

Tesis de Posgrado

Propiedades de hongos del género *Alternaria* aislados a partir de hojas de *Melia azedarach* L.

Descalzo, Adriana María

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Descalzo, Adriana María. (1991). Propiedades de hongos del género *Alternaria* aislados a partir de hojas de *Melia azedarach* L.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2422_Descalzo.pdf

Cita tipo Chicago:

Descalzo, Adriana María. "Propiedades de hongos del género *Alternaria* aislados a partir de hojas de *Melia azedarach* L.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2422_Descalzo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PROPIEDADES DE HONGOS DEL GENERO *Alternaria* AISLADOS
A PARTIR DE HOJAS DE *Melia azedarach* L

AUTOR: LIC. ADRIANA MARIA DESCALZO

DIRECTOR: DRA. CELIA E. COTO

LUGAR DE TRABAJO: LABORATORIO DE VIROLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Tesis
2422
y 2.

Tesis presentada para optar al titulo de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

-A mis padres

-A Carlos

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Celia Coto, directora de esta tesis por su dedicación y su valioso estímulo e interés que hicieron posible la realización de este trabajo.

A las Dras. Elsa Damonte y Susana Mersich por su colaboración en la puesta a punto de técnicas y sus consejos en la discusión de protocolos.

Al Dr. Daniel Cabral, consejero de esta tesis, por su gran interés en el trabajo y sus aportes a los experimentos realizados en el campo de la micología.

A todos mis compañeros : Silvia, Mónica, Nelly, Félix , Laura, Luis, Viviana, Fabián e Isabel quienes me brindaron no sólo su apoyo y desinteresada colaboración sino también su valiosa amistad durante todo mi trabajo en el laboratorio.

Y quiero agradecer muy especialmente a Cecilia y Carlos, quienes además de su amistad y su valiosa colaboración me brindaron su gran ayuda y estímulo para la finalización de este trabajo.

INDICE

INTRODUCCION

INTERACCION ENTRE PLANTAS Y HONGOS.....	1
Mecanismo de invasión.....	2
Relaciones entre poblaciones fúngicas que colonizan la planta.....	3
ENDOFITOS.....	5
AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS DE ORIGEN FUNGICO.....	7
Antivirales de origen fúngico.....	8
Ciclopiina.....	9
Ciclosporina A.....	10
6-MFA.....	10
Geodina.....	11
Virustomicina.....	11
Acido tenuazónico	12
CARACTERISTICAS DEL GENERO ALTERNARIA.....	13
BIOSINTESIS Y PRODUCCION DE TOXINAS DE ALTERNARIA.....	16
Producción de toxinas en cultivo.....	18
Toxinas relacionadas con la patogenia de <i>Alternaria</i> en plantas.....	19
PERALES.....	19
Fitoalternarinas A , B y C.....	20
Altenina.....	20
ALGODON Y CITRICOS.....	21
Tentoxina.....	21
ZINIA.....	21
Ziniol.....	21

TOMATE.....	21
Acido alternárico.....	21
Acido tenuazónico.....	22
AAL-toxinas.....	23
OLIVO.....	24
Alternariol , alternariol metil éter , altenueno, altertoxina I y ácido tenuazónico.....	24
MANZANA.....	25
AM-toxina I ,II y III.....	25
GRAMINEAS.....	25
Acido tenuazónico y alternariol.....	25
<i>MELIA AZEDARACH L</i>	28
Características generales de la planta.....	28
Propiedades biológicas del árbol ya reportadas.....	28
Antecedentes de meliacina.....	29
Citotoxicidad de los extractos crudos y semipurificados de <i>Melia azedarach L</i>	30
Estudios sobre el mecanismo de acción de meliacina.....	32
Efectos de meliacina sobre el sistema inmune del ratón.....	33
OBJETIVOS.....	36
MATERIALES Y METODOS	
1 - MEDIOS DE CULTIVO , BUFFERS Y SOLUCIONES.....	37
1.1 - Medio de crecimiento y mantenimiento celular.....	37

1.2 - Medio semisólido de plaqueo.....	37
1.3 - Medios de crecimiento para hongos.....	37
1.4 - Medio sólido de esporulación de hongos.....	38
1.5 - Medio de Mueller - Hinton	38
1.6 - Buffer de extracción (PK).....	38
1.7 - Solución de obtención de esporas (PBS- Tween 80).....	38
2 -CELULAS Y VIRUS.....	39
2.1 - Células Vero.....	39
2.2 - Virus de la estomatitis vesicular.....	39
2.3 - Virus de pseudorrabia.....	39
2.4 - Virus herpes simplex de tipo I (HSV-I).....	39
3 - PREPARACION DE LOS STOCKS DE VIRUS.....	39
3.1 - Stock de VSV.....	39
3.2 - Stock de PrV.....	40
3.3 - Stock de HSV-I.....	40
4 - CEPAS DE BACTERIAS Y HONGOS.....	41
5 - TITULACION DE VIRUS.....	41
6 - RECOLECCION DEL MATERIAL VEGETAL.....	42
7 - AISLAMIENTO DE ENDOFITOS A PARTIR DE HOJAS DE <i>Melia azedarach</i> L.....	42
8 - OBSERVACION MICROSCOPICA DE LA SUPERFICIE FOLIAR.....	43
9 - CRECIMIENTO DE <i>Alternaria</i> EN MEDIO SOLIDO Y LIQUIDO.....	43
9.1 - Obtención de esporas de M2003.....	43
9.2 - Curva de crecimiento de M2003 en medio sólido.....	44
9.3 - Curva de crecimiento de M2003 en medio líquido.....	44

9.4 - Determinación de peso seco.....	45
9.5 - Determinación de glucosa residual.....	45
10 - PURIFICACION PARCIAL DEL COMPUESTO ACTIVO DE M2003.....	45
10.1 - Desarrollo de micelio en medio sólido.....	45
10.2 - Extracto crudo.....	45
10.3 - Extracción con solvente a partir de medio sólido.....	46
10.4 - Desarrollo de micelio en medio líquido.....	46
10.5 - Extracción con acetato de etilo.....	46
10.6 - Cromatografía en columna de sílica gel.....	46
10.7 - Cromatografía en capa delgada (TLC).....	47
11 - PURIFICACION PARCIAL DE MELIACINA.....	47
11.1 - Obtención de extracto crudo.....	47
11.1.1 - A partir de hojas de <i>Melia azedarach</i> L.....	47
11.1.2 - A partir de brotes de paraíso cultivados in-vitro.....	48
11.1.3 - A partir de callos cultivados in-vitro.....	48
11.1.4 - A partir de cultivos en suspensión de células de paraíso.....	48
11.2 - Extracción con acetato de etilo a partir . paraíso.....	49
11.3 - Cromatografía en columna de sílica gel	49
11.4 - Cromatografía en capa delgada (TLC).....	50
12 - ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL.....	50
12.1 - Por determinación de la DE50.....	50
12.2 - Por determinación del rendimiento viral.....	51
13 - ENSAYO DE TOXICIDAD EN CELULAS.....	51
14 - ENSAYO DE TOXICIDAD DE LA FRACCION PURIFICADA DE M2003 EN RATONES ADULTOS.....	52

15 - ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	52
15.1 - Actividad de M2003 crecido en placa.....	52
15.2 - Actividad antibacteriana del medio líquido de M2003.....	53
16 - ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIFUNGICA.....	53
16.1 - Ensayo de antagonismo.....	53
16.2 - Actividad antifúngica del medio de cultivo de M2003.....	54

RESULTADOS

PARTE I

1- AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE HOJAS DE <i>Melia azedarach</i> L - RELACION DE LOS HONGOS AISLADOS CON LA PLANTA HUESPED.....	55
1.1- Aislamiento de hongos a partir de muestras de hojas de paraíso.....	55
1.2- Ensayo de actividad antiviral en extractos crudos de los hongos aislados.....	59
1.3- Observación microscópica de la superficie foliar.....	60
1.4- Estudio de la frecuencia de aislamiento de hongos en diferentes épocas del año.....	64
1.5- Estudio del aislamiento de endofitos a partir de hojas de diferentes edades.....	66
1.6- Actividad antiviral comparativa en extractos de hongos aislados de paraíso.....	67

PARTE II

2- CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LA CEPA M2003.....	71
2.1- Clasificación morfológica de la cepa M2003.....	71
2.2- Crecimiento de M2003 en medio sólido.....	71

2.3-	Actividad antiviral y citotóxica de los extractos de M2003 crecido en agar-malta y Czapek-Dox.....	73
2.4-	Crecimiento de M2003 en medio líquido.....	76
2.5-	Actividad de M2003 contra DNA y RNA virus.....	77
2.6-	Otras propiedades de M2003.....	81
2.6.1-	Comportamiento de M2003 frente a diferentes géneros de bacterias.....	81
2.6.2-	Antagonismo de M2003 frente a diferentes hongos aislados de paraíso.....	82

PARTE III

3-	COMPARACION DE LAS PROPIEDADES DEL ANTIVIRAL QUE PRODUCE M2003 Y MELIACINA.....	88
3.1-	Obtención de meliacina.....	88
3.2-	Ensayos de actividad antiviral en plantas de paraíso crecidas en presencia de luz o en oscuridad.....	91
3.3-	Actividad antiviral comparativa en material vegetal de diferentes orígenes.....	93
3.4-	Estacionalidad de la actividad de meliacina.....	95
3.5-	Diferencias entre las actividades de meliacina y el antiviral producido por M2003.....	98
3.5.1-	Inducción del estado antiviral.....	98
3.5.2-	Actividad de meliacina en presencia de 5-fluoruracilo (5-FU).....	99
3.5.3-	Actividad comparativa de meliacina y el extracto de M2003 en presencia o ausencia de 5-FU.....	101
3.6-	Purificación parcial en paralelo de los compuestos con actividad antiviral producidos por M2003 y <i>Melia azedarach</i> L.....	103
3.6.1-	Material de partida.....	103

3.6.2- Extracción con acetato de etilo.....	103
3.6.3- Cromatografía en columna de sílica gel.....	104
3.6.4- Cromatografía en capa delgada de sílica gel.....	104
3.6.5- Actividad antiviral y toxicidad de la fracción purificada de M2003.....	105

PARTE IV

4- BUSQUEDA DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN HONGOS DEL GENERO <i>ALTERNARIA</i> AISLADOS DE DISTINTOS FUENTES.....	110
---	-----

DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	118
-------------------------------	-----

BIBLIOGRAFIA.....	126
-------------------	-----

INTRODUCCION

INTERACCION ENTRE PLANTAS Y HONGOS

A través del proceso de evolución las plantas y los hongos han alcanzado diferentes tipos de interrelaciones que involucran varios mecanismos posibles de interacción.

Son conocidas las asociaciones simbióticas entre algas y hongos que forman los líquenes, la interacción de tipo mutualista descrita en las micorrizas donde los hongos coexisten con las raíces de la planta, la relación endofítica reportada principalmente entre hongos y algunas gramíneas y también el caso de los hongos patógenos que producen diferentes trastornos en el hospedante infectado.

Las diferentes patologías que producen los hongos parásitos en la planta colonizada van desde la invasión de las células vivas del tejido infectado, con el fin de aprovechar los nutrientes producidos en estas células sin mayores daños para el resto de la planta, hasta la necrosis de los tejidos vegetales como consecuencia de la invasión fúngica.

Sin embargo la coexistencia entre hongos y plantas a lo largo del período evolutivo, ha llevado al desarrollo de mecanismos que limitan el daño causado por el hongo invasor en la planta hospedante.

Normalmente la interacción entre hospedante y patógeno involucra señales de reconocimiento mutuo para que se lleve a cabo este tipo de relación. Existen numerosos grupos de genes que son activados o inhibidos en ambos organismos como respuesta a la invasión, y dependen del estado fisiológico, metabólico y de las condiciones ambientales en las que se encuentran ambos organismos.

Los productos que utilizan los hongos como elementos básicos para su nutrición son los mismos en todas las plantas, por

ejemplo: carbohidratos, lípidos, proteínas y vitaminas, independientemente de la vía que utiliza la planta para la biosíntesis de los mismos.

Usualmente como resultado de la invasión fúngica, se producen cambios anatómicos y morfológicos en la estructura de la planta infectada, como la reducción de la fotosíntesis, aumentos localizados de la respiración, traslocación de nutrientes hacia la zona invadida, cambios en el proceso de transpiración y síntesis e inhibición de hormonas tanto vegetales como del hongo (49).

Mecanismo de invasión

Generalmente la invasión del hospedante se encuentra precedida por la germinación de esporas en la cercanía de la planta, contando con un ambiente húmedo y una topografía adecuada para el desarrollo favorable del hongo. De este modo en muchos casos la espora germina dirigiéndose directamente hacia los estomas en la superficie de la hoja (38).

Durante el proceso de la invasión el hongo secreta una gran variedad de enzimas celulolíticas, pectolíticas, proteolíticas, amilolíticas y en algunos casos cutinasas. Estas enzimas son estables y activas en el medio extracelular y pueden resistir algunos cambios en el ambiente en el cual ejercen su acción.

Muchos hongos a su vez secretan compuestos de naturaleza mucilaginosa. Frecuentemente se trata de poliglucanos que crean un ambiente favorable para la actividad de estas enzimas manteniendo la humedad, pH y composición iónica adecuada en el medio ambiente extracelular.

La respuesta de la planta frente a la invasión fúngica es de naturaleza variada. La producción de fitoalexinas (72) puede ser

inducida por la acción de las enzimas degradativas del hongo que actúan sobre la pared de las células de la planta, o por acción enzimática de los metabolitos de la planta sobre constituyentes del organismo invasor.

En algunos casos la invasión fúngica puede inducir la síntesis de etileno, provocando daños secundarios en la planta debido a los efectos de este compuesto.

En otros casos la planta produce un inhibidor de síntesis protéica como consecuencia del ataque de determinados insectos y no resultaría sorprendente que pueda existir alguna reacción similar frente a la invasión producida por hongos (49)

Relaciones entre poblaciones fúngicas que colonizan la planta.

La superficie aérea de las plantas resulta un hábitat favorable para el desarrollo de organismos saprófitos o parásitos. En algunos casos los saprófitos son capaces de interactuar con los microorganismos patógenos, disminuyendo la incidencia de la patología foliar. Del mismo modo los endofitos que poseen una acción inhibitoria sobre el desarrollo de otros organismos que parasitan la planta, juegan un rol importante en la resistencia del hospedante frente a numerosas infecciones.

El análisis de las poblaciones fúngicas que colonizan las hojas de *Eucalyptus viminalis*, muestra que existen dos tipos de organismos: los endofitos que se desarrollan en contacto con los tejidos internos de las hojas, y los hongos que crecen sobre la superficie de las mismas. La frecuencia de estas poblaciones varía según la época del año y las condiciones fisiológicas de la hoja.

Normalmente cuando la hoja muere, los organismos superficiales pueden colonizar el interior de la misma, mientras que al mismo tiempo decrece la frecuencia de las especies

endofíticas. De este modo los hongos de la superficie resultan más aptos para competir con los endofitos cuando disminuyen los nutrientes producidos por las hojas sanas.

En el interior de las hojas, los hongos se encuentran protegidos contra los cambios climáticos y las condiciones ambientales adversas, de modo que la frecuencia de los endofitos estaría preferentemente relacionada con el estado fisiológico de la planta, más que con la época del año (13).

Por otro lado se encontró que los endofitos que colonizan las hojas de *Eucalyptus viminalis* con una alta frecuencia, poseen actividad antagónica frente a la mayoría de los hongos que crecen en la superficie de las mismas, creando de este modo un microhábitat con condiciones desfavorables para el desarrollo de los hongos superficiales y previniendo su penetración en el interior de las hojas (30).

Estas evidencias indican que al igual que la planta, los hongos sufren alteraciones por los cambios que se producen en el ambiente y como consecuencia puede afectarse su fisiología y morfología.

Las alteraciones en el crecimiento, se manifiestan en mayor grado cuando dos o más microorganismos crecen en forma contigua en un medio de cultivo. Normalmente se observa un fenómeno de antagonismo que se puede manifestar por la inhibición mutua del crecimiento de ambos organismos, mayor velocidad de ocupación de espacio por uno de ellos que por el otro, o desarrollo del micelio de uno de los hongos sobre el micelio del otro.

Los cambios morfológicos que ocurren en la colonia, varían directamente con el tipo de inhibición. Se puede observar: restricción del crecimiento, cambios en la pigmentación, y estimulación de la esporulación en la zona cercana al contacto

con el microorganismo antagonista (59).

ENDOFITOS

Desde hace algún tiempo se ha reportado la presencia de hongos endofíticos en los tejidos de varias gramíneas utilizadas como pastura para el ganado. A diferencia de los hongos que parasitan la planta, causando diferentes tipos de patologías, los endofitos no producen signos visibles de la infección (58). Estos hongos se comportan como simbiontes mutualistas (15), es decir que establecen una asociación estrecha con el hospedante de una especie diferente, a partir de la cual ambos organismos se benefician mutuamente.

La tendencia evolutiva de la relación entre el endofito y el hospedante lleva a la reducción en la complejidad del ciclo de vida del hongo y a una mayor dependencia de la planta para su diseminación.

Se encontró que en las formas más evolucionadas de esta relación los endofitos no esporulan cuando están alojados en el interior de la planta y se transmiten en forma materna por crecimiento vegetativo de las hifas en los óvulos y semillas, a pesar de que pueden producir conidios en cultivos de laboratorio (14).

Desde la perspectiva del hongo el beneficio que recibe se relaciona con la obtención de nutrientes sintetizados por la planta y la protección frente a condiciones ambientales desfavorables, ya que se aloja en un microhábitat relativamente estable. De esta forma, dentro del hospedante tiene asegurada su alimentación, supervivencia y diseminación (41).

