Estufa
- Incubadora microbiológica

- Micropipetas de 0.1 mL y 0.5 mL
- Microscopio compuesto (óptico) 45 y 100x

### **3.6 Procedimientos**

#### **3.6.1 Preparación del medio de cultivo:**

Se usó agar papa dextrosa (PDA), el cual es un medio apto para cultivo de hongos, en el cual la infusión de papa es la fuente de almidones y la dextrosa son la base para el crecimiento de hongos y levaduras. El bajo pH (3.5) evita el crecimiento de las bacterias.

Se preparó 1500 ml de PDA disolviendo 58.5 g en 1 litro de agua destilada y calentando con agitación frecuente hasta que llegue a su punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Se procedió a esterilizar la preparación del PDA y las 96 placas Petri en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se dejó enfriar aproximadamente a 45°C y se procedió a vaciarlo en las placas Petri estériles, para luego dejar reposar hasta su total enfriamiento.

#### **3.6.2 Macrocultivo:**

Se realizó la siembra por picadura de *Aspergillus flavus* y *Rhizopus sp.* y se incubaron las placas durante 5-7 días a 20-25 °C (temperatura ambiente).

Las cepas fueron obtenidas del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Lima (Béjar, 2022).

#### **3.6.3 Microcultivo (según Riddell, 1950):**

Se procedió a cortar un cuadrado de agar papa dextrosa (PDA) del tamaño de una lámina cubreobjetos, este cuadrado se colocó en una lámina portaobjetos y se cubrió por una lámina cubreobjetos.

Partiendo del macrocultivo realizado y utilizando un asa de picadura, se sembró por punción una pequeña cantidad de micelio (vegetativa) al sistema preparado procurando no dañar las estructuras del hongo de *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. Luego se incubó por 24 horas a temperatura ambiente. Terminando la incubación se procedió a retirar el cuadrado de PDA y se añadió una gota de azul de lactofenol en las láminas portaobjetos y cubreobjetos, obteniendo 2 muestras por microcultivo. Se usó papel filtro para retirar el exceso de azul de lactofenol. Finalmente, se observó al microscopio a 400X para ubicar y 1000X para el reconocimiento, haciendo uso del aceite de inmersión.

### **3.6.4 Preparación del extracto acuoso de hojas de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre”**

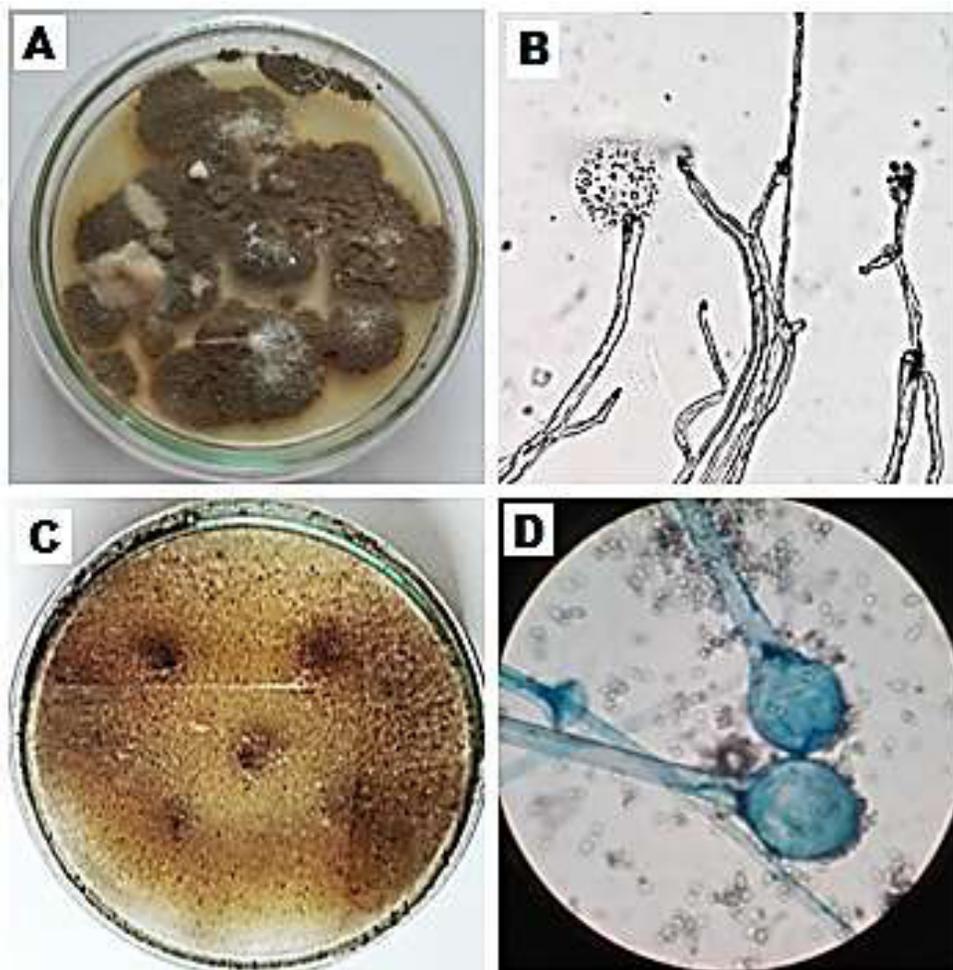
Se colocó 3.5 gr. hojas de diferentes plantas por tratamiento con 10 ml de agua destilada y con ayuda del mortero y pilón, triturando hasta obtener un líquido homogenizado de extracto de hojas de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre”.

### **3.6.5 Inhibición del crecimiento de colonias de hongos por el método de pozos de difusión en placa (Araujo y Salas, 2009) para análisis de actividad antifúngica de extractos acuosos de *S. pimpinellifolium* “tomate silvestre”:**

Mediante una división en 4 cuadrantes de 96 placas Petri con PDA se creó un pozo de 1 cm de diámetro al centro de un cuadrante y a 1.5 y 2 cm, se procedió a sembrar hifas de *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. hongos por puntura por separado. Una vez realizado el sembrado, se colocaron en los pozos 0,15 y 0,20 ml de extracto acuoso de hojas de *Solanum pimpinellifolium* “tomate silvestre” mantenidas en diferentes concentraciones de estrés salino (0mM, 80 mM, 120 mM y 160 mM de cloruro de sodio). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente y observadas a 24 y 48 horas, midiéndose el área de inhibición de crecimiento de micelio.

**Figura 10**

*Fotografías de colonias cultivadas de Aspergillus flavus y Rhizopus sp.*



*Nota.* Características de macrocultivo (A y C) y de microcultivo (B y D) de aislados de *Aspergillus flavus* y *Rhizopus sp.*, respectivamente. Microcultivo con tinción con azul de lactofenol y observado a 100x con aceite de inmersión. Cultivo propio para el trabajo de tesis.

### 3.6.6 Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento de colonias por difusión en pozo

En el centro de cada placa Petri con agar PDA, se creó un pozo de 1 cm de diámetro y se procedió a sembrar por puntura hifas de aislados propios de *Rhizopus* sp. y *Aspergillus flavus* (Figura 8) a 1.5 o 2 cm del pozo central.

Una vez realizado el sembrado, se colocaron en los pozos 0.15 o 0.2 mL del extracto acuoso de hojas de *S. pimpinellifolium* y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente y observadas 24 o 48 horas después. El porcentaje de inhibición radial se obtuvo mediante la siguiente fórmula (Figura 9):

$$\frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Donde:

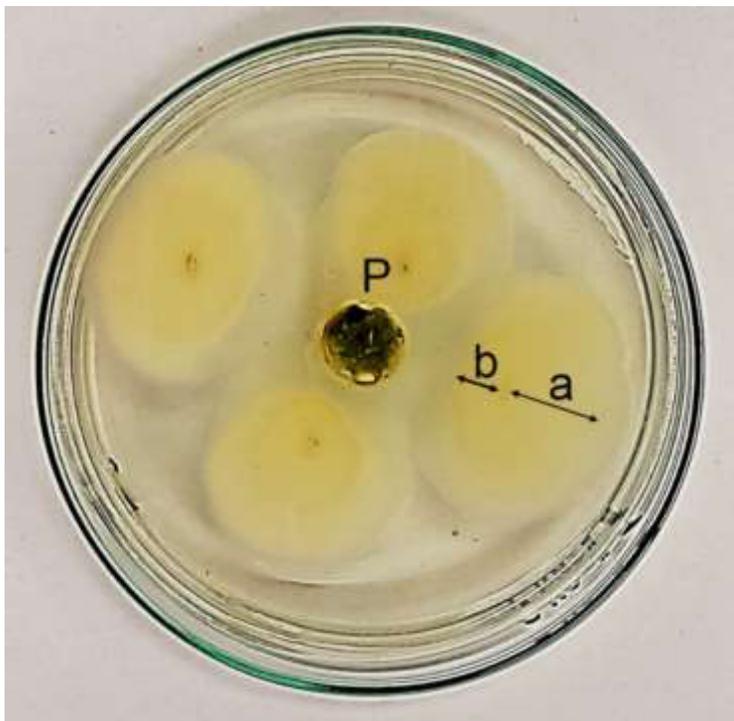
a: Distancia del crecimiento de la colonia desde el lugar de sembrado por puntura en dirección al extremo de la placa.

b: Distancia del crecimiento inhibido desde el lugar de sembrado por puntura hacia el centro donde se realizó el pozo (P).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y los gráficos presentados presentan el valor promedio y la desviación estándar en cada caso. La significancia estadística se calculó con la prueba exacta de Fisher-Freeman-Halton.

**Figura 11**

*Medidas tomadas para hallar el porcentaje de inhibición*



*Nota.* Fotografía tomada para el trabajo de tesis.

**3.7 Análisis de datos**

Los datos recolectados son representados como el área de inhibición del crecimiento de colonias de hongos de *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. Estos datos fueron obtenidos por triplicado para cada especie de hongo, por distancia entre el pozo y el lugar de siembra y el volumen de extracto colocado, así como para cada concentración de NaCl, y serán presentados en Tablas y Gráficos utilizando el programa Stata 14. Las variables recolectadas fueron procesadas en el programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA) antes de realizar los análisis. Se describieron los datos usando medidas descriptivas como promedios y desviaciones estándar. Para la evaluación de la inhibición, se realizaron análisis de ANOVA de dos y tres vías, considerando

como variable de respuesta al porcentaje de inhibición y como covariables de modificación la distancia, el volumen, el tiempo de incubación y finalmente la especie de hongo. Los valores fueron mostrados a través de gráficos de comparación de promedios y se consideró un valor de significancia de 5% para las comparaciones realizadas. Finalmente, dentro del modelo de ANOVA se evaluó la interacción entre todas las covariables para encontrar diferencias en el efecto que pudieran tener en el porcentaje de inhibición.

#### IV. RESULTADOS

Se realizó un análisis de varianza de dos vías (Two way ANOVA), donde se consideró al porcentaje de inhibición como la variable dependiente y como variables independientes a la especie de hongo, tiempo de incubación, volumen del extracto colocado, distancia del pocillo al lugar de siembra de la colonia y concentración de NaCl para el estrés salino del tratamiento de las plantas. También se evaluó la interacción entre tiempo de incubación, volumen del extracto colocado y la distancia del pocillo al lugar de siembra de la colonia, pero debido a que no se encontró significancia ( $p=0.90$ ), es que no se está considerando dicho modelo.