En cuanto a los beneficios que esta interacción aporta para el hospedante se puede citar principalmente la resistencia de las

plantas colonizadas frente a la infección con diferentes microorganismos patógenos o a ciertas pestes causadas por insectos (43), (52).

Existen evidencias experimentales que demuestran que los insectos que se alimentan a partir de plantas colonizadas por endofitos, presentan aberraciones en su crecimiento y desarrollo, que terminan reduciendo la población. Más aún, se observó que muchos insectos son capaces de discriminar entre las plantas infectadas y no infectadas con endofitos para utilizar como sustrato en su alimentación.

Se ha reportado también menor incidencia de nematodos en las plantas que poseen endofitos con respecto a las que se encuentran libres de ellos (91).

Este mecanismo de resistencia se debe en muchos casos a la producción de metabolitos secundarios del hongo como alcaloides y otras toxinas de naturaleza química diversa que resultan sumamente tóxicas para los consumidores herbívoros (91).

Este es uno de los motivos por el cual no se puede plantear la introducción de hongos como mecanismo de resistencia a diferentes plagas en las plantas de importancia agrícola, sin un estudio previo detallado de las consecuencias que podría acarrear la ingestión de estos metabolitos para los consumidores primarios (18).

Se sabe, por ejemplo, que la planta *Baccharis coridifolia* utilizada como pastura para el ganado, en algunos casos está infectada con un endofito productor de tricotecenos macrocíclicos que causa irritación de las mucosas estomacales en los animales consumidores. En cuanto a la resistencia de las plantas infectadas hacia otros microorganismos patógenos, existen evidencias experimentales que demuestran una reacción de

antagonismo por parte de los endofitos hacia otros hongos que parasitan la planta (30).

En el transcurso del estudio taxonómico de los endofitos aislados de plantas de la familia Ericaceae se encontró que varias de las cepas aisladas, pertenecientes a diferentes especies, son capaces de producir antibióticos en cultivos de laboratorio.

Se obtuvieron resultados similares con los endofitos aislados a partir de *Ulex europaeus L.* y *Ulex gallii P.*

Los filtrados de los medios de cultivo de estos hongos se testearon contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Entre los hongos productores de estos antibióticos se pueden citar: *Daldinia sp.*, *Corinothyrium sp.*, *Cryptosporiosis sp.*, *Topospora sp.*, y *A. lunata*, aislados de plantas de la familia Ericaceae y *Corinothyrium sp.*, *Chaetononium sp.*, *Geniculosporium sp.*, y *Alternaria sp.* entre los aislamientos de *U. europaeus* y *U. gallii*.

Los resultados de este ensayo apoyarían la hipótesis de que muchos endofitos son capaces de producir antibióticos para competir exitosamente con otros microorganismos antagonistas (32), (33).

AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS DE ORIGEN FUNGICO.

Los antibióticos son producto del metabolismo secundario que inhiben los procesos de crecimientos de otros organismos no relacionados, aún cuando se utilizan en baja concentración.

En 1929, cuando Fleming observó que el crecimiento de *Penicillium notatum* inhibía el crecimiento de los estafilococos, comenzó la era de la penicilina y consecuentemente la búsqueda de

nuevos antibióticos producidos por diferentes microorganismos.

Entre los antibióticos de origen fúngico, los de mayor importancia práctica son los que produce la familia Aspergillaceae y los Moniliales, como la penicilina, cefalosporina C, griseofulvina y ácido fusídico. Otros antibióticos, si bien se descubrieron en el medio de cultivo de diferentes microorganismos, se sintetizan químicamente en el laboratorio.

Cabe mencionar también, que entre las bacterias existen numerosos grupos taxonómicos productores de antibióticos.

La mayor cantidad y variedad de compuestos es producida por Actinomicetes, especialmente los del género *Streptomyces*.

Otro grupo de sustancias importantes son los antibióticos peptídicos producidos por el género *Bacillus*.

Los antibióticos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, espectro antimicrobiano, cepas productoras, mecanismo de biosíntesis y estructura química.

Los agentes quimioterapéuticos pueden ser de amplio espectro y resultar activos contra numerosos grupos de microorganismos, o de espectro restringido con acción sobre un grupo determinado.

La mayoría de los antibióticos se ha desarrollado en el campo de los antimicrobianos, pero actualmente se tiende a la búsqueda de otras actividades entre las cuales se pueden mencionar: antitumorales, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, compuestos con actividad insecticida, conservadores para la industria alimentaria, promotores del crecimiento en medicina veterinaria y como herramientas en bioquímica y biología molecular (25).

Antivirales de origen fúngico.

La búsqueda de metabolitos fúngicos con acción antiviral, no presenta el mismo desarrollo que muestra la búsqueda de antibióticos. En general se realizan ensayos complementarios de otras actividades biológicas a partir del cultivo de microorganismos conocidos como productores de antibióticos.

La búsqueda de bibliografía relacionada con este tema, mediante el banco de datos de BIOSIS, reveló 14 trabajos en los cuales se relacionan los items de actividad antiviral y hongos, entre los cuales se pueden citar:

Ciclopina

Se encontró que los extractos de micelio de *Penicillium cyclopinum*, poseen actividad antiviral ensayada en cultivo de células amnióticas humanas. Se trataría de uno o más compuestos que fueron denominados ciclopina.

El ensayo realizado sobre tres grupos de arbovirus diferentes, sindbis, encefalitis equina y virus chickungunya, indica que este compuesto es capaz de inhibir efectivamente la replicación y el efecto citopático del virus, cuando el extracto se agrega en el momento de la infección o aún 12-14 horas luego de la inoculación cuando la infección se encuentra ya establecida.

Otros virus no relacionados como polio tipo I, echo 11, adenovirus tipo II, HSV-1 y coxsackie, no resultaron afectados cuando ciclopina se agregó en el momento de la infección. Sin embargo, se observó una inhibición temporaria de estos virus (salvo HSV-1), si las células eran pretratadas durante 16-24 horas antes de la infección.

Los ensayos sobre el mecanismo de acción indican que no presenta actividad virucida. Tampoco tiene efecto sobre la adsorción ni la liberación de la progenie. De este modo podría actuar sobre algún mecanismo que se lleva a cabo una vez que el

virus se establece en el interior de la célula.

Por otro lado no presenta especificidad de tejido, ya que la inhibición de los arbovirus se observa tanto en células humanas como en cultivo de células de embrión de pollo.

Se trataría de una molécula de naturaleza protéica ya que es sensible al calor, a la exposición a pH=2,4 y al tratamiento con tripsina, mientras que las nucleasas no la inactivan (54).

Ciclosporina A

La ciclosporina A es un péptido inmunosupresor, producido por el hongo *Trichoderma polysporum* (67).

Se encontró que este compuesto inhibe la fusión de células Vero, inducida por la infección con el virus HSV-1, cuando los cultivos eran pretratados con la droga durante 12 horas a 37 °C.

En concentraciones mayores de 80 uM resulta tóxico para los cultivos de células Vero.

Se encontró que aumenta los niveles de calcio intracelular, pero no inhibe la penetración del virus a la célula. Tampoco inhibe la síntesis de proteínas ni la glicosilación de proteínas virales.

Si bien inhibe la formación de sincicios, no afecta el rendimiento viral (50).

6-MFA

Otros productos fúngicos son capaces de inducir en las células tratadas diferentes mecanismos antivirales.

Se encontró que en cultivos de *Aspergillus ochraceus* se puede obtener el compuesto denominado 6-MFA, que induce la producción de interferón en las células tratadas, desencadenando así el mecanismo antiviral.

Este compuesto es producido durante la etapa estacionaria de crecimiento del hongo por fermentación en medio líquido (63).

Los ensayos realizados con animales, mostraron que el suero de los ratones tratados con 6-MFA es capaz de inducir en animales normales una resistencia contra la infección con el virus semliki forest (SFV). También se encontró que si se suministraba aceite mineral antes del tratamiento con 6-MFA, aumentaban los niveles séricos de interferón y la protección contra la infección en los animales tratados (48).

Geodina

Este compuesto fue aislado a partir de cepas de suelo de *Aspergillus terreus* y más tarde a partir de *Penicillium estinogenum*.

Se encontró que es capaz de inhibir la multiplicación del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) en cultivo de células por el ensayo de formación de placas.

La concentración inhibitoria mínima fue de 9 ug/ml, mientras que la máxima concentración no tóxica correspondió a 36 ug/ml de este compuesto sobre células CEF.

La geodina no inactiva los viriones libres de NDV (no es virucida) ni tampoco inhibe la adsorción del virus a la célula.

Tampoco afecta el consumo de oxígeno mitocondrial, y por lo tanto no afecta el sistema de generación de energía celular.

El crecimiento del virus se encuentra inhibido en algún paso del ciclo de multiplicación entre el proceso de adsorción a las células y la maduración de la progenie (79).

Virustomicina A

Entre los microorganismos productores de antibióticos y antivirales se pueden citar también las bacterias del género *Streptomyces*. El cultivo de micelio de la cepa AM-2604 produce un antiviral que se extrae con acetato de etilo a partir del medio líquido. La fracción purificada por cromatografía en columna de sílica gel, forma cristales amarillos con una absorción UV entre

280-330 nm.

Esta fracción es activa contra los virus VSV, NDV, sindbis, encefalitis equina, vaccinia, HSV-1 y HSV-2.

La concentración inhibitoria mínima fue de aproximadamente 3×10^{-4} ug/ml y la concentración citotóxica en cultivo primario de embrión de pollo y células RK-13 fue de 4×10^{-2} ug/ml.

El antibiótico resultó activo también contra *Microsporium gypseum*, *Trichophyton interdigitale*, *Piricularia oryzae*, *Mucor racemosus* y *Monilinea fructicola* pero inactivo contra bacterias y levaduras (56).

La fórmula molecular fue estimada como $C_{48}H_{71}NO_{14}$ por espectroscopia de masa. Aparentemente tendría en su estructura un grupo ácido idéntico al ácido flavensomicinoico (55).

Acido tenuazónico

El ácido tenuazónico se aisló a partir del filtrado de cultivos de *Alternaria tenuis*.

Su mecanismo de acción afecta directamente la incorporación de aminoácidos en las proteínas microsomales y la liberación de proteínas sintetizadas de novo.

Se observó que cuando se lo suministraba a ratas, disminuía la incorporación de leucina en diferentes tejidos.

Los estudios sobre síntesis protéica in-vitro indican que se inhibe la incorporación de aminoácidos en las proteínas microsomales y aumenta la cantidad de RNA soluble en forma proporcional a la cantidad de ácido tenuazónico agregado.

Aparentemente no se encuentra afectada la transferencia de aminoácidos a partir de RNA soluble a los ribosomas, indicando que el ácido tenuazónico no interfiere con esta reacción.

Por el contrario, su principal blanco de acción sería la

liberación de proteínas sintetizadas de novo desde los ribosomas al fluido del sobrenadante (73).

En cultivos de *Aspergillus sp.* también se descubrió un compuesto que inhibe el efecto citopático del virus de sarampión en células HEP-2.

El compuesto responsable de esta actividad resultó ser el ácido tenuazónico. La sal de sodio de este ácido, inhibe un amplio espectro de virus animales.

La concentración entre 100-500 ug/ml disminuye en medio orden el título de los enterovirus polio MEF-1, echo-9, coxsackie B1, los virus respiratorios parainfluenza (HA-i), Salisbury (HGP) y virus vaccinia, HSV-1, y virus "B". Es inactivo contra los virus polioma, parainfluenza asiático, rabia y leucemia de Friend.

Tampoco presenta actividad contra 31 cepas de bacterias y 48 cepas de levaduras (51).

Los compuestos sintéticos derivados del ácido tenuazónico mostraron actividad contra adenovirus tipo 5. Se pudo correlacionar la actividad inhibitoria sobre la multiplicación y la inhibición del efecto citopático del virus en cultivo de células. El derivado tiosemicarbazona de valina resultó ser el de mayor actividad con un índice quimioterapéutico de 8 (78), (93).

Sin embargo los derivados en C-5 no presentan actividad antiviral, aunque mostraron actividad antibacteriana. Esto indicaría que los derivados del ácido tenuazónico actúan por diferentes mecanismos de acción en ambos sistemas (35).

CARACTERISTICAS DEL GENERO *ALTERNARIA*.

El género *Alternaria* se encuentra dentro de la clasificación de los Hyphomycetes Dematiaceus.

Las colonias crecen esparcidas, generalmente son de color gris, marrón oscuro o negro.

El micelio puede desarrollarse inmerso en el medio de cultivo o presentar una parte superficial, con hifas poco coloreadas, oliváceas o marrón claras.

Raramente forma estromas. Los conidióforos pueden ser simples o ramificados, solitarios o fasciculados y se desarrollan en las porciones apicales del micelio vegetativo.

Los conidios pueden estar solos o encadenados, usualmente ovalados, de color marrón o marrón claro, con septos longitudinales y transversales.

Especie tipo: *Alternaria alternata* (sinónimo: *Alternaria tenuis*).

Las colonias son usualmente negras o negro-oliváceas, a veces grises.

Los conidióforos aparecen solos o en pequeños grupos, simples o ramificados, derechos o curvados, a veces geniculados, lisos, de color marrón claro u oliváceos con uno o varios conidios.

Los conidios se forman en cadenas largas y usualmente ramificadas. Presentan forma ovoide o elipsoidal y terminan en una punta cónica o cilíndrica. Tienen hasta 8 septos transversales y varios septos longitudinales u oblicuos.

Los hongos de este género son de distribución cosmopolita. *Alternaria* es un saprófito extremadamente común que se encuentra ampliamente distribuido en suelo, en la superficie aérea de diferentes plantas hospedadoras y otros sustratos incluyendo comida y tejidos (10), (29).

TABLA 1: Antivirales de origen fúngico.

ANTIVIRAL	ESPECIE PRODUCTORA	VIRUS INHIBIDO	REFERENCIA
Ciclopina	<i>Penicillium cyclopinum</i>	sindbis encefalitis equina chickungunya	(54)
Netropsina	<i>Streptomyces netropsis</i> #	vaccinia	(54)
Helenina	<i>Penicillium funiculosum</i>	columbia SK semliki Forest poliovirus I	(74)
Ms-8450	<i>Penicillium stoloniferum</i>	semliki Forest poliovirus I-II-III	(60) (39)
Ciclosporina A	<i>Trichoderma polysporum</i>	HSV-1	(50)
6-MFA	<i>Aspergillus ochraceus</i>	semliki Forest	(48)
Geodina	<i>Aspergillus tereus</i> <i>Penicillium estinogenum</i>	NDV	(79)
Virustomicina A	<i>Streptomyces sp.</i> #	VSV NDV sindbis encefalitis equina vaccinia HSV-1 HSV-2	(55)
Acido tenuazónico	<i>Alternaria tenuis</i> <i>Aspergillus sp.</i>	polio I echo 9 coxsackie B1 parainfluenza 3 salisbury (HGP) vaccinia adenovirus 5 HSV-1 virus "B"	(51) (78)

Se incluye el género de bacterias *Streptomyces* por sus características de desarrollo de micelio y condiciones de cultivo similares a las del resto de los hongos productores de antivirales.

BIOSINTESIS Y PRODUCCION DE TOXINAS DE ALTERNARIA.

Los hongos del género *Alternaria* producen metabolitos secundarios que resultan tóxicos para la mayoría de los sistemas biológicos.

Muchas especies del género son patógenos de diferentes plantas.

En general se desarrollan en tejidos senescentes o muertos de la planta hospedante y en muchos casos se los describe como patógenos.

Estos hongos requieren una elevada humedad para su desarrollo. Generalmente penetran en hojas, tallos, frutos y semillas a través de lesiones mecánicas en la superficie de las mismas.

Durante los primeros estudios de caracterización de los metabolitos producidos por el hongo *Alternaria tenuis*, se identificaron por primera vez compuestos dibenzo-pirona sustituidos de origen fúngico. Se encontró alternariol y alternariol metil éter, que poseen actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* (62).

Posteriormente a partir de los filtrados del medio de cultivo de este hongo, se caracterizaron diferentes grupos de compuestos:

- grupo del alternariol y alternariol metil éter.
- grupo de los ácidos altenuicos.
- grupo de la altenusina y dehidroaltenusina.
- grupo del altertenuol.
- grupo del ácido tenuazónico (66).

Actualmente se han caracterizado numerosos metabolitos producidos por diferentes especies de este género, de naturaleza química y actividad biológica diversa.

Muchos de los metabolitos de *Alternaria* están clasificados como poliquétidos, y su biosíntesis involucra caminos similares a los de la síntesis de ácidos grasos.

La biosíntesis de los compuestos del grupo del alternariol y alternariol metil éter involucra la condensación de unidades de acetil CoA y malonil CoA, con la liberación del carbono terminal de esta última unidad (77).

La biorregulación de la producción de estas micotoxinas se encuentra afectada por diferentes factores bióticos y abióticos.

Se observó que la luz puede inhibir la síntesis de poliquétidos cuando el micelio de *Alternaria alternata* es iluminado antes de comenzar la síntesis de metabolitos secundarios y durante la producción de los mismos.

La irradiación con luz azul entre 420-520 nm disminuye la producción de alternariol en un 90% con respecto a la de los controles mantenidos en la oscuridad.

También se pudo observar que esta longitud de onda inhibe la formación de conidios en el cultivo del hongo (37). Sin embargo se produce el fenómeno inverso cuando la irradiación se lleva a cabo con luz UV. Hay un incremento de la esporulación cuando el micelio es irradiado con luz UV cercana (90).

El fenómeno de inducción de la formación de esporas se observa también por aumento de la temperatura de incubación en cultivos de *A. tomato* y *A. dauci* (44), y es dependiente del medio de cultivo (90).

El estudio de la influencia de los cationes divalentes sobre la producción de metabolitos fúngicos indica que existe una estimulación de la síntesis de aflatoxinas en cultivos de *Aspergillus parasiticus* por agregado de Zn^{++} y Cd^{++} .

En cultivos de *Alternaria alternata* se encontró que la

ausencia de Zn^{++} inhibe la síntesis de alternariol y alternariol metil éter. Esta inhibición no se puede revertir por el agregado de otros cationes como Mn^{++} .

La mayor estimulación de producción de alternariol, se obtiene cuando se agrega Zn^{++} durante las primeras 50 horas de incubación de los cultivos en medio líquido.

De este modo se observa claramente la demanda de la presencia de este metal antes de la etapa de producción de poliquétidos en cultivo (22).

Otros de los factores abióticos que influyen en la producción de micotoxinas son la actividad de agua (Aw) y la temperatura del medio en el que se desarrolla el micelio.

La máxima concentración de alternariol, alternariol metil éter y altenueno que puede producir *A. alternata* cultivado sobre agar extracto de trigo, se alcanza a 25 °C con una Aw= 0,98.

La concentración de micotoxinas disminuye, cuando ambos factores disminuyen en forma conjunta, sin embargo se puede producir niveles basales de estas micotoxinas con temperaturas de hasta 5 °C y AW entre 0,90 y 0,98.

Las condiciones extremas de cultivo con temperatura de 30°C y Aw= 0,90 inhiben la producción de alternariol metil éter y altenueno, aunque el hongo continúa sintetizando alternariol.

Estos resultados indican la importancia del almacenamiento de los granos en ambientes secos, ya que el aumento de la AW favorece el crecimiento del hongo y la producción de toxinas (47).

Producción de toxinas en cultivo.

Los medios de cultivo sintéticos son apropiados para la purificación de micotoxinas porque poseen menor cantidad de pigmentos contaminantes que los medios enriquecidos.

El cultivo de *A. alternata* en medio sintético líquido, sembrado con una concentración de 500 esporas/ml, comienza la fase de crecimiento exponencial a partir del cuarto día de incubación.

A partir del día 10 el micelio presenta un aspecto desintegrado. Sin embargo el incremento de peso seco continúa hasta el día 13.

La producción óptima de micotoxinas (alternariol, alternariol metil éter y altenueno) se alcanza alrededor del día 11, con una concentración aproximada de 130 ug/100 ml.

En medio semisintético con la adición de extracto de levadura, la fase exponencial es más corta (el hongo crece con mayor velocidad), alcanza la fase estacionaria el día 6, y el nivel máximo de producción de micotoxinas se alcanza el día 9 (635 ug/ 100 ml).

Si bien la síntesis de estas micotoxinas comienza en ambos medios en la etapa temprana de crecimiento, el pico de mayor producción se observa en la etapa tardía, cuando los nutrientes son limitantes y se producen cambios en la morfología del micelio (89).

Toxinas relacionadas con la patogenicidad de *Alternaria* en plantas.

En los filtrados de cultivos de laboratorio de numerosas especies del género *Alternaria* se han encontrado numerosos compuestos con actividad fitotóxica. Estos comprenden sustancias de naturaleza química diversa, que van desde péptidos pequeños hasta fenoles.

Algunas de estas toxinas son sintetizadas específicamente por el hongo cuando se produce la infección en la planta hospedadora.

PERALES

Fitoalternarinas A, B y C.

La enfermedad de "manchas negras" (black spot disease), es específica de las peras originarias de Japón mientras que las plantas de Europa y Norteamérica resultan más resistentes.

Produce pequeñas manchas negras en la superficie de la hoja a partir de las cuales se desarrollan lesiones necróticas.

Se pudo determinar que las fitoalternarinas A, B y C de naturaleza peptídica, producidas por el cultivo de micelio de *Alternaria kikuchiana* en medio líquido, son las toxinas responsables de producir esta enfermedad.

Entre las plantas infectadas con este hongo, se encontraron algunas variedades susceptibles y otras resistentes a esta enfermedad.

Aparentemente las fitoalternarinas B y C, sólo podrían reproducir los síntomas en las variedades susceptibles, mientras que la fitoalternarina A puede inducir la necrosis en todas las plantas infectadas por *Alternaria kikuchiana*. De este modo la toxina tendría la misma especificidad que muestra el hongo y se produciría en el contexto de la invasión a la planta hospedadora (80).

Altenina

Este compuesto también se aísla a partir del cultivo de *Alternaria kikuchiana*, e induce la formación de manchas necróticas en las hojas de la variedad Nijisseiki de perales del Japón.

Se observó que la inducción de la enfermedad en plantas sanas es directamente proporcional a la concentración de altenina utilizada.

Esta toxina podría estar relacionada con las fitoalternarinas, y cumplir algún papel específico en la fitopatogenia causada por la infección del hospedante con

Alternaria kikuchiana.

ALGODON Y CITRICOS.

Tentoxina.

Este compuesto se aisla a partir del filtrado de cultivos de *Alternaria tenuis* Auct. (sinónimo *A. alternata*).

Produce clorosis variegada en forma irreversible en plántulas de algodón, cítricos y otras especies.

El hongo fue aislado a partir de las plantas que presentaban estos síntomas. Aparentemente *Alternaria* podría crecer como saprófito en la envoltura de la semilla o sobre el suelo en la cercanía de la planta. De este modo produciría la toxina que podría difundir hasta los cotiledones a través de rupturas en la envoltura de la semilla, y formar zonas cloróticas en la base de los mismos.

También se encontró que la tentoxina interfiere con la formación de clorofila en determinados tejidos de la planta, cuando ésta se encuentra en estadios tempranos del desarrollo.

(80)

ZINIA

Ziniol

Es un benceno pentasustituído producido por *Alternaria zinniae*.

La enfermedad causada por este compuesto induce la formación de manchas marrones en los cotiledones, hojas, tallo y flores de zinia, caléndula y girasol.

Las manchas forman una lesión necrótica con un halo clorótico. El tejido afectado se marchita y puede provocar la muerte de la planta.

TOMATE

Acido alternárico.

La enfermedad de la roya temprana del tomate y la papa produce puntos necróticos en los frutos y vástagos de las plantas infectadas con *Alternaria solani*. Usualmente alrededor de las lesiones necróticas aparecen zonas de clorosis.

El ácido alternárico producido por este hongo, inhibe la germinación y produce la necrosis de los tejidos afectados en plantas superiores.

Este compuesto presenta también actividad antifúngica, ya que inhibe la germinación de conidios de *Absidia glauca*, *Mirothecium verrucaria* y *Stachybotrys atra*, y retarda el crecimiento vegetativo de las hifas de *Botrytis allii*, *Fusarium caeruleum* y *Penicillium digitatum*.

Cabe señalar que este ácido puede producir patologías similares en plantas superiores que se encuentran fuera del rango de hospedantes de *A. solani*.(80)

Acido tenuazónico.

A diferencia de las toxinas que producen las especies de *Alternaria* como resultado específico de la interacción con la planta hospedadora, el ácido tenuazónico es una de las toxinas producidas por la mayoría de las especies del género, y es responsable de numerosas patologías en diferentes plantas infectadas con *Alternaria*.

Alternaria alternata es el principal agente productor del ennegrecimiento de frutos maduros de tomate.

La enfermedad está favorecida por condiciones climáticas de alta humedad y temperatura templada, y resulta más severa para los frutos maduros que para los verdes.

Una de las micotoxinas contaminantes de estos frutos es el ácido tenuazónico, aunque en los tomates visiblemente infectados se encuentran también alternariol y alternariol metil éter.

Las observaciones de campo de los frutos contaminados

muestran una mayor incidencia de infección con *A. alternata* y en menor grado con *A. tenuissima*. El hongo se manifiesta normalmente por formación de manchas negras-verdosas en la superficie del fruto, con desarrollo de micelio en los tejidos internos invadiendo pericarpio y placenta.

El ácido tenuazónico inhibe el desarrollo de los vástagos y raíces de semillas germinadas de tomate en forma directamente proporcional a la concentración de toxina ensayada.

El tomate es una de las plantas más sensibles a la acción de este ácido, aunque también puede producir manchas marrones en las hojas de tabaco. (84)

AAL-toxinas.

En las plantas de tomate se encontró que *Alternaria alternata* es el agente causal de la enfermedad conocida como cáncer de los brotes (36).

Las toxinas que causan esta enfermedad muestran la misma especificidad de huésped que el hongo, ya que los genotipos de tomate susceptibles a la infección son sensibles a las mismas, mientras que los genotipos resistentes son insensibles.

Los estudios realizados con ambos genotipos demostraron que las plantas sensibles desarrollan la enfermedad cuando son tratadas con el medio de cultivo del hongo, mientras que las plantas resistentes no muestran ningún síntoma de la enfermedad en las mismas concentraciones.

Las AAL-toxinas (19) inhiben la elongación de las raíces de las plántulas de tomate e inducen la necrosis de las hojas en forma dependiente de la concentración en las plantas sensibles.

También se observa la inhibición del crecimiento de protoplastos con ambos genotipos cuando las toxinas se agregan inmediatamente luego de realizado el cultivo. Sin embargo si

éstas se agregan luego de 10 días a partir de la siembra, los protoplastos de genotipo resistente se desarrollan normalmente mientras que los sensibles no prosperan.

De este modo la inhibición del crecimiento por las AAL-toxinas depende no sólo del genotipo de la planta sino también del estadio de desarrollo de los tejidos vegetales (92).

Esta característica de resistencia de algunos genotipos de tomate a la enfermedad producida por las AAL-toxinas podría estar relacionada con el mecanismo de resistencia de la planta a la colonización por distintos patógenos.

OLIVO.

Alternariol, alternariol metil éter, altenueno, altertoxina I y ácido tenuazónico.

A partir muestras de campo de frutos de olivo dañados por infección natural se obtiene el aislamiento de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler.

El crecimiento se obtiene por sembrado de muestras de tejido de aceitunas dañadas en agar 2%, mientras que las muestras de tejido sanas no presentan desarrollo de micelio.

En ninguno de los frutos sanos se detectan toxinas de *Alternaria*, mientras que los dañados pueden presentar diferentes cantidades de micotoxinas, entre las cuales se detectan alternariol (AOH), alternariol metil éter (AME), altenueno, ácido tenuazónico (AT) y altertoxina I (ATX I), cuyas concentraciones aumentan proporcionalmente con el daño de los tejidos.

Aparentemente la infección de los frutos con *A. alternata* se produciría a través de lesiones mecánicas en la superficie de los mismos, lo cual posibilitaría la entrada del hongo hasta la pulpa el consecuente desarrollo de micelio y producción de toxinas.

La transferencia de estas toxinas de los frutos al aceite de

oliva sólo es posible en baja proporción, y el riesgo de contaminación de los aceites sin tratamiento químico sería bajo para el consumo humano (83).

MANZANA.

AM-toxina I, II y III.

Estas toxinas se pueden aislar a partir del medio de cultivo líquido y de preparaciones de micelio de *Alternaria mali*. Este hongo es el causante de la enfermedad de manchas en las las hojas de los árboles de manzana.

Las AM-toxinas I y II son capaces de inducir la necrosis de las hojas tratadas con síntomas similares a los que produce la inoculación experimental del hongo.

La síntesis de estos metabolitos es específica de la infección de manzanos susceptibles con *A.mali* (82).

La AM-toxina III, induce necrosis en las hojas de la planta a lo largo de las nervaduras de la variedad susceptible "Indo" en una concentración 100 veces menor que la necesaria para reproducir los síntomas en la variedad resistente "Jonathan", luego de 18 horas de tratamiento. Estos datos indican que la AM-toxina III muestra un rango de fitotoxicidad similar al del patógeno (81).

GRAMINEAS.

Acido tenuazónico y alternariol.

La infección de los frijoles con *Alternaria sp.* se manifiesta por el desarrollo de micelio en el interior de los tejidos y la producción de toxinas fúngicas, principalmente ácido tenuazónico y alternariol que producirían aberraciones en el desarrollo de las mismas (68).

En semillas de sorgo y mijo, también se detectó la presencia de un derivado del ácido tenuazónico, el tenuazoato de calcio. La

investigación micológica de estas semillas indica que este compuesto es producido por el hongo patógeno *Phoma sorghina* (76).

Aparentemente esta sal del ácido tenuazónico resulta más tóxica que el compuesto de origen ya que estaría implicada en la etiología de la enfermedad hematológica onyalai. El origen de esta enfermedad se debe al consumo de granos infectados en los cuales el hongo *Phoma sorghina* produce la micotoxina (76).

Otro de los hongos productores de ácido tenuazónico es *Pyricularia oryzae* que infecta las plantas de arroz.

En las variedades de arroz resistentes a la invasión fúngica, se forman sectores de manchas marrones en las hojas, constituidos por células pigmentadas que actuarían de barrera alrededor del punto en el cual se produce la toxina. Esta reacción se relaciona con el mecanismo de defensa de la planta contra la invasión con el hongo.

Los análogos sintéticos del ácido tenuazónico, sustituidos en C₅ decrecen la fitotoxicidad del compuesto, mientras que los sustituyentes en C₃ la anulan por completo. Sin embargo algunos de estos análogos de baja toxicidad, son capaces de inducir la formación de manchas marrones en las hojas de plantas sanas, indicando que la inducción de fitotoxicidad y la reacción de defensa de la planta se deberían a diferentes estructuras (45).

En la corteza subepidérmica de los granos de trigo se observa el desarrollo de *Alternaria alternata* y *A. tricina*. Ambas especies pueden causar la decoloración de los granos de trigo, sorgo y maíz, aún cuando se encuentren almacenados a bajas temperaturas (47).

Entre las toxinas identificadas por HPLC a partir de los extractos metanólicos de granos decolorados, se encuentran el ácido tenuazónico, alternariol y alternariol metil éter (71).

TABLA: 2 Ejemplos de micotoxinas de *Alternaria*.^a

COMPUESTO/ESTRUCTURA	FORMULA MOLECULAR	ESPECIE PRODUCTORA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DIBENZOPIRONAS Y COMP. RELACIONADOS			
Altenueno	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	<i>A. tenuis</i>	Antibacteriano
Altenuisol	C ₁₄ H ₁₀ O ₆	<i>Alternaria sp.</i>	Antibacteriano Citotóxico
Altenusina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	<i>Alternaria sp.</i>	
Alternariol	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	<i>A. tenuis</i> <i>A. alternata</i> <i>A. dauci</i>	
Alternariol metil éter	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	<i>A. tenuis</i> <i>A. alternata</i>	Antibacteriano Citotóxico Fitotóxico
Altertenuol	C ₁₄ H ₁₀ O ₆	<i>A. tenuis</i>	
Dehidroaltenusina	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	<i>A. tenuis</i>	
Ac. altenuico I, II y III	C ₁₅ H ₁₄ O ₈	<i>A. tenuis</i>	
3,6,8 trihidroxi-3 metil-3,4-dihidroisocoumarina	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	<i>Alternaria sp.</i>	Fitotóxico
DIHIDRO 1,4-PIRONA			
Ac. alternárico	C ₂₁ H ₃₀ O ₈	<i>A. solani</i>	Antifúngico Fitotóxico
AC. TETRAMICO			
Ac. tenuazónico	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃	<i>A. tenuis</i> <i>A. alternata</i> <i>A. tenuissima</i> <i>Phoma sorghina</i> <i>Pyricularia oryzae</i>	Antibacteriano Antiviral Insecticida Fitotóxico Citotóxico
PEPTIDOS			
AM-toxina I, II, III	C ₂₂ H ₂₉ N ₃ O ₆	<i>A. alternata</i> <i>A. mali</i>	Fitotóxico
Fitoalternarina A, B, C	No se conoce	<i>A. kikuchiana</i>	Fitotóxico
Tentoxina	C ₂₂ H ₃₀ N ₄ O ₄	<i>A. alternata</i>	Fitotóxico
OTROS COMPUESTOS HETEROCICLICOS			
Altenina	C ₉ H ₁₄ O ₄	<i>A. kikuchiana</i>	Fitotóxico
Curvularinas	C ₁₆ H ₂₀ O ₅		Antifúngico Fitotóxico
Radquinas	C ₁₂ H ₁₄ O ₅		Fitotóxico
BENCENO PENTA SUSTITUIDO			
Zinniol	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	<i>A. zinniae</i>	Fitotóxico Antimicrobiano
DERIVADOS PERILENOS			
Altertoxina I, II, III	C ₂₀ H ₁₆ O ₆ C ₂₀ H ₁₄ O ₆ C ₂₀ H ₁₂ O ₆	<i>A. alternata</i> <i>A. mali</i>	Fitotóxico Citotóxico Antibacteriano

a: Los datos de esta tabla se obtuvieron a partir de la recopilación de bibliografía citada en: (80), (77), (42), (69).

MELIA AZEDARACH L.

Características generales de la planta.

Melia azedarach L., árbol vulgarmente conocido como paraíso, es una especie exótica oriunda de Asia, que ha sido cultivada con fines forestales y ornamentales en diferentes partes del mundo y en particular en de la República Argentina.

Este árbol es el representante más conspicuo en nuestro país del género *Melia*, uno de los cuatro géneros incluidos en la familia *Meliaceae*, y fue descrito por primera vez por Lineo en su obra *Species Plantarum* en 1753.