Los resultados se pueden ver en la Tabla 2. El modelo de ANOVA realizado fue estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ). De todas las variables evaluadas en el modelo se puede observar que el tratamiento y el tiempo de incubación tuvieron un efecto significativo ( $p<0.05$ ).

**Tabla 1***Resultados del análisis ANOVA de dos vías*

Variable	F	valor p
Modelo	30.5	0.001
Tratamiento	59.7	0.001
Hongo	1.4	0.240
Tiempo	60.5	0.001
Distancia	0.7	0.415
Volumen	0.8	0.377

Tratamiento: concentración de NaCl para el estrés

salino

Tiempo: Tiempo de incubación

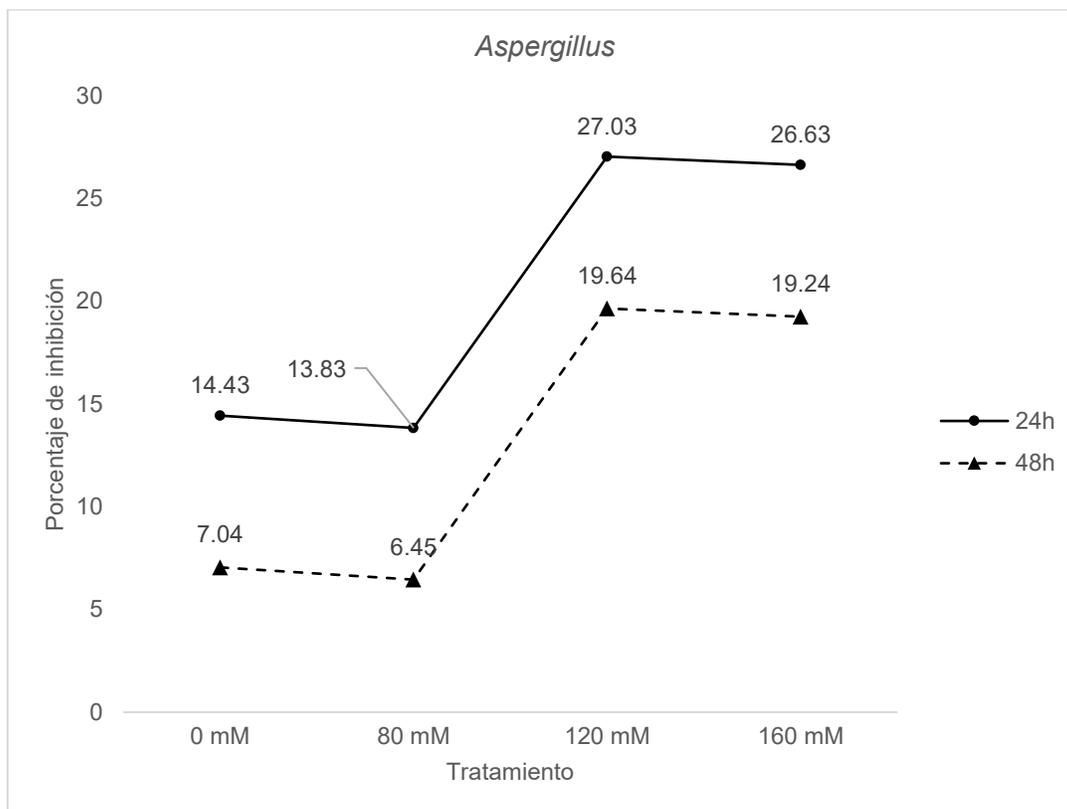
Distancia: Distancia del pocillo al punto de siembra

Volumen: Volumen del extracto en pocillo

Por lo tanto, las diferencias se muestran por especie de hongo en las Figuras 12 y 13.

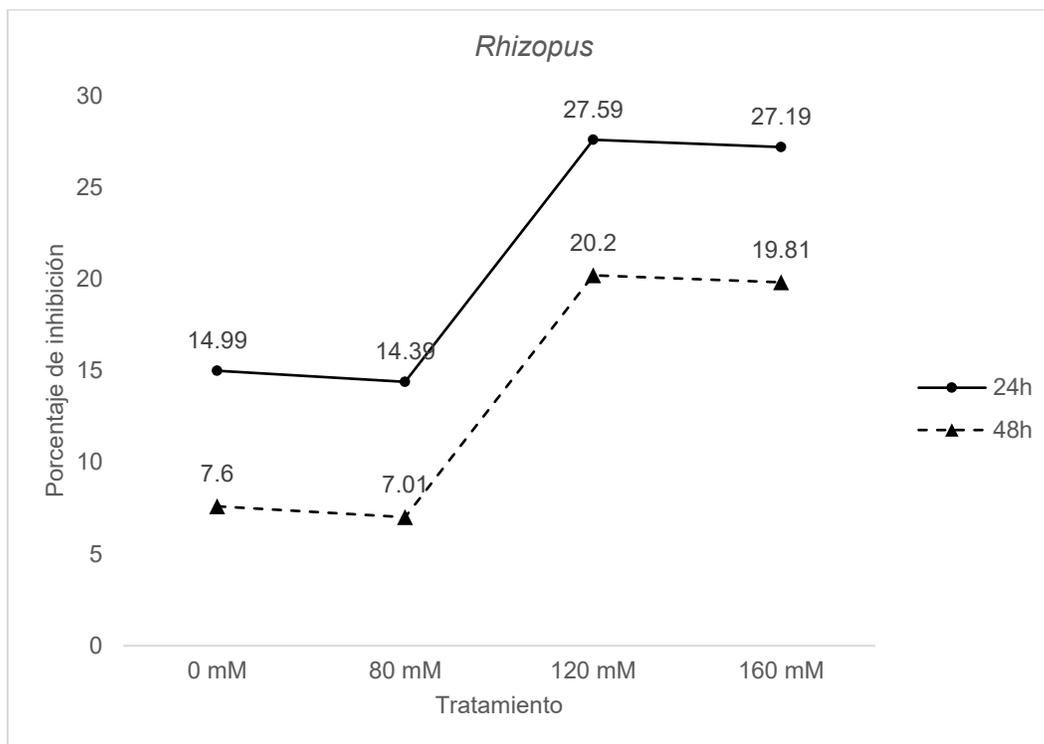
**Figura 12**

*Porcentaje de inhibición en Aspergillus flavus considerando tratamiento y tiempo de incubación.*