El paraíso es un árbol de gran porte que en la madurez puede alcanzar una altura de 10-15 metros. Su tronco es recto, muy rugoso y termina en una copa globosa. Posee hojas caducas, alternas, bi o tri-imparipinadas. Estas últimas están compuestas por folíolos glabros de forma aguda y bordes dentados, cuya longitud oscila entre 2-5 centímetros. Las flores son medianas, perfumadas, de color lila y se disponen en panojas axilares. Presentan un cáliz con 5-6 lóbulos imbrincados, 5-6 pétalos, estigma cilíndrico de extremos dilatados, 10-12 anteras, ovario con 5 celdas y estilo delgado. El fruto es una drupa elipsoidal amarilla de 1,5-2,5 centímetros de diámetro, que alberga semillas óseas y perdura largo tiempo en la planta. Florece en primavera conjuntamente con la aparición de las hojas (57), (65), (6).

Propiedades biológicas del árbol ya reportadas.

A partir de esta planta se han obtenido preparaciones con distintas actividades biológicas que se utilizan en medicina natural y agricultura.

En la mayoría de los casos el principio activo responsable

no ha sido identificado.

El jugo de hojas de paraíso es utilizado como vermífugo en diferentes partes del mundo. También se lo utiliza solo o en mezclas con otras hierbas como diurético y emenagogo. Cataplasmas de hojas o flores del árbol sirven para evitar las infecciones por piojos y otros ectoparásitos. Semillas molidas se aplican en terapias antirreumáticas y hay reportes que señalan a la corteza como remedio eficaz contra la lepra y otras enfermedades de la piel.

Los frutos son tóxicos para los animales, produciendo diferentes grados de envenenamiento según el consumidor. Una preparación obtenida a partir de ellos, es utilizada en América como insecticida. Los cultivos que crecen a la sombra de estos árboles o rodeados por ellos no son atacados por áfidos u otros insectos dañinos (12).

Antecedentes de meliacina.

Bhakuni y colaboradores(11), encontraron que los extractos hidroalcohólicos de *Melia azedarach L.* inhibían la multiplicación del virus NDV.

En nuestro laboratorio se desarrolló la búsqueda de actividades antimicrobianas en extractos crudos de hojas de plantas sudamericanas.

En el transcurso de dicha investigación se encontró que los extractos de hojas y raíces de *Melia azedarach L.* (n.v. paraíso), presentaban un amplio espectro de actividad antiviral in-vitro.

Entre los virus susceptibles se pueden citar los arenavirus junín y tacaribe y pichinde, así como también los virus polio, estomatitis vesicular (VSV), sindbis, herpes simplex tipo I y II (HSV-I y HSV-II) y pseudorrabia (PrV) (85), (27), y en menor proporción el virus aftosa.

El extracto no presenta actividad directa sobre los viriones, indicando que su acción no es virucida, sino que tiene un efecto sobre la multiplicación de los diferentes virus una vez que se establece la infección.

Otra de las características del extracto es que resulta activo tanto por pre como por post tratamiento de los cultivos celulares antes y después de su infección con el virus VSV respectivamente. Sin embargo los arenavirus y PrV resultan más susceptibles cuando el extracto se agrega luego de la infección (88) (27).

A partir de estos resultados se intentó determinar si los extractos de otras plantas de la familia Meliaceae presentaban actividad antiviral.

Del mismo modo que *Melia azedarach L.*, los extractos de *Trichillia glabra* presentaron actividad inhibitoria frente a un amplio espectro de virus DNA y RNA por pre y post tratamiento de los cultivos infectados, mientras que los extractos de *Cedrela tubiflora* resultaron activos por post-tratamiento únicamente (87).

Citotoxicidad de los extractos crudos y semipurificados de *Melia azedarach L.*

Los extractos crudos (en una concentración de 0,6 mg/ml de proteína) afectaron la viabilidad de monocapas preformadas de células Vero y BHK-21, mostrando esta última una mayor susceptibilidad luego de 24 horas de tratamiento a 37^o C. Sin embargo la toxicidad disminuyó cuando el extracto fue sometido a una cromatografía de intercambio iónico a través de una matriz de DEAE Sephadex. Asimismo la actividad específica de esta fracción semipurificada aumentó 600 veces con respecto al extracto crudo,

conservando siempre el rango de actividad frente a los distintos virus.

Los ensayos realizados con células Vero indicaron que no hubo variación en el ritmo de crecimiento celular entre los cultivos controles y los tratados con la fracción DEAE, tanto en la fase de crecimiento exponencial como en el periodo estacionario (2).

El siguiente paso consistió en testear esta fracción parcialmente purificada en un modelo animal.

Para ello se eligió el modelo de infección de ratones lactantes con virus tacaribe, que causa encefalitis y muerte de los ratones infectados.

La inhibición del virus tacaribe en cultivo de células se producía por post-tratamiento hasta 5 horas después de agregado el inóculo. A partir de este dato los ratones se trataron con meliacina 24 horas antes y 6 días consecutivos luego de la infección con tacaribe.

Los ratones tratados con el antiviral fueron resistentes a la infección mientras que en los controles no tratados se registró una mortalidad del 100%.

Asimismo esta resistencia a la infección se obtuvo también cuando las madres de los ratones lactantes fueron tratadas con el extracto.

Sin embargo estos resultados no indican si meliacina afecta específicamente la replicación del virus tacaribe en los ratones tratados, o reduce la respuesta celular inmune que causa la muerte de los animales infectados (5).

Se encontró que los niveles séricos de interferón en los animales infectados y tratados con el extracto son significativamente menores que los de los correspondientes controles infectados no tratados (21). De este modo, se descarta

que la muerte de los ratones se deba a un efecto tóxico del interferón sobre el sistema hepático del ratón, reportado anteriormente para otros virus relacionados (16).

Estudios sobre el mecanismo de acción de meliacina.

El inhibidor parcialmente purificado a partir de los extractos crudos de paraíso, fue denominado meliacina. Una particularidad de este antiviral es su capacidad de establecer en las células tratadas un estado refractario a la infección viral por tratamiento de los cultivos antes de la infección con diferentes virus.

La máxima actividad se alcanza con un tratamiento de los cultivos celulares durante 2 horas antes de la infección, y se conserva aproximadamente 24 horas, tiempo luego del cual decae. Sin embargo la actividad se reestablece con la aplicación de una nueva dosis de extracto sobre los cultivos infectados.

Se encontró que meliacina requiere de un metabolismo celular activo para desencadenar el estado antiviral, ya que si se tratan las células con el extracto a 4 °C, no produce tal actividad.

El mismo fenómeno se observa cuando el tratamiento se lleva a cabo en presencia de actinomicina D.

Con estos resultados se puede inferir que el mecanismo de acción de meliacina requiere de la síntesis de-novo de algún factor celular a través del cual ejerce la inhibición de la replicación viral (4).

Los ensayos sobre síntesis de RNA y proteínas en las células tratadas con meliacina, indican que no hay una inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares, ya que los patrones no presentaron diferencias con los cultivos controles (86).

Sin embargo se encontró que en las células tratadas

disminuye la actividad de proteína quinasa. Se observó una disminución de la capacidad de los extractos de células tratadas de fosforilar histona H1. Además, estos extractos presentan una marcada disminución en el patrón de fosforilación de proteínas celulares.

También se observó que meliacina inhibe la síntesis de interferón in vitro e in vivo (3). Se encontró que en células L 929 disminuye la capacidad de fosforilación de la quinasa dependiente de RNA doble cadena. (4)

De este modo el producto inducido en los cultivos celulares por el tratamiento con meliacina, sería responsable de la modificación post-transcripcional de macromoléculas celulares a nivel de fosforilación.

Se pudo establecer que meliacina no inhibe la adsorción ni la penetración del virus sindbis en células BHK-21, pero si estaría inhibida la síntesis de RNA viral (86).

En células Vero infectadas con PrV, la inhibición de la replicación tampoco involucra la adsorción ni la penetración del virus. El paso del ciclo de multiplicación afectado estaría relacionado con la síntesis de proteínas tempranas del virus (27) ya que el agregado del extracto luego de 4 horas de infección no tiene efecto inhibitorio (8), (7).

Por otro lado, la penetración del virus VSV en células Vero sería afectada por el agregado de meliacina a los cultivos infectados, mientras que cuando el mismo virus infecta células BHK-21, el evento afectado sería la replicación temprana del RNA viral (1), de modo que la acción de meliacina depende del huésped utilizado.

Efectos de meliacina sobre el sistema inmune del ratón.

Otros estudios realizados en el laboratorio mostraron que la

tasa de mortalidad de los ratones adultos de la cepa Balb/c infectados con virus HSV-1 (cepa neurotrópica Mc Intyre) y tratados con el extracto por vía intraperitoneal, se encuentra significativamente aumentada.

Cuando este fenómeno se estudió con mayor detalle, se encontró que aumentaba la susceptibilidad de las células adherentes peritoneales a la infección con HSV-1 a causa del tratamiento (17).

Los resultados anteriores dan idea de que entre las variadas propiedades biológicas de *Nelia azedarach L.* podría haber alguna que afectara directamente al sistema inmune.

Estudios llevados a cabo en ratones de la cepa Balb/c mostraron que como consecuencia del tratamiento se produce una leve inhibición de la respuesta inmune humoral dosada por las técnicas de titulación de suero por hemaglutinación directa y titulación de células formadoras de anticuerpos obtenidas a partir del bazo del animal tratado.

Si bien todos los extractos poseen actividad antiviral, no todos producen una disminución significativa en los parámetros recién mencionados lo cual relativiza la relación existente entre ambas actividades. No se puede asegurar que las dos se deban al mismo principio activo (23).

Por otro lado los extractos presentan un efecto inhibitorio sobre la capacidad fagocítica de las células peritoneales adherentes de ratón, dosada por la técnica de eritrofagocitosis. Dicha actividad no puede atribuirse a la toxicidad del compuesto sobre las células efectoras ya que éstas recuperan su funcionalidad si se retira el extracto del medio de cultivo.

Este efecto antifagocítico es dependiente de la dosis, no se manifiesta de manera inmediata, y parece ser independiente de la

estimulación previa de las células efectoras (24).

OBJETIVOS

Determinar si las hojas de la planta de paraíso se encuentran colonizadas por endofitos fúngicos y establecer si estos hongos son responsables de producir la actividad antiviral estudiada hasta el presente en los extractos de dicha planta.



MATERIALES Y METODOS

1 - MEDIOS DE CULTIVO, BUFFERS Y SOLUCIONES.

1.1 - Medio de crecimiento y mantenimiento celular.

Se utilizó el medio esencial de Eagle (MEM) en solución salina balanceada con glutamina (Medio sintético de Gibco) suplementado con suero bovino inactivado a 56°C durante 30 minutos y 50 ug/ml de gentamicina, pH=7,0-7,2.

Para el crecimiento de las células se utilizó una concentración de 5% de suero (MEM 5%), mientras que para su mantenimiento y para la obtención de los stocks de virus la concentración utilizada fue de 2% (MEM 2%).

1.2 - Medio semisólido de plaqueo.

Se utilizó MEM 5% doble concentración (MEM 2x), diluido al medio en agar 1,4%.

1.3 - Medios para el crecimiento de hongos.

MEDIO AGAR EXTRACTO DE MALTA

Extracto de malta Britania	30 gr
Bactoagar DIFCO	20 gr
Agua bidestilada	1000 ml

MEDIO SALINO DE CZAPEK-DOX

Glucosa	50 gr
Nitrato de sodio	3 gr
fosfato dipotásico	1 gr
Sulfato de magnesio	0,5 gr
Cloruro de potasio	0,5 gr
Sulfato ferroso	0,01 gr
Agua bidestilada	1000 ml

1.4 - Medio sólido de esporulación de hongos.

Sacarosa	20 gr
Carbonato de calcio	30 gr
Agar	20 gr
Aqua bidestilada	1000 ml

1.5 - Medio agar de Mueller-Hinton.

Este medio se utiliza para ensayos de resistencia o sensibilidad de bacterias frente a compuestos con actividad antibiótica.

Infusión de carne	5 gr
Caseína hidrolizada	17,5 gr
Almidón	1,5 gr
Agar	20 gr
Aqua bidestilada	1000 ml

1.6 - Buffer de extracción (PK).

Se utilizó un buffer fosfato de potasio 10 mM pH=7,2 para realizar los extractos crudos de micelio, y el mismo buffer con el agregado de 0,35 M de cloruro de potasio para realizar los extractos crudos de *Melia azedarach L.*

1.7 - Solución de obtención de esporas (PBS-TWEEN 80).

Cloruro de sodio	8 gr
Cloruro de potasio	0,2 gr
Fosfato diácido de potasio	0,2 gr
Fosfato ácido de sodio	1,44 gr
Tween 80	0,05 ml
Aqua bidestilada	1000 ml

2 - CELULAS Y VIRUS

2.1 - Células Vero.

Se utilizó la línea continua establecida, procedente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Los cultivos se mantuvieron mediante repiques cada 3 o 4 días con MEM 5%, y el medio de mantenimiento empleado fue el MEM 2%.

Estas células se utilizaron tanto para la obtención de los stocks de virus, como para los ensayos de actividad antiviral y toxicidad de los extractos.

2.2 - Virus de la estomatitis vesicular (VSV).

Se utilizó el serotipo Indiana mantenido en nuestro laboratorio por pasajes en células Vero.

2.3 - Virus de pseudorrabia (PrV).

Se utilizó una cepa cedida por la Dra. Ceriati de la Universidad de Río Cuarto, aislada durante una epidemia de la enfermedad de Aujeszky en dicha región.

2.4 - Virus herpes simplex de tipo I (HSV-I).

Se utilizó la cepa F originaria de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), que fue mantenida por sucesivos pasajes en células Vero.

3 - PREPARACION DE LOS STOCKS DE VIRUS.

3.1 - Stock de VSV.

Se infectaron monocapas de células Vero con una multiplicidad de 0,1 UFP/célula. Luego de una hora de adsorción a

37⁰C se descartó el inóculo , se agregó MEM 2% y las células se incubaron durante 18 hs a 37⁰C. Al cabo de este tiempo se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos infectados, y el material se clarificó por centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos. El stock VSV/90, cuyo título resultó de $4,3 \times 10^8$ UFP/ml se utilizó en los ensayos de detección de actividad antiviral.

3.2 - Stock de PrV.

Se infectaron monocapas de células Vero con una multiplicidad de 1 UFP/célula y los cultivos se cubrieron con MEM 5%.

Luego de 24 hs de incubación a 37⁰C, se cosechó el virus intra y extracelular, mediante tres ciclos de congelamiento y descongelamiento. El material se clarificó por centrifugación a 10.000 x g y el stock obtenido (PrV-2/89) se tituló por formación de placas ,dando un título de 2×10^7 UFP/ml.

3.3 - Stock de HSV-1.

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en botellas de 60 ml con una multiplicidad de infección de 0,1 UFP/célula de HSV-1.

Luego de 1 hora de adsorción con agitación periódica se descartó el inóculo , los cultivos se cubrieron con MEM 2% y se incubaron a 37⁰C. A las 24 hs post infección, se cosechó el virus intra y extracelular. Para ello los cultivos se sometieron a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento, y por último el stock se clarificó por centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos.

El título del stock obtenido fue de $4,9 \times 10^6$ UFP/ml.

Todos los stocks obtenidos fueron conservados a -70⁰C.

4 - CEPAS DE BACTERIAS Y HONGOS.

Estas cepas se utilizaron en los ensayos de actividad de M2003 contra diferentes grupos de microorganismos.

Entre las bacterias ensayadas se utilizaron : *Escherichia coli* (cepa Hfr H GCSC 259), *Bacillus subtilis* (cepa SB 491), *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (ambas cedidas por la cátedra de Análisis Biológicos de la FCEyN U.B.A.).

En los ensayos de actividad antifúngica, se utilizaron hongos aislados de hojas de paraíso que no pertenecen al género *Alternaria*, obtenidos durante este trabajo los cuales no han sido aún identificados.

5 - TITULACION DE VIRUS .

Se utilizó la técnica de titulación por formación de placas bajo agar.

Las células empleadas para la titulación de VSV, PrV y HSV-1 fueron de la línea Vero.

Las monocapas crecidas en botellas de vidrio de 15 ml se infectaron con 0,02 ml de la dilución adecuada de virus. Luego de 1 hora de adsorción con agitación periódica a 37°C, se retiró el inóculo, las células se lavaron con PBS y se cubrieron con medio semisólido de plaqueo (MEM 2x).

Los cultivos infectados se incubaron a 37°C durante 48 hs para VSV y 72 hs para PrV y HSV-1. Al cabo de este tiempo los cultivos se fijaron con formol 10% durante 30 minutos y se tiñeron con cristal violeta.

El título se calculó según la siguiente fórmula :

TITULO = N^o de placas x factor de dilución/volumen de inóculo

6 - RECOLECCION DE MATERIAL VEGETAL.

Se recolectaron hojas macroscópicamente sanas, a partir de árboles de paraíso de la zona de Bella Vista (Noroeste de la Provincia de Buenos Aires), elegidos en base a la actividad antiviral previamente detectada en extractos de sus hojas.

Entre las hojas recolectadas se distinguen:

- Hojas jóvenes, de color verde claro y longitud menor de 2 cm.
- Hojas maduras, de color verde oscuro y longitud entre 2 y 5 cm.
- Hojas senescentes, de color amarillo, que se desprenden con facilidad de la planta.

Para la realización de los extractos crudos, se eligieron hojas maduras, mientras que el aislamiento de endofitos se realizó a partir de los tres tipos foliares.

7 - AISLAMIENTO DE ENDOFITOS A PARTIR DE HOJAS DE *Melia azedarach* L.

Se realizó un muestreo al azar de aproximadamente 20 a 30 hojas de cada edad en cada aislamiento.

Para el aislamiento de endofitos, se realizó una esterilización superficial de las hojas recolectadas. Un foliolo de cada hoja se colocó secuencialmente en etanol 50% durante un minuto, luego dos minutos en hipoclorito de sodio (57 gr/l) y finalmente un minuto en etanol 50%.

Luego de la esterilización superficial, se cortó un cuadrado de 0,4 x 0,4 cm de cada muestra con un escalpelo estéril y se sembró sobre una superficie de agar 2%. De esta manera el hongo

crece utilizando como sustrato la superficie de la hoja.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente con luz natural durante aproximadamente 30 días.

Finalmente los hongos aislados se repicaron en un medio de cultivo agar extracto de malta 5% y se mantuvieron a 25^oC en oscuridad, identificandose el género que apareció con mayor frecuencia.

8 - OBSERVACION MICROSCOPICA DE LA SUPERFICIE FOLIAR.

Se realizó una decoloración de la hoja y luego una tinción para observar esporas y desarrollo de hifas de los posibles hongos que colonizan la superficie foliar de *Melia azedarach L.*

Para decolorar una muestra de cada hoja se coloca en lactofenol:etanol 1:2 , en baño a 100^oC durante 3 hs hasta observar decoloración.

La tinción de las muestras decoloradas se realizó durante 24 hs en los siguientes colorantes :

- Azul de tripán en lactofenol
- Negro de clorazol
- Fucsina ácida

Las muestras teñidas se conservaron en glicerina y se observaron con el microscopio óptico a 400 x.

9 - CRECIMIENTO DE *Alternaria* EN MEDIO SOLIDO Y LIQUIDO.

9.1 - Obtención de esporas de M2003.

Para la obtención de esporas se hizo crecer la cepa M2003 en medio de esporulación. Una vez que se observó el desarrollo de conidios se colocaron 5 ml de PBS/tween y se agitó durante 30

segundos. El sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio para separar los restos de micelio y las esporas se concentraron por centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos. Posteriormente se realizó el conteo de las mismas en cámara de Neubauer.

9.2 - Curva de crecimiento de M2003 en medio sólido.

Se sembraron 50 ul de una suspensión que contenía $9,25 \times 10^4$ esporas/ml de la cepa M2003, obtenida según se detalla en 9.1, en el centro de un placa de Petri con medio agar-extracto de malta o agar Czapek-dox.

Los cultivos se incubaron a 25°C en oscuridad y se midió el diámetro de cada colonia a los diferentes días postsiembra. También se realizó la observación del micelio para controlar la esporulación en ambos medios .

A los 12 días postsiembra, se realizaron extractos crudos de micelio crecido en ambos medios, a fin de comparar la actividad antiviral y la toxicidad de los mismos sobre cultivos celulares.

9.3 - Curva de crecimiento de M2003 en medio líquido.

Para ensayar el crecimiento del hongo en medio líquido se utilizaron recipientes de 100 ml conteniendo 20 ml de medio Czapek-Dox .

Los frascos fueron inoculados con una suspensión de esporas tal que la concentración final fue de 230 esporas/ ml de medio y se incubaron a 25°C, en oscuridad , con agitación (250 rpm).

A los diferentes días post inoculación, se tomaron muestras por triplicado y se determinó el pH del medio de cultivo, la concentración de glucosa residual, el peso seco del micelio y la actividad antiviral.

9.4 - Determinación de peso seco.

Se filtró el micelio de los cultivos en medio líquido, a través de un papel Whatman N^o1. Este se secó en estufa durante 24 hs a 60^oC, y se determinó el promedio del peso seco de cuatro muestras por punto.

9.5 - Determinación de glucosa residual.

Se siguió el método del fenol-sulfúrico (28).

Se agregaron 0,05 ml de una solución de fenol a 2 ml de la muestra de medio de cultivo. Luego se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado sobre la superficie del líquido. Se dejó reposar la mezcla durante 10 min y finalmente se homogeneizó la mezcla por inversión.

Se incubaron entre 10 y 20 minutos en baño de agua a 70^oC y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 490 nm.

10 - PURIFICACION PARCIAL DEL COMPUESTO ACTIVO DE M2003.

10.1 - Desarrollo de micelio en medio sólido.

Se realizaron repiques de micelio de la cepa M2003 en placas de Petri conteniendo agar-extracto de malta 5% o agar Czapek-Dox.

Las placas se incubaron a 25^oC en oscuridad durante 10-12 días, hasta la observación de formación de esporas en la masa de micelio.

10.2 - Extracto crudo.

Se levantó la masa de micelio con un ansa curva y se maceró en un homogeneizador de vidrio a 4^oC con el buffer.

El macerado se clarificó por centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante, que se utilizó como fuente de

extracto crudo, se conservó a -20°C .

10.3 - Extracción con solvente a partir del medio sólido.

Se levantó la masa de micelio y se colocó en un Erlenmeyer, conteniendo 10 ml de metanol. Luego de una hora de agitación se filtró el material soluble y se agregaron 10 ml de agua bidestilada. Posteriormente se realizaron dos extracciones con cloroformo, se separó la fracción orgánica y se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio.

Una parte del material extraído se resuspendió en 0,5 ml de PBS para la determinación de la actividad antiviral, una alícuota se conservó para la identificación del material por cromatografía en capa delgada (TLC).

10.4 - Desarrollo del micelio en medio líquido.

Se sembraron esporas de M2003 en 200 ml de medio Czapek-Dox, en una concentración final de 237 esporas/ml de medio.

Los cultivos se incubaron a 25°C con agitación, en oscuridad durante 8 días. Al cabo de este tiempo se filtró el medio, se descartó el micelio, y el medio líquido obtenido se utilizó como material de partida para la purificación parcial.

10.5 - Extracción con acetato de etilo.

Se realizaron dos extracciones con acetato de etilo a partir del medio líquido utilizando la mitad del volumen de solvente para cada una. Se descartó la fase acuosa y la fase orgánica se evaporó a sequedad.

10.6 - Cromatografía en columna de sílica gel.

El material soluble en acetato de etilo se resuspendió en un

volumen mínimo del mismo solvente, se mezcló con 1 gr de sílica y se secó al vacío. Esta pastilla se sembró en el tope de una columna de sílica gel (Kieselgel 60 Merck). Las fracciones eluidas con diferentes proporciones de mezcla cloroformo-metanol (con polaridad creciente), se evaporaron a sequedad, y una alícuota se conservó para medir actividad antiviral.

10.7 - Cromatografía en capa delgada (TLC).

Las fracciones activas eluidas de la columna de sílica se reunieron y evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio. Este material se resuspendió en un volumen mínimo de acetato de etilo, y se sembró en una placa de sílica de 20 x 20 cm (Merck:DC-Alufolien Kieselgel 60/Kieselgur F254).

Se utilizaron como reveladores las mezclas de: ácido sulfúrico 5% en etanol, y cloruro férrico 2% en etanol.

En la cromatografía semipreparativa, se levantaron las bandas de la placa y el material se eluyó por separado con acetato de etilo.

Los solventes de corrida utilizados fueron: cloroformo:metanol 90:10, y cloroformo:acetona 88:12 según el experimento realizado.

11 - PURIFICACION PARCIAL DE MELIACINA.

11.1 - Obtención de extracto crudo.

11.1.1 - A partir de hojas de *Melia azedarach* L.

Se utilizaron las hojas maduras de las plantas de paraíso de la zona de Bella Vista. Estas fueron lavadas dos veces con agua destilada y se maceraron en presencia de buffer de extracción FK.

con el agregado de 0,35 M de KCl, pH=7,2. El macerado se clarificó por centrifugación a 10.000 x g durante 40 minutos. Se descartó el material precipitado, y el sobrenadante fue utilizado como fuente de extracto crudo.

11.1.2 - A partir de brotes de paraíso cultivados in-vitro.

Los brotes fueron cultivados en el medio base de Murashige-Skood(53), con el agregado de 6-bencilaminopurina (1 mg/ml), sacarosa (30 gr/l) y agar (7gr/l).

El extracto crudo se realizó aplicando la metodología empleada para los extractos de hojas.

11.1.3 - A partir de callos cultivados in-vitro.

Se utilizaron callos vitreos obtenidos a partir de yemas y de brotes de paraíso. Estos se cultivaron en el mismo medio base que los brotes, pero los reguladores agregados fueron :ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2 mg/ml), 6-furfurilaminopurina (0,2 mg/l) y agar (7 gr/l).

Este material se maceró en presencia de buffer de extracción PK (1 gr de material/3ml de buffer) en un homogeneizador de vidrio.Se centrifugó a 10.000 x g durante 40 minutos y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo.

11.1.4 - A partir de cultivos en suspensión de células de paraíso.

Los cultivos de células se realizaron a partir de los callos vitreos, en el mismo medio base de cultivo sin agar, con el agregado de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2mg/l) y 6-furfurilaminopurina (0,2 mg/l). Las suspensiones se cultivaron con agitación a 100 rpm.

Para realizar el extracto crudo se separaron las células del

medio de cultivo por centrifugación a 2.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se conservó a -20°C y el precipitado de células se maceró en un homogeneizador de vidrio con el agregado de dos volúmenes de buffer PK.

Luego el macerado se clarificó por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 40 minutos y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo.

Todos los extractos obtenidos fueron conservados a -20°C .

11.2 - Extracción con acetato de etilo a partir de los extractos crudos de hojas maduras de paraíso.

El extracto crudo se concentró por liofilización. Se resuspendieron 20 gr de este liofilizado en 100 ml de agua bidestilada a 4°C , con agitación durante una hora. Luego se clarificó por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 30 minutos y el sobrenadante se extrajo con igual volumen de acetato de etilo. Se conservó una alícuota de la fase acuosa para medir actividad antiviral.

Por otro lado la fase orgánica se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio. Una alícuota del evaporado se resuspendió en PBS para determinar actividad.

11.3 - Cromatografía en columna de sílica gel.

La fracción soluble en acetato de etilo, se resuspendió en un mínimo volumen de cloroformo y se sembró en el tope de una columna de similares características a la empleada en el paso 10.6.

La elución se realizó con mezclas de cloroformo-metanol de polaridad creciente, y las fracciones recolectadas fueron cromatografiadas en capa delgada.

Por otro lado una alícuota de cada fracción se resuspendió en PBS para medir actividad antiviral.

11.4 - Cromatografía en capa delgada (TLC).

Las fracciones activas eluidas de la columna de sílica se sembraron en capa delgada de sílica y se corrieron como se indicó en el punto 10.7 de esta sección.

Las bandas obtenidas fueron reveladas con ácido sulfúrico 5% en etanol.

12 - ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

12.1 Por determinación de la DE50.

Se utilizaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos.

Para la titulación del material procedente de hojas (meliacina), se realizó un pretratamiento de los cultivos durante dos horas antes de la infección.

La titulación del material aislado de los hongos se realizó por tratamiento de los cultivos luego de la infección (postratamiento).

En todos los casos las monocapas se infectaron con 1000 UFP de VSV. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y las células se cubrieron con MEM 2% o MEM 2% conteniendo diluciones seriadas del material a titular, y se incubaron a 37°C hasta las 18 horas postinfección.

Finalizada la incubación se observó el efecto citopático producido por el virus en las células tratadas y se comparó con un control infectado no tratado.

Se definió la DE50 con la inversa de la dilución de

extracto, capaz de proteger al 50% de los cultivos tratados contra la infección viral. El calculo se efectuó por el método de Reed y Muench (64). Se definió la concentración antiviral (CA) como la concentración en peso seco (gr/ml) de extracto correspondiente a una DE50.

12.2 - Por determinación del rendimiento viral.

Se utilizaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos. Se relizaron dos series de tratamientos:

- a) pretratamiento de las células durante 2 hs previas a la infección con diferentes diluciones de extracto.
- b) - post-tratamiento de los cultivos con las diluciones de extracto luego de la infección.

En ambos casos las monocapas se infectaron con 1000 UFP de VSV. Luego de 1 hora de adsorción a 37⁰C, se retiró el inóculo las células se cubrieron con MEM 2% o MEM 2% conteniendo diluciones seriadas del material a titular, y se incubaron a 37⁰C hasta las 18 horas postinfección.

Al cabo de este tiempo se cosechó el sobrenadante de las células y se titulo por plaqueo.

Se comparó el rendimiento de los cultivos tratados con el de los controles sin tratar y la actividad se expresó como el log del cociente entre ambos títulos.

13 - ENSAYO DE TOXICIDAD EN CELULAS.

Para este ensayo se trataron por triplicado los cultivos de células Vero con diferentes diluciones de cada extracto.

Las células tratadas se incubaron durante 24 hs a 37⁰C y se

comparó el aspecto de las monocapas tratadas con respecto a un control no tratado.

Se definió la dosis citotóxica 50 (DC50), como la inversa de la dilución de extracto que resultó tóxica para el 50% de los cultivos tratados, por el método de Reed y Muench. Se definió la concentración citotóxica (CC), como la concentración en peso seco por ml de extracto que corresponde a una DC50.

14 - ENSAYO DE TOXICIDAD DE LA FRACCION PURIFICADA DE M2003 EN RATONES ADULTOS.

Se utilizaron machos adultos de 45 días de la cepa endocriada BALB/C. Grupos de 10 animales, se inocularon por vía intraperitoneal con 0,5 ml de una dilución que tenía una concentración de 0,2 mg/ml de material purificado a partir de extracto de M2003. Se administró una dosis diaria durante dos días consecutivos de dicho material.

Otro grupo de animales recibió el mismo tratamiento con PBS y fue utilizado como control del ensayo.

Se realizaron observaciones diarias de los animales durante un mes para detectar morbilidad y o mortalidad de los ratones tratados .

15 - ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

15.1 - Actividad de M2003 crecido en placa.

Se realizó un repique de la cepa M2003 en medio agar extracto de malta 5%. A los 3 días, una vez que la colonia de *Alternaria* tenía un diámetro aproximado de 3,5 cm se realizaron estrias con diferentes cepas de bacterias sobre la misma placa en

la que crecía el hongo. Las cepas utilizadas en este ensayo fueron : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomona aeruginosa* .

Los cultivos se incubaron a 25^oC en oscuridad, y a las 24 horas se observó el crecimiento bacteriano en cada estria.

15.2 - Actividad antibacteriana del medio de cultivo líquido de M2003.

Para este ensayo se cultivaron las cepas de bacterias en caldo nutritivo durante 18 horas a 37^oC.

Una vez observado el crecimiento bacteriano se sembró 1 ml de cada cultivo sobre una placa de Petri con agar Mueller-Hinton. Luego se colocaron anillos cilindricos estériles sobre la placa y dentro de cada uno de ellos el medio líquido de cultivo del hongo.

Las placas se incubaron a 37^oC durante 24 horas y se observó el crecimiento bacteriano.

16 - ENSAYO DE ACITIVIDAD ANTIFUNGICA.

16.1 - Ensayo de antagonismo.

Para este experimento se utilizaron cepas de hongos diferentes de *Alternaria* que fueron aisladas a partir de hojas de paraiso por la técnica de esterilización superficial.

Se realizaron repiques enfrentados de *Alternaria*, cepa M2003 y el hongo a ensayar , en la misma placa de Petri que contenía medio de cultivo agar-extracto de malta 5%. Estas placas se incubaron durante 15 días a temperatura ambiente en oscuridad y se realizaron observaciones cada 2 días del patrón de crecimiento de los hongos .

midió el radio de las colonias sobre la línea de unión entre ambos centros y la inhibición del crecimiento se determinó por la disminución del radio de la colonia en sentido opuesto al hongo antagonista con respecto a la medida del mismo hacia el borde de la placa.

16.2 - Actividad antifúngica del medio de cultivo de M2003 .

Se preparó un medio agar Czapek-Dox que contenía una dilución 1/10 del filtrado del medio líquido de crecimiento de M2003 . Sobre este medio se realizaron los repiques de los otros géneros de hongos aislados del paraíso para ensayar si resultaban inhibidos por algún metabolito exportado por M2003 al medio extracelular.

Los controles de cada cepa ensayada se repicaron en el mismo medio sin el agregado de M2003.

Luego de 15 días de incubación a temperatura ambiente, en oscuridad, se midió el diámetro de cada colonia crecida en presencia del filtrado de M2003 , el cual se comparó con el diámetro del control correspondiente .

RESULTADOS

FARTE I

1- AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE HOJAS DE *Melia azedarach* L RELACION DE LOS HONGOS AISLADOS CON LA PLANTA HUESPED.

1.1- Aislamiento de hongos a partir de muestras de hojas de paraíso.

Dado que la mayoría de las plantas vasculares, se encuentran colonizadas por endofitos fúngicos, se encaró el aislamiento de los mismos a partir de hojas de *Melia azedarach* L., con el objeto de identificar un posible agente productor de la actividad antiviral detectada en las hojas de paraíso (1),(2),(87), ya que los estudios químicos del principio activo mostraban una estructura molecular semejante a la ciclosporina (péptido cíclico), producida por hongos del género *Tolyposcladium* (94).

Se utilizó la técnica de esterilización superficial de las hojas, que permite eliminar a los organismos epífitos que colonizan la superficie foliar. De este modo se posibilita el aislamiento de aquellos organismos denominados endofitos que se desarrollan en contacto con los tejidos internos de la hoja (13).

La figura 1 muestra que sobre un total de 134 muestras de hojas maduras de paraíso recolectadas al azar a partir de cuatro plantas de la zona de Bella Vista (NO prov. Bs. As.) durante el período de marzo-abril de 1989, sólo 37% presentaron desarrollo de micelio, las cuales se consideraron muestras positivas.