**Figura 13**

*Porcentaje de inhibición en Rhizopus sp. considerando tratamiento y tiempo de incubación.*



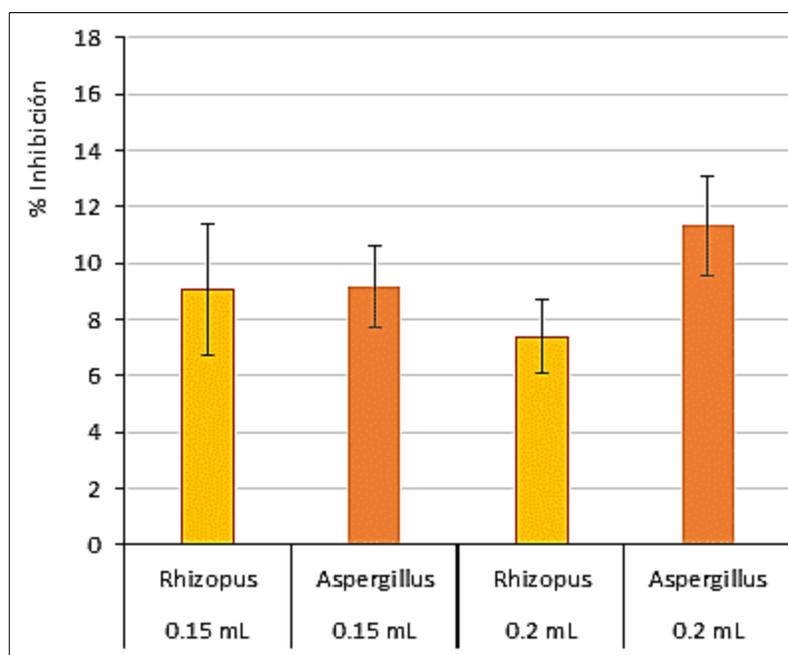
En las dos especies de hongo se observa que los porcentajes de inhibición son mayores en una mayor concentración de NaCl y durante el tiempo de incubación de 24 horas. Las dos especies presentaron una variación mínima en el porcentaje de inhibición entre el tratamiento 0 y 80 mM de NaCl, así como entre 120 y 160 mM. Mientras que, el porcentaje de inhibición entre 80 y 120 mM de NaCl mejora considerablemente a casi el doble tanto para 24 y 48 horas. La especie *Rhizopus sp.* presenta un mayor porcentaje de inhibición en comparación con *Aspergillus flavus*, pero esta diferencia es mínima.

Evaluando por cada variable independiente podemos observar los siguientes resultados:

**Efecto del volumen del extracto:** Se realizó el ensayo colocando el extracto a una distancia de 2 cm del centro de la colonia, utilizándose 0,15 o 0,2 mL del extracto fresco de hojas. Las placas fueron incubadas por 24 horas a temperatura ambiente. La Figura 12 muestra que con 0,2 mL de extracto se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición en el caso de *Aspergillus flavus*, mientras que para el caso de *Rhizopus sp.*, el mayor valor de inhibición se obtuvo al usar 0,15 mL de extracto, mostrándose diferencias significativas entre los valores obtenidos comparando los dos volúmenes utilizados del extracto ( $P=0,993$ ).

**Figura 14**

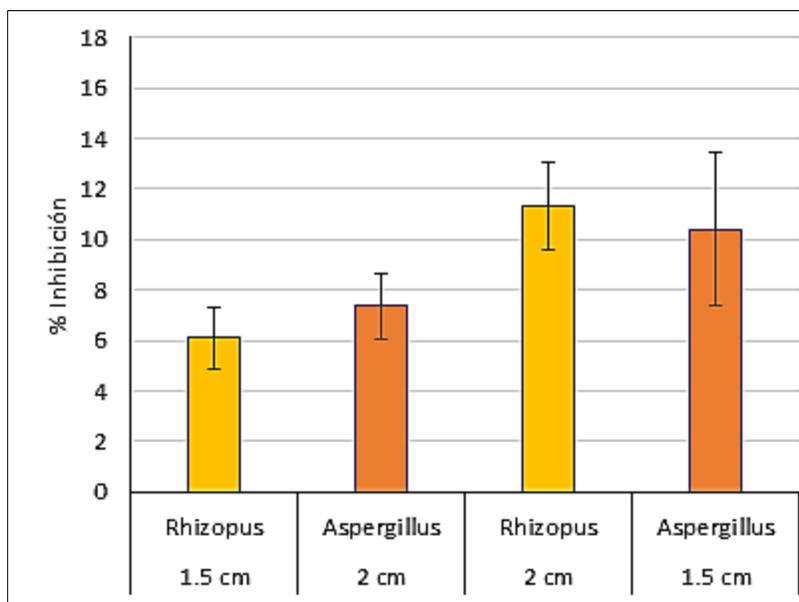
*Efecto del volumen de extracto de hojas de tomate silvestre sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de Rhizopus sp. y Aspergillus flavus.*



**Efecto de la distancia del extracto:** El ensayo fue realizado colocando el pozo a 1,5 y 2 cm del centro de la colonia y utilizando 0,2 mL del extracto. Se incubaron las placas por 24 horas a temperatura ambiente. La Figura 13 muestra que para los ensayos con *Rhizopus* sp., se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición cuando el extracto fue colocado a 2 cm de la colonia, mientras que para *Aspergillus flavus* hubo un mayor porcentaje de inhibición cuando el extracto fue colocado a 1.5 cm de la colonia. Estos resultados mostraron significancia estadística en ambos casos respecto al porcentaje de inhibición obtenido según la distancia del extracto ( $P=0,677$ ).

**Figura 15**

*Efecto de la distancia del extracto de hojas de tomate silvestre sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de Rhizopus sp. y Aspergillus flavus.*

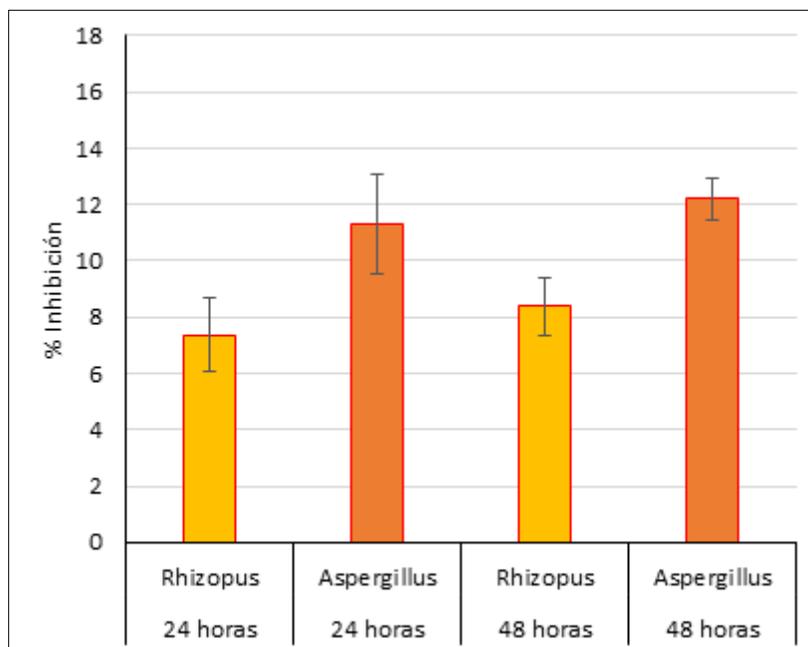


**Efecto del tiempo de incubación:** Se realizó el ensayo colocando el pozo a 2 cm del centro de la colonia y se utilizaron 0.2 mL del extracto. Se incubaron las placas por 24 y 48 horas a temperatura ambiente. En el caso que la incubación fue de 48 horas, a la mitad del periodo se le agregó el mismo volumen de extracto en cada caso a fin de evitar pérdida por deshidratación. Los resultados se muestran en la Figura 14, en la cual se observa que el porcentaje de inhibición aumenta con el tiempo de incubación tanto para *Rhizopus sp.* y *Aspergillus flavus*, los valores no mostraron significancia estadística entre el porcentaje de inhibición con respecto al tiempo de inhibición ( $P=0,044$ ).

En las dos evaluaciones, el análisis estadístico mostró que el porcentaje de inhibición es independiente del género de hongo utilizado ( $P>0,05$ ).

### Figura 16

*Efecto del tiempo de incubación sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de Rhizopus sp. y Aspergillus flavus, expuestos a un extracto acuoso de hojas de tomate silvestre.*



## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al evaluar el porcentaje de inhibición, en el presente estudio se observó la inhibición del crecimiento de las colonias de las especies: *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp., mediante el uso de extracto acuoso de las hojas de *Solanum pimpinellifolium* sometidas a estrés salino. Cruz y Rivero (2009) encontraron, entre otras especies de plantas con efecto antifúngico, que el extracto de aceite de semilla de *Azadirachta indica* “nim” inhibió el crecimiento de los micelios e impidió el desarrollo de las distintas fases evolutivas de los hongos patógenos del arroz. Tequida-Meneses et al. (2002), hallaron que los extractos alcohólicos de varias plantas silvestres, entre ellas *Solanum rostratum*, mostraron un efecto fungicida sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*, así como sobre otros hongos de interés como *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium poae* y *Fusarium moniliforme*.

Se ha investigado cómo los cambios celulares y la presencia de compuestos fenólicos promueven la actividad antifúngica de *Solanum pimpinellifolium* y otros tipos de tomates. Panthee y Chen (2010) relatan en una extensa revisión que la resistencia en condiciones de estrés se asocia a la activación de la vía del fenilpropanoide. A esto se atribuye también la presencia de compuestos en especies salvajes de tomates como la metilcetona (Fridman et al., 2005). En particular, se ha observado que componentes similares a la osmotina ejercen acción protectora contra hongos patógenos. Zhang et al. (2014) observaron que la proteína CC-NBS-LRR confiere resistencia contra múltiples cepas de *Phytophthora infestans*, microorganismo responsable del tizón tardío, el cual afecta de forma importante a cultivos de papa y tomate. Por su parte, Kaya et al. (2020) demostraron que el estrés osmótico también causa la síntesis de la fitohormona ácido abscísico, un importante promotor y regulador de las vías de señalización celular, la cual resalta por su rol protector en entornos abióticos hostiles.

Por otro lado, el uso de otros hongos como fungicidas han servido en el control de hongos patógenos de plantas, como en los resultados del estudio realizado por Guédez et al. (2009), el cual mostró en plantas de fresa (*Fragaria* spp.) que *Trichoderma harzianum* ejerce un efecto de biocontrol sobre *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium* spp. Incluso, investigaciones como la de Mendes et al. (2011) han profundizado en la importancia de la microbiota del suelo en la supresión de enfermedades fúngicas, principalmente por la presencia de proteobacterias productoras de sintetasa no ribosómicas. Asimismo, en la actualidad, se mantiene el interés en cómo la familia de genes dominantes *Ph* actúan en la resistencia a hongos, derivando en procesos de clonación para el mejoramiento de la planta en el campo agrícola (Zhang, 2014; Panthee y Chen, 2010).