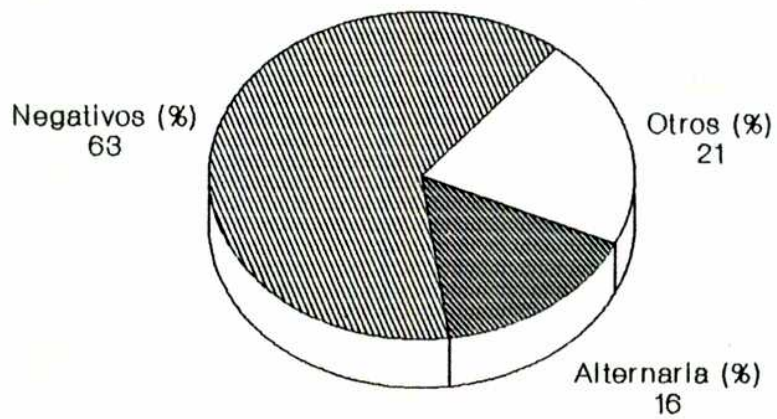
De acuerdo con la hipótesis planteada al comienzo del trabajo, la frecuencia de aislamiento del posible hongo productor del antiviral, debería ser mayor que la de las demás especies relacionadas con la planta, ya que los extractos de hojas presentan una alta actividad.

De este modo, sólo fueron caracterizados aquellos aislamientos que aparecieron más frecuentemente. En nuestro caso estos hongos correspondieron al género *Alternaria*, y posteriormente la mayoría de ellos fueron identificados como *Alternaria alternata*.

La frecuencia de aislamiento de *Alternaria* correspondió al 57,1% sobre el total de aislamientos positivos (ver figura 2). Otros que aparecieron con menor frecuencia, no fueron identificados.

FIGURA 1:

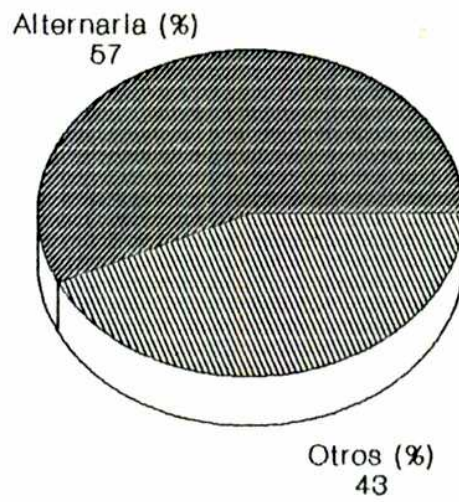
Aislamiento de hongos de *Melia azedarach* L.



Se consideraron positivas aquellas muestras de hojas a partir de las cuales se observó desarrollo de micelio por la técnica de aislamiento de endofitos.

FIGURA: 2

Frecuencia de aislamiento de hongos del género *Alternaria*.



1.2- Ensayo de actividad antiviral en extractos crudos de los hongos aislados

Todos los aislamientos obtenidos fueron repicados a un medio agar-extracto de malta, que resultó apto para el desarrollo de la mayoría de las especies fúngicas (33).

Para el ensayo de actividad antiviral, se eligieron cinco aislamientos pertenecientes al género *Alternaria*, y otros cinco correspondientes a los géneros no identificados y de menor frecuencia. Luego de 20 días de realizados los repiques, se prepararon los extractos crudos de micelio según la metodología explicada en la sección 10.2 de materiales y métodos.

Se infectaron monocapas de células Vero, crecidas en tubos de ensayo, con una multiplicidad de 1 UFP/célula de virus VSV. Luego de 1 hora de adsorción a 37 °C, una parte de los cultivos se cubrió con medio de cultivo (MEM 2%), o MEM 2% conteniendo una dilución 1/10 de cada extracto crudo. Otros cultivos tratados con extracto pero sin infectar, sirvieron como control de toxicidad de los mismos.

Los resultados de la tabla 3 muestran que los extractos de dos de los hongos identificados como *Alternaria alternata*, disminuyeron el título del virus en casi dos órdenes con respecto al control no tratado, mientras que los extractos de otros aislamientos del mismo hongo, así como los de los hongos de menor frecuencia, no presentaron actividad. Cabe señalar que los extractos activos no resultaron tóxicos para los cultivos celulares en la dilución ensayada. La inhibición observada, se verificó únicamente cuando el extracto se agregaba al medio de cultivo luego de la infección.

TABLA

ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LOS HONGOS AISLADOS.

	Aislamiento Citotoxicidad (a)	Actividad antiviral -log vt/vc (b)
M2000	no	0
M2001	no	0
M2002 #	no	1,80
M2003 #	no	1,72
M2004 #	si	0
M2005 #	si	0
M2011	no	0
M2021	no	0
M2025 #	si	0
M2032	no	0

Aislamientos correspondientes al género *Alternaria*.
a Citotoxicidad de cada extracto en la dilución 1/10.
b Actividad antiviral de cada extracto en la dilución 1/10.

1.3- Observación microscópica de la superficie foliar.

Si bien *Alternaria* no se encuentra citado en la literatura como un endofito característico, y dado que en muchos casos es posible detectar el desarrollo de los endofitos en el interior de los tejidos de la planta por microscopía óptica, utilizando diferentes técnicas de tinción, se realizó una decoloración de las hojas de *Melia azedarach L.* con etanol-lactofenol, y una posterior tinción para observar esporas y desarrollo de micelio.

La tabla 4 muestra que el 68,6% de las hojas analizadas presentaron esporas de *Alternaria*. La incidencia de germinación, determinada por la presencia de tubos germinativos, resultó del 40%. También se observó desarrollo de micelio en el 42,86% de las muestras estudiadas. La figura 3 ilustra el aspecto de las

esporas de *Alternaria* germinadas sobre la superficie de la hoja.

De acuerdo con estos resultados la frecuencia de aislamiento de *Alternaria* debería ser el doble de la obtenida por la técnica de aislamiento de endofitos (fig.1: 21 %). Esto indica que la esterilización superficial resultó efectiva para la inactivación de las esporas alojadas sobre la superficie de la hoja, y permite detectar a los hongos vinculados con el interior de la hoja.

Como complemento, se realizaron cortes ultrafinos de las hojas, para detectar la presencia del hongo en el interior de las células por microscopía electrónica. No fue posible observar desarrollo de micelio en el interior de la hoja. Este resultado no se contrapone con el dato de los aislamientos, ya que la técnica es sumamente engorrosa y hay que estudiar numerosos cortes para descartar la presencia de endofitos.

TABLA 4:

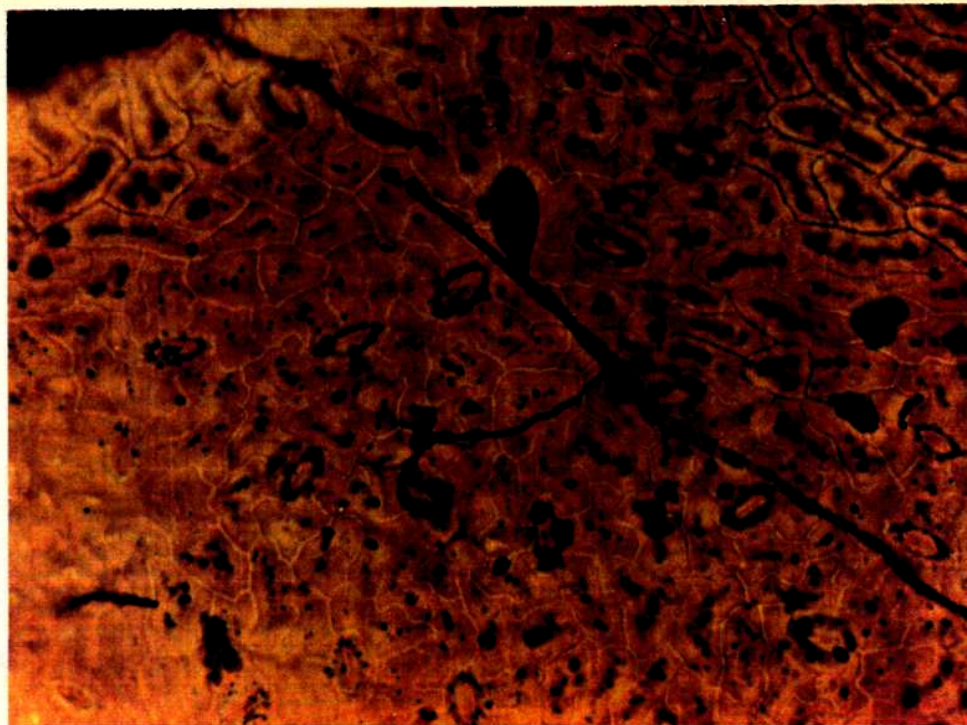
Observación microscópica de la superficie foliar.

No de muestra	Esporas	Tubos germinativos	Micelio
1	-	-	-
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	-	+
5	+	+	+
6	-	-	-
7	+	+	-
8	-	-	+
9	+	+	-
10	+	-	-
11	+	-	+
12	+	+	+
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	+	+	-
17	+	-	+
18	-	-	-
19	+	+	+
20	+	+	+
21	+	-	+
22	+	-	+
23	+	-	-
24	+	-	+
25	-	-	-
26	+	+	-
27	-	-	-
28	+	+	+
29	+	+	-
30	+	-	-
31	-	-	-
32	+	-	-
33	+	-	-
34	+	+	+
35	-	-	-
% muestras +	68,6	37,1	42,9

FIGURA 3:

Aspecto de la superficie foliar de *Melia azedarach* L.

a: aumento 400 X



b: aumento 1000 X



Tinción : azul Tripán en lactofenol.

a: Se observa el desarrollo del micelio a partir de una espora de *Alternaria* sobre la superficie de una hoja de paraíso.

b: Detalle de una espora de *Alternaria*.

1.4- Estudios de la frecuencia de aislamiento de hongos en diferentes épocas del año.

Hasta el momento, no se encontraron registros bibliográficos sobre la frecuencia de aislamiento de endofitos a partir de hojas de *Melia azedarach* L.. Se decidió entonces estudiar si la frecuencia observada durante el primer aislamiento se mantenía o mostraba variaciones dependiendo de las diferentes épocas del año. Cabe señalar que el periodo de recolección de las muestras se encuentra comprendido entre los meses de noviembre y abril, ya que esta planta posee hojas caducas.

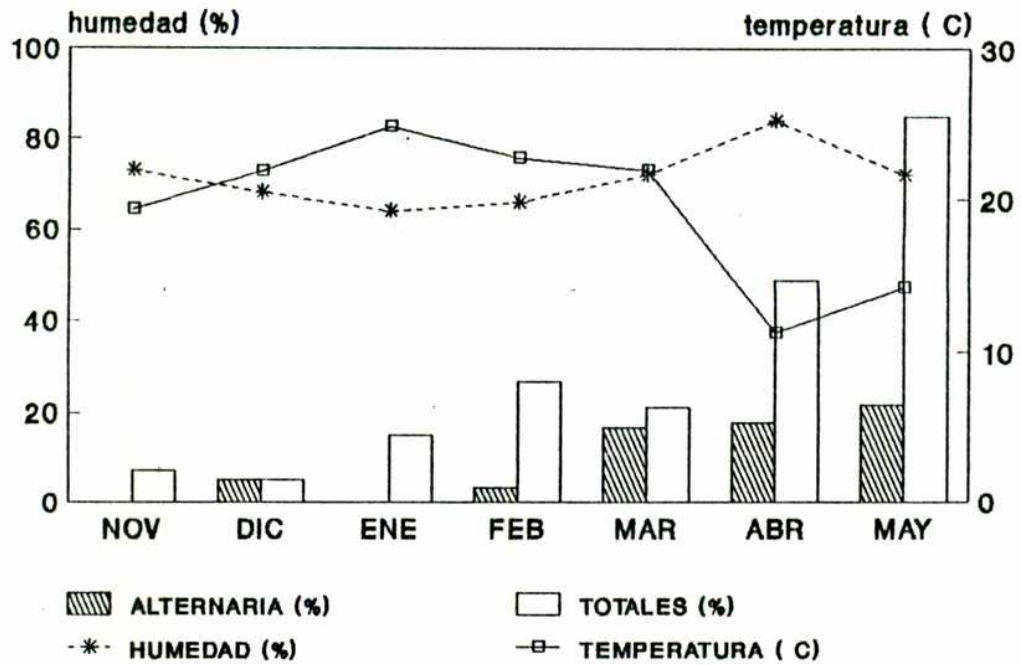
Por otro lado, este estudio permitiría relacionar posteriormente la frecuencia de aislamiento de endofitos, con la actividad antiviral de meliacina presente en las hojas de paraíso.

De este modo se utilizó la técnica de aislamiento de endofitos, por esterilización superficial del material vegetal, para estudiar la frecuencia de aislamiento de hongos, en particular aquellos que pertenecían al género *Alternaria* entre la primavera de 1990 y el otoño de 1991. Se escogieron cinco árboles de paraíso de la zona de Bella Vista (NO de la prov. de Bs. As.) cuyas hojas poseen actividad de meliacina (27), para realizar el muestreo. Todos los aislamientos se llevaron a cabo como se indicó anteriormente en materiales y métodos (sección 7).

En la figura 4 se observa que la frecuencia de aislamiento de hongos totales resultó mayor en el periodo de otoño, con respecto a los meses de primavera y verano. Asimismo los hongos

FIGURA: 4

Aislamiento de hongos de *Melia azedarach* L. en diferentes épocas del año.



Se analizaron entre 60 y 90 muestras de hojas de paraíso en cada mes de muestreo. Los porcentajes se calcularon sobre el total de muestras ensayadas.

identificados como *Alternaria* aparecieron durante los meses de marzo, abril y mayo.

Para completar el estudio se tomaron los registros de temperatura y humedad relativa ambiente promedio de los meses correspondientes al periodo de recolección. Los datos fueron registrados por el Servicio meteorológico nacional mediante el sistema climatológico CICLON.

Se puede observar en la figura 4 que la mayor cantidad de aislamientos correspondió a los meses en los cuales la temperatura ambiente oscila entre los 14 y 22 °C y la humedad relativa ambiente se encuentra por encima del 70 %, mientras que en los meses de verano, con temperaturas más elevadas y menor humedad ambiente, la frecuencia de aislamiento resultó baja.

1.5- Estudio de aislamiento de endofitos a partir de hojas de diferentes edades.

Se pudo observar que el aislamiento de algunos endofitos está relacionado con el estado fisiológico de la planta hospedante. Se conoce el caso de las micorrizas, que invaden a la planta a través de las raíces de la planta joven, mientras que las raíces de plantas adultas resultan menos susceptibles a la invasión (18). Por otro lado los estudios realizados en la planta *Eucalyptus viminalis* indican que las hojas senescentes son colonizadas internamente por *Alternaria alternata*, mientras que las jóvenes no lo son (13).

Se comparó la frecuencia de aislamiento de endofitos, y en particular la aparición de hongos del género *Alternaria*, en hojas de paraíso de diferentes edades. El muestreo se realizó entre los meses de febrero y mayo de 1991, ya que en esta época del

año, de acuerdo con los resultados de la figura 3, se consiguió la mayor frecuencia de aislamiento de hongos a partir de hojas de la planta.

Con este objeto se tomaron 30 muestras de hojas de cada edad a partir de los mismos árboles utilizados en el ensayo anterior. Las hojas se clasificaron en: jóvenes (de color verde claro y tamaño menor a 2 cm.), maduras (entre 2 y 4 cm. y color verde oscuro) y senescentes (de color amarillo y que se desprenden de la planta con facilidad).

Al igual que en el experimento anterior, y como se observa en la figura 5, la frecuencia de aislamiento de hongos totales aumentó en el periodo de otoño. El número de aislamientos obtenidos entre las hojas de diferentes edades no mostro variaciones significativas para cada mes de muestreo. Cabe señalar que la mayoría de los hongos aislados durante el mes de marzo correspondieron al género *Alternaria*, que apareció con una frecuencia que se mantuvo en los siguientes meses.

Estos datos confirman los resultados obtenidos durante el primer aislamiento, en el cual la mayoría de los hongos aislados entre marzo y abril de 1989 pertenecieron a dicho género.

1.6- Actividad antiviral comparativa en extractos de hongos aislados de paraíso.

En vista de la aparente asociación de *Alternaria* con la actividad antiviral, se buscó extender el análisis a otros aislamientos de este hongo, obtenidos en el transcurso de diferentes aislamientos a partir de hojas de paraíso recolectadas en el periodo marzo-abril de 1989.

Para ello, se prepararon extractos crudos de micelio de once

cepas que fueron identificadas como *Alternaria*: M2002, M2003, M2009, M2010, M2012, M2016, M2022, M2025, M2029, M2031 y M2035.

En este ensayo las células se infectaron con VSV, y luego de la adsorción del virus se cubrieron con medio de cultivo conteniendo diluciones de cada extracto, con el fin de determinar la DE50 en forma comparativa, como se indicó en el punto 12.1 de materiales y métodos.

A las 24 hs. p.i., se observó el efecto citopático producido por el virus en los cultivos tratados e infectados, y se comparó con un control de virus que fue tratado con MEM únicamente.