Si evaluamos la concentración de  $\text{NaCl}_2$ , las concentraciones de  $\text{NaCl}$  en el presente estudio  $[\text{NaCl}] = 120 \text{ mM}$  y  $[\text{NaCl}] = 160 \text{ mM}$  fueron menores que las utilizadas por Díaz y Salas (2007)  $[\text{NaCl}] = 205 \text{ mM}$ , cuyo estudio mostró que la capacidad de tolerancia se debía a la acumulación de osmolitos de *Solanum pimpinellifolium*.

Según Qi et al. (2016), demostraron la función reguladora de la ligasa E3 (SpRing) en medios salinos, producto de la adaptación de un gen inducible al estrés y cuya expresión se localiza en el retículo endoplasmático de las células de *Solanum pimpinellifolium*.

Además, el estudio genómico de Razali et al. (2018) muestra que, en comparación con *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium* posee un mayor número de copias genéticas de inositol-3-fosfato sintasa y fosfatasa, lo cual es atribuido a la producción de tolerancia salina dentro de las características de resistencia de estrés abiótico y biótico del tomate silvestre. Por su parte, Kruijt et al. (2004) evidenciaron el papel del gen *9DC* de *Solanum pimpinellifolium* en la resistencia a cepas de *Cladosporium fulvum* que secretan la proteína *Avr9*.

Por último, si evaluamos el tiempo de incubación, se observó que el porcentaje de inhibición fue mayor en un tiempo de incubación de 24 horas, tanto para *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. Además, esta diferencia fue independiente de la concentración de [NaCl]. A las 24 horas se observó actividad antifúngica que se hizo más evidente a las 48 horas. Esto probablemente se debe a que los hongos crecieron más y en forma desproporcionada. A 24 horas se observó el inicio de la expansión del extracto, con máxima expansión a las 48 horas. Sin embargo, a las 48 horas se evidencia una menor efectividad, lo que se atribuye a un menor tiempo de vida de la osmotina asociada a una menor actividad enzimática.

Manobanda (2020) halló en extractos de *Synapsis alba* “mostaza caliente” actividad antifúngica sobre *Fusarium oxysporum* que se atribuyó a la presencia de glucosilato. Se observó que a partir de las 96 horas de incubación la eficacia de este extracto disminuyó. Por otro lado, Campa (2016) demostró que el quitosano en combinación con otros agentes antifúngicos generadores de estrés osmótico retrasó en forma sinérgica la germinación de esporas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*. Dicho efecto aumentaba en función del tiempo de incubación.

#### Limitaciones y fortalezas

La fortaleza del estudio radica en que *Solanum pimpinellifolium* es una planta endémica, cuyo extracto puede ser una alternativa en la protección de alimentos u otras plantas en el sector industrial. Además, el procedimiento de extracción está estandarizado en temperatura, concentración y distancia a la colonia.

## VI. CONCLUSIONES

- Se lograron obtener plantas de *Solanum pimpinellifolium* expuestas a estrés salino con cloruro de sodio al 80, 120 , y 160 mM.
- Se evaluó la actividad antifúngica de los extractos de *Solanum pimpinellifolium*, dónde las concentraciones de 80 y 120 mM, presentaron mayor cantidad de inhibición para las especies *Rhizopus* sp. y *Aspergillus flavus*.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda revistar y aumentar la investigación sobre los metabolitos secundarios, tales como el osmotina, los cuales presentan buena actividad antifúngica.

## VIII. REFERENCIAS

- Alfaro, R. S. (2018). Actividades productivas y migración internacional de retorno: Los panaderos de San Miguel Coatlán, Oaxaca. *Desacatos. Revista de Ciencias Sociales*, 2(41), 160-172. <https://doi.org/10.29340/41.90>.
- Antón, A., y Lizaso, J. (2001). Hongos y Micotoxinas. *Fundación Ibérica Para La Seguridad Alimentaria*, 9.
- Araujo, J., y Salas, R. (2009). Actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* "tara" frente a *Staphylococcus aureus*. *Revista Científica*, 6(2), 142-155.
- Baroni, H., y Segura, C. (2019). *Reguladores de crecimiento en el cultivo de arveja (Pisum sativum L.) cv. Rondo en La Molina* [Universidad Nacional Agraria La Molina]. <https://doi.org/190.119.243.88>.
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C., Gierz, G., López-Franco, R., y Lu, H. (2000). Mapping the growth of fungal hyphae: Orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophysical Journal*, 79(5), 2382-2390.
- Béjar, V. (2022). Constancia de uso de cepas de cepas de *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Bonifaz, A. (2000). *Micología médica básica*. Méndez Editores.
- Carreño, N., Vargas, Á., Bernal, A. J., y Restrepo, S. (2007). Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia. Una revisión Biotic constraints of the Solanaceae caused by Phytophthora ., *Agronomía Colombiana*, 25(2), 320-329.
- Carrillo, L. (2003). Hongos. En *Microbiología Agrícola* (pp. 1-14).