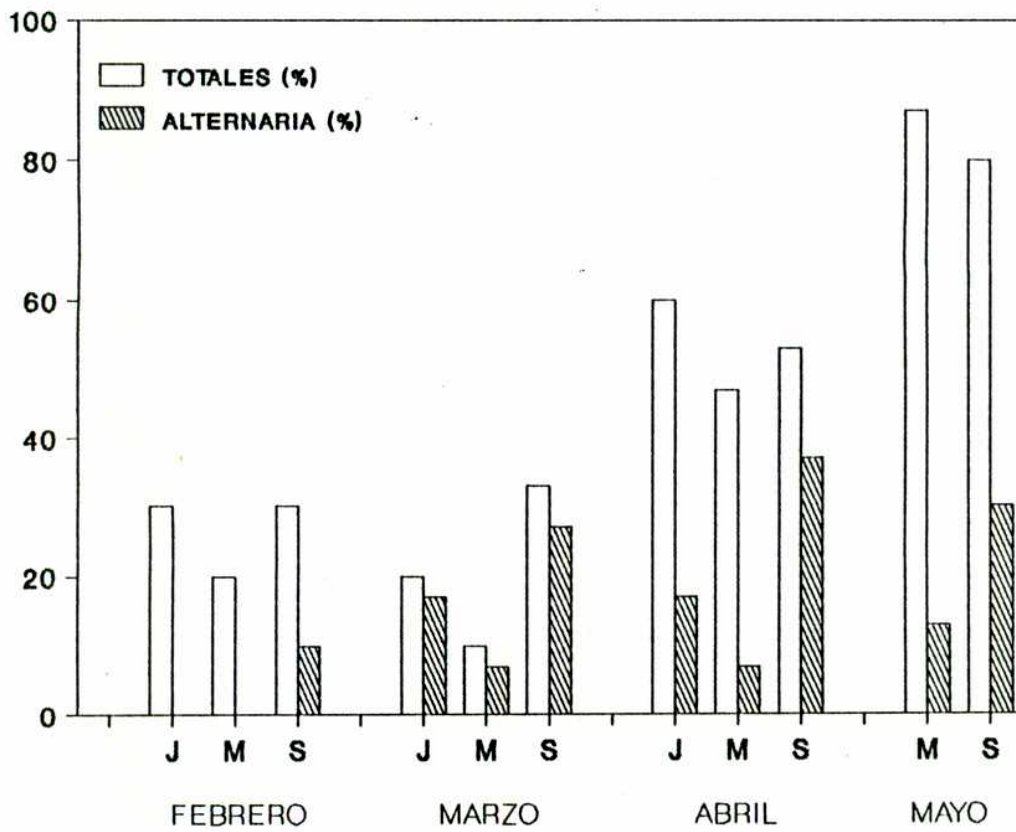
Los resultados de la tabla 5, muestran que hay una variación en el nivel de producción del antiviral. Se encontraron cepas altamente productoras como M2002, M2003, M2031 y M2035. En cambio otras como M2009, M2010 y M2012 mostraron niveles de producción menores, en comparación con las anteriores. También se encontraron cepas no productoras entre los aislamientos testeados.

Se consideraron altamente productoras aquellas cuya CA resultó menor de 0,05 mg/ml, mientras que las medianas y no productoras mostraron una CA entre 0,05 y 0,1 mg/ml y mayor de 0,1 mg/ml respectivamente.

Estos resultados muestran que no todas las cepas de *Alternaria* aisladas de *Melia azedarach* L. muestran el mismo comportamiento en cuanto a la producción del antiviral. Los siguientes experimentos se realizaron con extractos de la cepa M2003, que resultó la mayor productora de esta actividad.

FIGURA 5:

Aislamiento de endofitos a partir de hojas de diferentes edades.



J: hojas jóvenes.
M: hojas maduras.
S: hojas senescentes.

TABLA 5:

Actividad antiviral comparativa de diferentes cepas de *Alternaria* aisladas de paraíso.

AI SLAN IEN TO	DE50/ml	PESO SECO mg/ml	CA* mg/ml	PRODUCCION
M2002	200	8	0,04	a
M2003	580	5,9	0,01	a
M2009	170	11	0,07	m
M2010	70	4,3	0,06	m
M2012	83,2	8,5	0,1	m
M2016	70	57,5	0,62	n
M2022	22	13	0,59	n
M2025	32	9,3	0,29	n
M2029	32	12	0,38	n
M2031	340	5,8	0,02	a
M2035	120	5,5	0,05	a

*CA: concentración antiviral en peso seco de extracto que corresponde a la DE50.

a: cepas altamente productoras CA: < 0,06 mg/ml.

m: cepas medianamente productoras CA: 0,06-0,1 mg/ml.

n: cepas no productoras CA: >0,1 mg/ml

PARTE II

2- CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE LA CEPA M2003.

2.1- Clasificación morfológica de M2003.

El aislamiento denominado M2003, fue identificado como *Alternaria alternata*, por los Doctores Daniel Cabral y María Delia Bertoni, de la Cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

El aspecto del micelio y las esporas de esta cepa, se encuentran ilustrados en la figura 6.

Se puede observar la tabicación de las hifas, y la presencia de esporas septadas en forma longitudinal y transversal (phaeodyctiosporas), características del género *Alternaria*, que se utilizó en este trabajo como criterio de identificación por microscopía óptica de los aislamientos pertenecientes a dicho género.

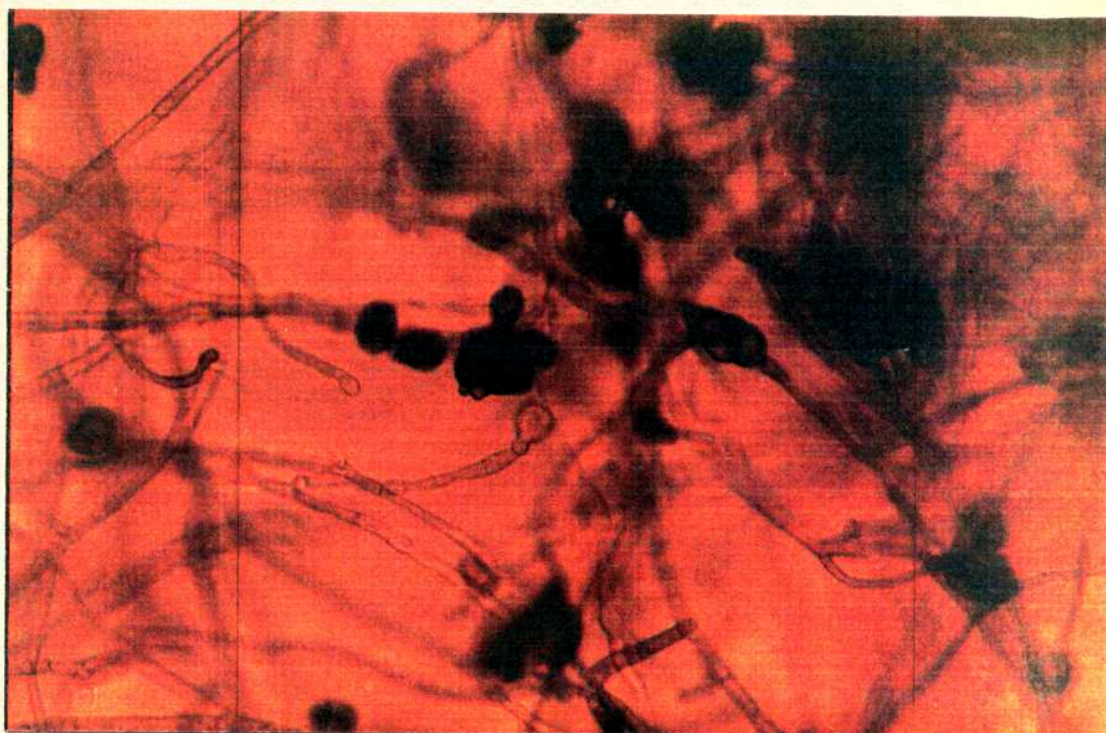
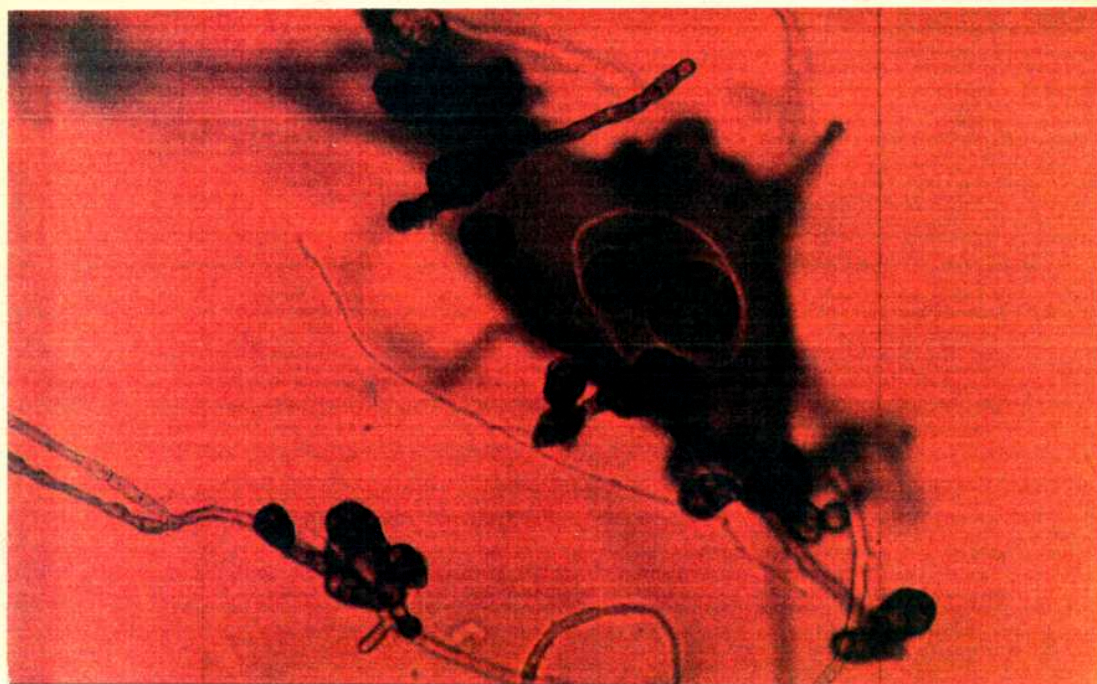
2.2- Crecimiento de M2003 en medio sólido.

Se estudió el crecimiento de la cepa M2003 en el medio químicamente definido de Czapek-Dox de modo de posibilitar la posterior purificación del antiviral a partir de extractos crudos de micelio, contando con la menor cantidad posible de sustancias aportadas a dicho extracto por el medio de cultivo.

El crecimiento se comparó con el que presenta el hongo en agar-extracto de malta (medio empleado tradicionalmente). Para ello se prepararon placas de Petri conteniendo ambos medios, y se sembraron por triplicado, 50 ul de una suspensión que contenía

FIGURA 6:

Aspecto del micelio y conidios de *Alternaria alternata*
(cepa M2003).



Aumento 400 X.

4500 esporas en el centro de cada placa.

Los cultivos se incubaron durante 11 días a 25 °C en oscuridad. Durante los días posteriores a la siembra, se determinó el diámetro de las colonias crecidas en ambos medios así como también la producción de esporas.

Los resultados de la figura 7 indican que no hubo diferencias en la cinética de crecimiento y en la esporulación de M2003 en ambos medios.

Tampoco se observaron diferencias morfológicas en la estructura del micelio y las esporas por microscopía óptica. En cambio la pigmentación varía según el medio empleado: amarillo-verdoso en el centro y gris hacia los bordes en agar Czapek-Dox y gris oscuro en el centro, aclarándose hacia los bordes en agar-malta.

2.3- Actividad antiviral y citotóxica de los extractos de M2003 crecido en agar-malta y Czapek-Dox.

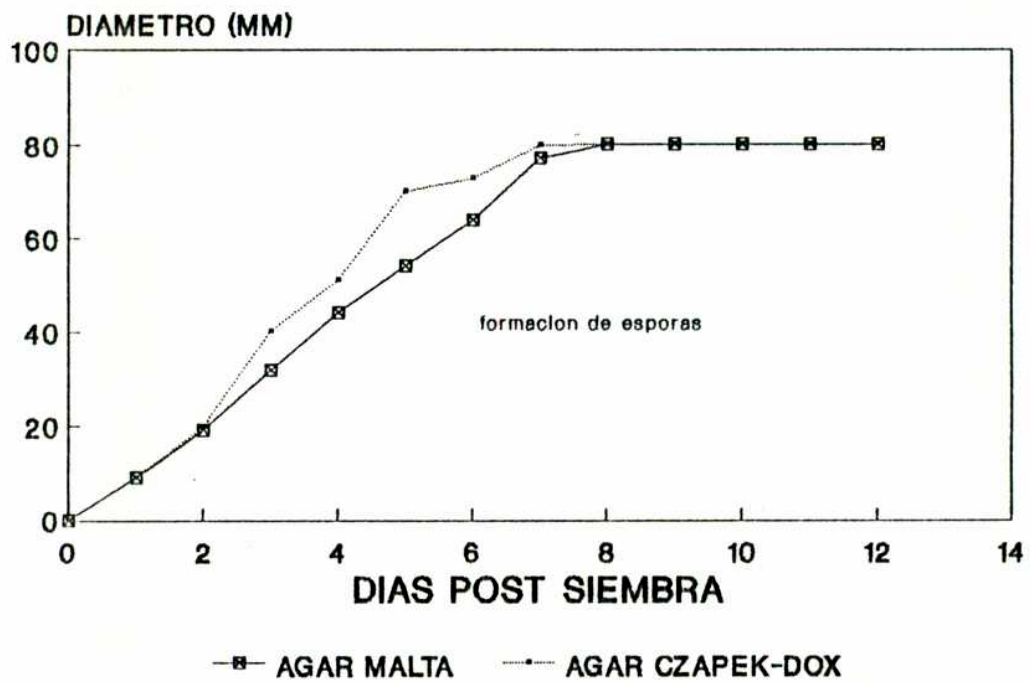
Dado que el desarrollo del hongo en ambos medios de cultivo no presentó diferencias, se determinó comparativamente la actividad antiviral y citotóxica de M2003 crecida en agar-extracto de malta y agar de Czapek-Dox.

Utilizaron cultivos crecidos durante 12 días para la obtención de extractos crudos de micelio.

Honocapas de células Vero, que fueron previamente infectadas con 1000 UFP de VSV o no infectadas, se trataron por triplicado con medio MEM conteniendo diluciones seriadas al medio de cada extracto y se incubaron durante 24 hs a 37 °C. Una vez transcurrido el periodo de incubación los cultivos se observaron al microscopio, y por un lado se leyó el efecto citopático

FIGURA 7:

Crecimiento de M2003 en agar malta y agar Czapek-Dox.



El día 7 se observa formación de esporas en ambos medios.

producido por el virus que se comparó con un control infectado que fue tratado con MEM únicamente. Por otro lado los cultivos no infectados, tratados con ambos extractos, se examinaron al microscopio, y se compararon con el correspondiente control de células que se trató durante todo el experimento con medio de cultivo.

La DE50 y la DC50 se determinaron por el método de Reed y Muench, y se calculó la concentración antiviral y citotóxica para cada extracto, según la metodología indicada en los puntos 12 y 13 de materiales y métodos.

Como se muestra en la tabla 6, la actividad antiviral de los extractos del hongo cultivado en agar Czapek-Dox se incrementó 1,3 veces, mientras que la toxicidad disminuyó a la mitad con respecto a los extractos procedentes de agar-malta.

TABLA: 6

Actividad antiviral y citotóxica de M2003 crecida en agar-malta y agar Czapek-Dox.

Actividad	Agar - malta	Agar Czapek-Dox
Antiviral		
DE50/gr #	17383,8	31815,1
CA gr/ml *	$5,8 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-5}$
Citotóxica		
DC50/gr #	5127,3	3823,1
CC gr/ml *	$1,9 \times 10^{-1}$	$2,8 \times 10^{-1}$
DE50/DC50	3,1	9,7

DE50 y DC50/gr de peso seco del extracto determinada por el método de Reed y Muench.
* CA: concentración antiviral.

CC: concentración citotóxica. Concentración en peso seco de extracto que corresponde a la DE50.

Según estos datos, no solo pueden utilizarse ambos medios

para la obtención del compuesto antiviral, sino que el cultivo en agar Czapek-Dox favorece su producción con baja toxicidad.

2.4- Crecimiento de M2003 en medio líquido.

El medio de cultivo de los microorganismos debe contener todos los elementos requeridos para la producción de biomasa y los metabolitos que se desean estudiar. El medio de Czapek-Dox, contiene todos los requerimientos necesarios para el desarrollo de *Alternaria*, y además es utilizado en forma corriente para los estudios de producción de toxinas de este hongo (42)

Como se observó en los resultados de la tabla 6, el hongo fue capaz de producir el antiviral en el medio sólido de Czapek-Dox. De este modo se utilizó dicho medio de cultivo (sin el agregado de agar) para estudiar el crecimiento de M2003 y determinar si el antiviral es exportado al medio extracelular, facilitando así su obtención y purificación por extracción directa a partir del medio líquido.

Se inocularon recipientes de vidrio de 100 ml conteniendo 20 ml de medio Czapek-Dox, con una suspensión de esporas de M2003 en una concentración final de 230 esporas/ml de medio. Los cultivos se incubaron a 25 °C en oscuridad con agitación a 150 rpm.

Con el objeto de determinar la curva de crecimiento de M2003 en medio líquido, se tomaron cuatro muestras por punto a los diferentes días luego de la siembra, y se determinó biomasa, actividad antiviral (presente en el micelio y exportada al medio líquido), consumo de glucosa y pH del medio de cultivo.

Cabe señalar que a fin de medir la actividad antiviral en forma más específica, se realizó una extracción con acetato de etilo a partir de este medio, ya que dicha actividad mostró una alta afinidad por dicho solvente (46).

Se encontró que el hongo es capaz de exportar el antiviral al medio de cultivo extracelular a partir del día 3. Como se observa en la figura 8.a, la producción y liberación de este compuesto, comienza en la fase de crecimiento exponencial, una vez que la cepa se adapta a las condiciones de cultivo. De este modo, se puede describir como una producción asociada directamente al crecimiento del micelio (25).