- Casas, A., Nelson, D., Raghothama, K., D'Urzo, M., Singh, N., Bressan, R., y Hasegawa, P. (1992). Expression of osmotin-like genes in the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant physiology*, 99(1), 329-337.
- Casas, G. (1989). *Micología general: Generalidades humana, animal, vegetal, industrial, contaminantes y procesos de laboratorio*. Universidad Central de Venezuela.
- Chowdhury, S., Basu, A., y Kundu, S. (2017). Overexpression of a new osmotin-like protein gene (SindOLP) confers tolerance against biotic and abiotic stresses in sesame. *Frontiers in Plant Science*, 8, 410.
- Das, M., Chauhan, H., Chhibbar, A., Haq, Q., y Khurana, P. (2011). High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. *Transgenic research*, 20(2), 231-246.
- Davidson, F., Sleeman, B., Rayner, A., Crawford, J., y Ritz, K. (1996). Large-scale behavior of fungal mycelia. *Mathematical and Computer Modelling*, 24(10), 81-87.  
[https://doi.org/10.1016/S0895-7177\(96\)00166-5](https://doi.org/10.1016/S0895-7177(96)00166-5)
- Diaz, F., y Salas, R. (2007). Contenido de materia seca, azúcares, proteínas y prolina en *Lycopersicon pimpinellifolium* y *Lycopersicon esculentum* en respuesta a condiciones de salinidad. *Revista de la Universidad Científica del Sur*, 4(4), 24-34.
- Edelstein, L. (1982). The propagation of fungal colonies: A model for tissue growth. *Journal of Theoretical Biology*, 98, 679-701.
- Enríquez, M. (2010). Incidencia de la manipulación del proceso en la contaminación por mohos y levaduras en la gelatina postre con trozos de manzana (*Malus Pumila*) en la ciudad de Ambato. Universidad Técnica de Ambato.

- Evers, D., Overney, S., Simon, P., Greppin, H., y Hausman, J. (1999). Salt tolerance of *Solanum tuberosum* L. overexpressing an heterologous osmotin-like protein. *Biologia plantarum*, 42(1), 105-112.
- Fridman, E., Wang, J., Iijima, Y., Froehlich, J., Gang, D. R., Ohlrogge, J., y Pichersky, E. (2005). Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *The Plant cell*, 17(4), 1252–1267. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029736>
- Garcés de Granada, E., Correa de Restrepo, M., Coba de Gutiérrez, B., Orozco de Amézquita, M., Zapata, A., Anacona Chingana, A., y Sabogal, S. (2003). *Morfología y clasificación de los hongos*.
- Garcinuño Martínez, R. (2013). Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. *Aldaba*, 36, 51. <https://doi.org/10.5944/aldaba.36.2012.20530>.
- Gil, P. (2002). *Productos naturales*. Universidad Pública de Navarra. 260
- Global G.A.P.* (2017). <https://www.globalgap.org/es>
- Goel, D., Singh, A., Yadav, V., Babbar, S., y Bansal, K. (2010). Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma*, 245(1), 133-141.
- Gómez, J. (2010). Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Hurkman, W., y Tanaka, C. (1987). The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant physiology*, 83(3), 517-524.
- Husaini, A., y Abdin, M. (2008). *Overexpression of tobacco osmotin gene leads to salt stress tolerance in strawberry (Fragaria × ananassa Duch.) plants*.

- Iriti, M., Guarnieri, S., y Faoro, F. (2007). Responsiveness of *Lycopersicon pimpinellifolium* to acute UV-C exposure: Histo-cytochemistry of the injury and DNA damage. *Acta Biochimica Polonica*, 54(2), 273-280.
- Kaur, A., Sudhakara Reddy, M., Pati, P., y Kumar, A. (2020). Over-expression of osmotin (OsmWS) gene of *Withania somnifera* in potato cultivar 'Kufri Chipsona 1' imparts resistance to *Alternaria solani*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(1), 131-142.
- Kaya, C., Higgs, D., Ashraf, M., Alyemeni, M., y Ahmad, P. (2020). Integrative roles of nitric oxide and hydrogen sulfide in melatonin-induced tolerance of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants to iron deficiency and salt stress alone or in combination. *Physiologia plantarum*, 168(2), 256–277. <https://doi.org/10.1111/ppl.12976>
- Kruijt, M., Brandwagt, B., y de Wit, P. (2004). Rearrangements in the Cf-9 disease resistance gene cluster of wild tomato have resulted in three genes that mediate Avr9 responsiveness. *Genetics*, 168(3), 1655–1663. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.028985>
- Larone, D., y Larone, D. (1987). *Medically important fungi: A guide to identification*, 196. Citeseer.
- LaRosa, P., Singh, N., Hasegawa, P., y Bressan, R. (1989). Stable NaCl tolerance of tobacco cells is associated with enhanced accumulation of osmotin. *Plant Physiology*, 91(3), 855-861.
- Lizcano-González, M. (2007). *Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (thymus vulgaris) contra botrytis cinerea, fusarium oxysporum y sclerotinia sclerotiorum*.
- Martínez-Padrón, H., Hernández-Delgado, S., Reyes-Méndez, C., y Vázquez-Carrillo, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 126-146.

- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J., Piceno, Y., DeSantis, T., Andersen, G., Bakker, P., y Raaijmakers, J. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6033), 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- Menéndez, E., Navarro, J., López, J., y Dalmau, A. (2020). Mecanismos de defensa en plantas. Proteínas relacionadas con la patogenicidad. *Revista de Investigaciones de la Universidad Le Cordon Bleu*, 7(2), 98-109. <https://doi.org/10.36955/riulcb.2020v7n2.010>
- Mizubuti, E., y Hora-Júnior, B. (2015). VIII Congreso Latinoamericano de Micología MEMORIAS. *Actualidades Biológicas*, 1(1), 102.
- Moreno-Bermúdez, L. (2015). *Respuesta de plantas in vitro de banano cv. 'Grande naine' (Musa AAA) transformadas con el gen de osmotina ap24 al estrés hídrico.*
- Moreno-Limón, S., González-Solís, L., Salcedo-Martínez, S., Cárdenas-Ávila, M., y Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, 32, 193-205.
- Navas, J., y Morales, D. (2016). *Libro de texto de Microbiología Pecuaria*. 31-37.
- Norstog, K., y Long, R. W. (1976). *Plant Biology*. Saunders.
- Okigbo, R., y Emoghene, A. (2004). Antifungal Activity of Leaf Extracts of Some Plant Species on *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, The Causal Organism of Black Sigatoka Disease in Banana (*Musa acuminata*). *Current Applied Science and Technology*, 4(1), 20-31.
- Onishi, M., Tachi, H., Kojima, T., Shiraiwa, M., y Takahara, H. (2006). Molecular cloning and characterization of a novel salt-inducible gene encoding an acidic isoform of PR-5 protein in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(10), 574-580.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016). Manipuladores de Alimentos. En *Gobierno de Cantabria* (N.º 9789275319024; pp. 1-1). <http://www.saludcantabria.es/index.php?page=manipuladores-de-alimentos>
- Ortega González, N. (2024). *Respuesta bioquímica a estrés salino e hídrico de Solanum lycopersicum var. cerasiforme y su pariente silvestre S. pimpinellifolium, en interacción con microbiota de suelo local* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Panthee, D., y Chen, F. (2010). Genomics of fungal disease resistance in tomato. *Current genomics*, 11(1), 30–39. <https://doi.org/10.2174/138920210790217927>
- Parihar, S., Jadhav, R., y Poonia, P. (2021). The Analysis of Antibacterial and Antifungal Activity of Various Leaves Extracts of Natural Plants *Maesaindica* (Wall) against Bacterial and Fungal Strains Causing Human Infection. *Journal of Scientific Research*, 65(2).
- Pérez-Magro, M. (2017). *Elaboración de films de gelatina con nanopartículas de timol para la conservación de manzana*. Universidad de Oviedo.
- Prosser, J. I. (1995). Mathematical modelling of fungal growth. *The Growing Fungus* (pp. 319-335). Springer.
- Ramagopal, S. (1986). Protein synthesis in a maize callus exposed to NaCl and mannitol. *Plant Cell Reports*, 5(6), 430-434.
- Raven, P. (2013). *Biology of plants*. Worth Publishers.
- Riddell, R. (1950). Mycological society of america permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Journal of Mycological Society of America*, 42(2), 265-270.
- Ríos-López, A., González, G., y Flores-Maldonado, O. (2023). Mucor: el ascenso y caída de un antiguo patógeno en tiempos de COVID-19. *Revista Ciencia UANL*, 26(119), 44–49. <https://doi.org/10.29105/cienciauanl26.119-5>

- Rodríguez-Sauceda, E. (2011). Natural antimicrobial agent use in the preservation of fruits and vegetables. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 7(1), 153-170.
- Ruiz-Quiroz, J. (2013). *Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales*.
- San Emeterio, J., Lara, T., y Andrés, G. (2002). Características generales de los hongos (I). Estructura, clasificación y reproducción. J. Liébana Ureña, *Microbiología Oral*, 244-253.
- Santos, V., Venâncio, A., y Campos, S. (2011). *Micotoxinas en materias primas, piensos y forrajes*.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Ducoing, H., y Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Serrano-Coll, H., y Cardona-Castro, N. (2015). Mcotoxicosis Y Micotoxinas: Generalidades Y Aspectos Básicos. *Revista CES Medicina*, 29(1), 10.
- Siahsar, B., Sarani, S., y Allahdoo, M. (2011). Polypeptide electrophoretic pattern of *Matricaria chamomilla* and *Anthemis nobilis* under salt and Fedeficiency stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(54), 11182-11185.
- Singh, N., LaRosa, P., Handa, A., Hasegawa, P., y Bressan, R. (1987). Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(3), 739-743.
- Singh, D., y Anwar, M. (1985). Effect of soil salinity on herb and oil yield and quality of some *Cymbopogon* species. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 33(2), 362-365.
- Subramanyam, K., Arun, M., Mariashibu, T., Theboral, J., Rajesh, M., Singh, N., Manickavasagam, M., y Ganapathi, A. (2012). Overexpression of tobacco osmotin

- (Tbosm) in soybean conferred resistance to salinity stress and fungal infections. *Planta*, 236(6), 1909-1925.
- Subramanyam, K., Sailaja, K., Subramanyam, K., Rao, D., y Lakshmidivi, K. (2011). Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(2), 181-192.
- Takeda, S., Sato, F., Ida, K., y Yamada, Y. (1991). Nucleotide sequence of a cDNA for osmotin-like protein from cultured tobacco cells. *Plant physiology*, 97(2), 844.
- Thomas, J., y Bohnert, H. (1993). Salt stress perception and plant growth regulators in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant physiology*, 103(4), 1299-1304.
- Valpuesta, V., Berteli, F., Pérez-Prat, E., Corrales, E., Narasimham, M., Botella, M., Bressan, R., Pliego, F., y Hasegawa, P. (1992). Cambios metabólicos y de expresión génica en plantas superiores en respuesta al estrés salino. *Agriscientia*, 9(1), 55-63.
- Vazhacharickal PJ et al. (2015) Effect of concentration and ph on the preservative action of calcium propionate against black bread mold (*Rhizopus stolonifera*) in Kerala. *CIBTech Journal of Biotechnology* 4 (2): 1-12.
- Vigers, A., Wiedemann, S., Roberts, W., Legrand, M., Selitrennikoff, C., y Fritig, B. (1992). Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science*, 83(2), 155-161.
- Wang, X., Gao, L., Jiao, C., Stravoravdis, S., Hosmani, P., Saha, S., Zhang, J., Mainiero, S., Strickler, S., y Catala, C. (2020). Genome of *Solanum pimpinellifolium* provides insights into structural variants during tomato breeding. *Nature communications*, 11(1), 1-11.

Woloshuk, C., Meulenhoff, J., Sela-Buurlage, M., Van den Elzen, P., y Cornelissen, B. (1991).

Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 3(6), 619-628.

Zhang, C., Liu, L., Wang, X., Vossen, J., Li, G., Li, T., Zheng, Z., Gao, J., Guo, Y., Visser, R., Li,

J., Bai, Y., y Du, Y. (2014). The Ph-3 gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. TAG. Theoretical and applied genetics. *Theoretische und angewandte Genetik*, 127(6), 1353–1364.

<https://doi.org/10.1007/s00122-014-2303-1>