A partir del día 9, el cultivo entra en la fase estacionaria del crecimiento. No fue posible determinar la actividad exportada durante este período, ya que a partir del día 11, se observó una elevada toxicidad de los extractos. Es importante destacar que el aumento de la actividad antiviral detectada en medio líquido acompaña el crecimiento del micelio entre los días 3 y 9 post-siembra, en tanto que la actividad obtenida a partir del micelio permanece relativamente constante en el mismo período, alcanzando valores de inhibición de la multiplicación viral menores que los correspondientes al caso anterior (aproximadamente 50%).

La medida de consumo de glucosa muestra que en este caso el sustrato fermentable del medio Czapek-Dox, no fue un factor limitante del crecimiento del hongo (figura 8.b).

También se pudo determinar que la producción óptima del compuesto activo se llevó a cabo cuando el pH del medio aumentó de 5,5 (día 0) a 7,5 (días 7-8).

2.5- Actividad de M2003 contra DNA y RNA virus.

Hasta el momento en los ensayos realizados se utilizó VSV como virus de referencia para determinar la actividad antiviral de los extractos crudos de *Alternaria*.

Se resolvió ensayar si el extracto de micelio de M2003

FIGURA 8 a:

Crecimiento de M2003 en medio líquido.

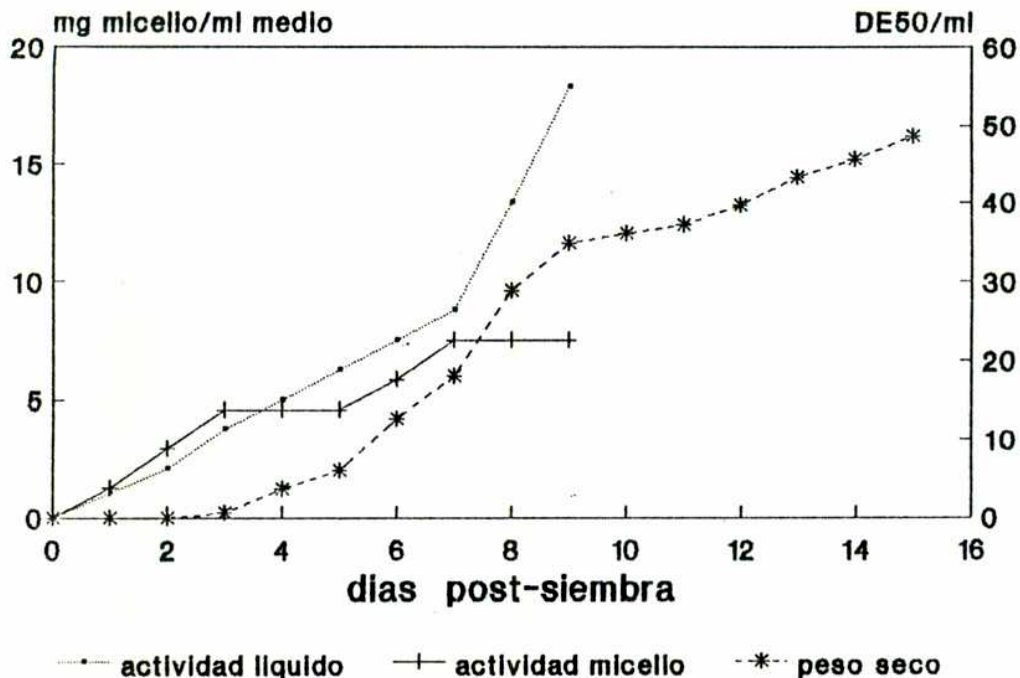
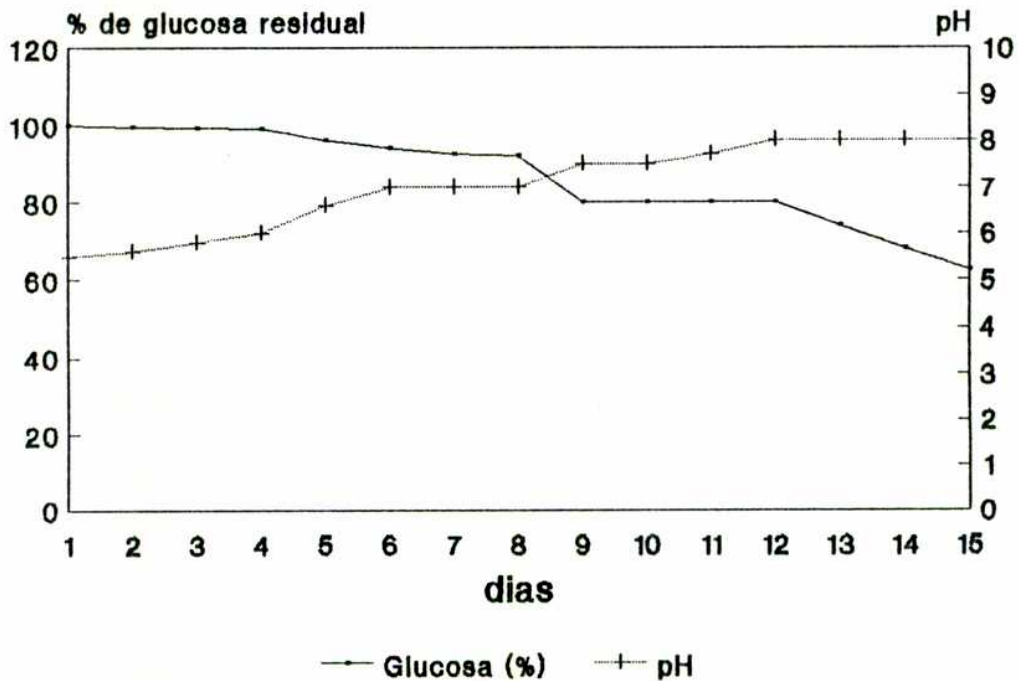


FIGURA 8 b:

Consumo de glucosa y pH del medio de cultivo durante el crecimiento de M2003.



tenía la capacidad de inhibir la replicación de otros virus diferentes del VSV.

Para ello se eligieron los DNA virus PrV y HSV-1, cuyos mecanismos de replicación involucran procesos totalmente diferentes.

En este ensayo se infectaron monocapas de células Vero con una multiplicidad de 1 UFP/celula de cada especie de virus. Luego de la hora de adsorción, las monocapas se cubrieron con diferentes concentraciones del extracto crudo de M2003 y a las 24 horas post-infección se cosecharon por separado los rendimientos de cada experimento, los cuales se titularon por plaqueo.

Paralelamente se realizaron controles de cada uno de los virus utilizados, tratados durante todo el experimento con medio de cultivo únicamente, que fueron titulados utilizando el mismo procedimiento citado para los cultivos tratados.

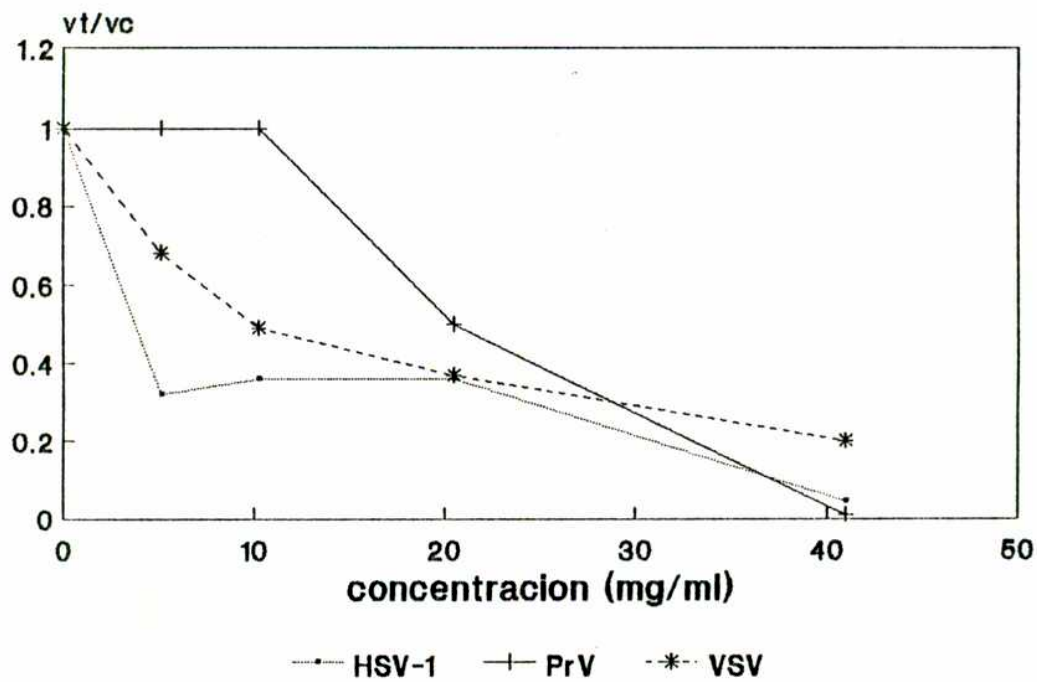
Se determinó la relación entre el título de virus tratado y el control correspondiente para cada concentración dada de extracto.

Los resultados de la figura 9 muestran que existe una inhibición de las tres especies de virus, en forma dependiente de la concentración de extracto.

Estos resultados indican que la cepa M2003 de *Alternaria alternata* es capaz de inhibir tanto la replicación de virus DNA como RNA.

FIGURA: 9

Inhibición de distintos virus por post-tratamiento con extracto crudo de M2003.



vt: titulo del virus tratado con el extracto.
vc: titulo del virus control.

2.6- Otras propiedades de M2003:

2.6.1- Comportamiento de M2003 frente a diferentes géneros de bacterias.

Se decidió estudiar si esta cepa de *Alternaria alternata* presentaba actividad contra otros microorganismos diferentes de virus.

Como se citó en la sección introductoria de esta tesis, numerosos trabajos describen la actividad antagónica de los endofitos frente a diferentes organismos patógenos y saprófitos, que colonizan y eventualmente pueden producir daños en la planta hospedadora (18), (30), (32), (33).

En primer lugar se intentó determinar si *Alternaria* era capaz de inhibir el crecimiento de diferentes géneros de bacterias, ya que esta actividad resultaría beneficiosa para la planta hospedadora a partir de la cual fue aislado como endofito.

Por un lado se realizó un repique sobre agar malta, de M2003 en el centro de una placa de Petri. Luego del desarrollo de la colonia se realizaron sendas estrias de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus subtilis*.

Después de 24 horas de incubación a 32 °C se observó el crecimiento de cada bacteria, el cual se comparó con un control estriado sobre agar-malta en ausencia del hongo.

Fue posible observar una leve inhibición del crecimiento de *S. aureus*, puesto que la densidad de la estria en presencia del hongo resultó menor que la del control correspondiente, mientras que las otras bacterias ensayadas no mostraron diferencias.

El otro tipo de ensayo consistió en testear la actividad

antibiótica del medio líquido de crecimiento de M2003 por difusión en agar.

Se sembró un césped de cada bacteria en placas de Petri con agar Mueller-Hinton. Luego se colocaron 100 μ l de distintas diluciones del medio de cultivo del hongo en pocillos ubicados en forma simétrica alrededor de la placa, y se incubaron durante 24 horas a 32 °C

No se observó halo de inhibición alrededor de los pocillos en ninguno de los casos.

Este resultado muestra que no se detectó actividad antibiótica frente a las cepas ensayadas en el medio de cultivo de M2003.

2.6.2- Antagonismo de M2003 frente a diferentes hongos aislados de paraíso.

Otra de las características que presentan los endofitos es la de antagonizar el crecimiento de otras especies de hongos capaces de colonizar el mismo hospedante (30).

Con este fin se cultivaron otros hongos diferentes de *Alternaria* en presencia de M2003.

Los repiques se realizaron en placas de Petri con agar-malta. Cada hongo se sembró en una mitad de dicha placa en forma opuesta a M2003, para permitir el crecimiento de ambos, y así observar el fenómeno de antagonismo.

Los cultivos se incubaron durante 14 días en oscuridad a temperatura ambiente.

El crecimiento se midió a lo largo de la línea que une los centros de ambas colonias y el antagonismo fue evaluado por el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR).

El ICR (30) se definió como: $r_1 - r_2 / r_1 \times 100$, donde

r1: radio de la colonia en dirección opuesta al hongo antagonista.

r2: radio de la colonia directamente enfrentada al hongo antagonista.

La figura 10 ilustra el efecto observado, cuando los diferentes hongos crecieron en presencia de M2003.

Se obtuvieron distintos patrones de interacción que se pueden describir como:

-Inhibición mutua del crecimiento: ambos hongos resultaron inhibidos en la misma proporción. Las colonias crecen hasta el punto de contacto, en el cual forman una línea recta con intercambio de ambos micelios. No se puede definir a uno de los hongos como antagonista del crecimiento del otro. Ejemplo: F (detallado en la figura 11.a).

-Crecimiento de una colonia rodeando a la otra, con contacto entre las hifas. (Detallado en la figura 11.b).

A pesar de que el ICR es muy semejante para los dos hongos, uno de ellos desarrolla el micelio alrededor de la colonia antagonista. Ejemplos: A,B,C,D,E,G,H.

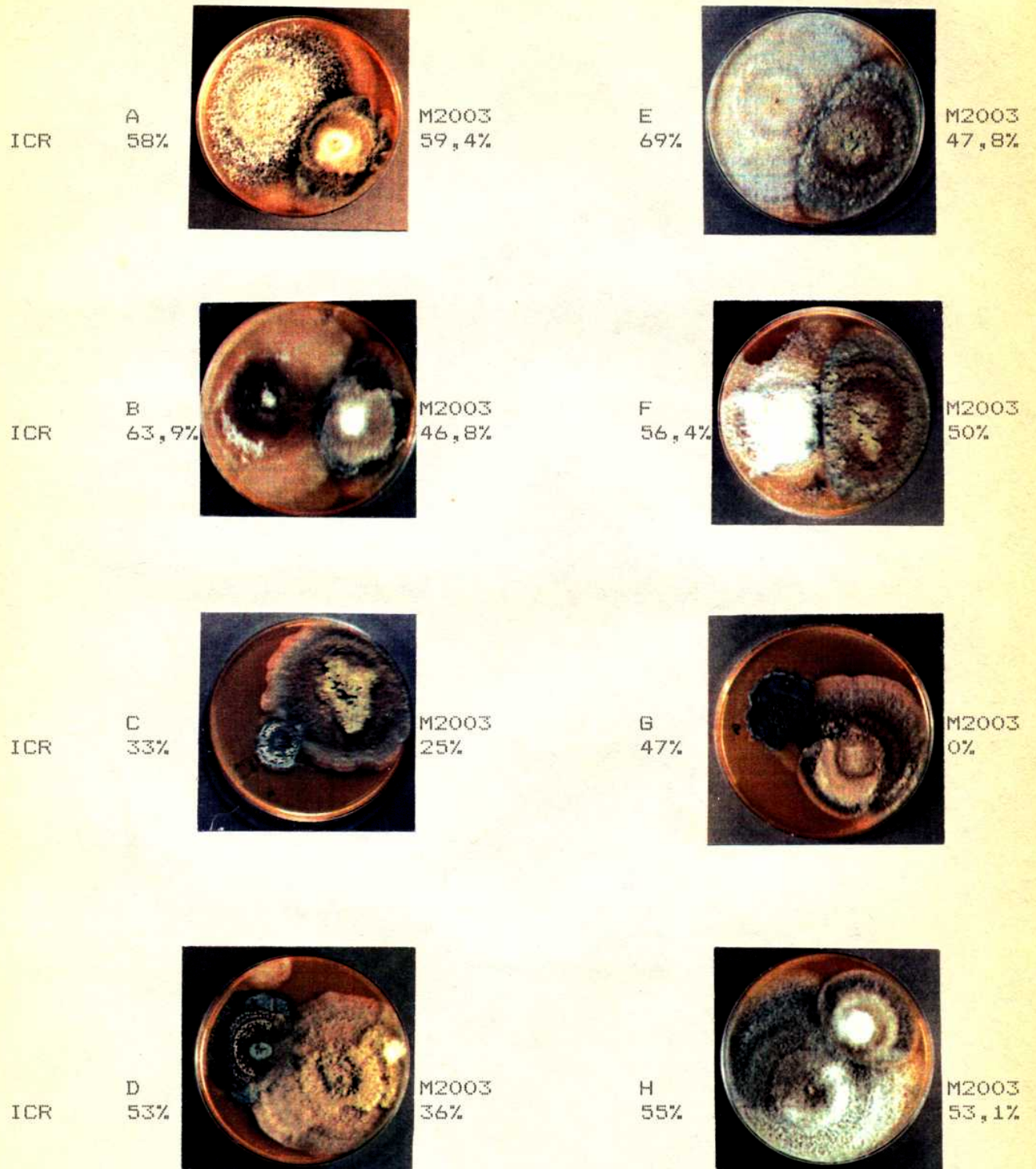
Los aislamientos C, D y G, son tres cepas del hongo MUG (Micelio marrón y esporas unicelulares con gútula), que no ha sido aun identificado. En los tres casos, se observa una inhibición del crecimiento del hongo antes de llegar al punto de contacto con M2003 (Figura 10: C, D y G), en los cuales el micelio tiende a desarrollarse hacia el lado opuesto al crecimiento de *Alternaria*. (Detallado en la figura 11.c).

El caso más claro de antagonismo se observó entre M2003 y el aislamiento G, en el cual el cálculo del ICR indica que no hubo inhibición del crecimiento de M2003, mientras que el de G, disminuyó casi a la mitad.

Para determinar si la actividad antagonista era el resultado

FIGURA: 10

Antagonismo de M2003 frente a distintos aislamientos de endofitos de paraíso.



La colonia de M2003 se encuentra ubicada a la derecha de la foto.

FIGURA: 11

Detalle de diferentes tipos de antagonismo.

Foto 11.a: Crecimiento de M2003 frente al aislamiento F.

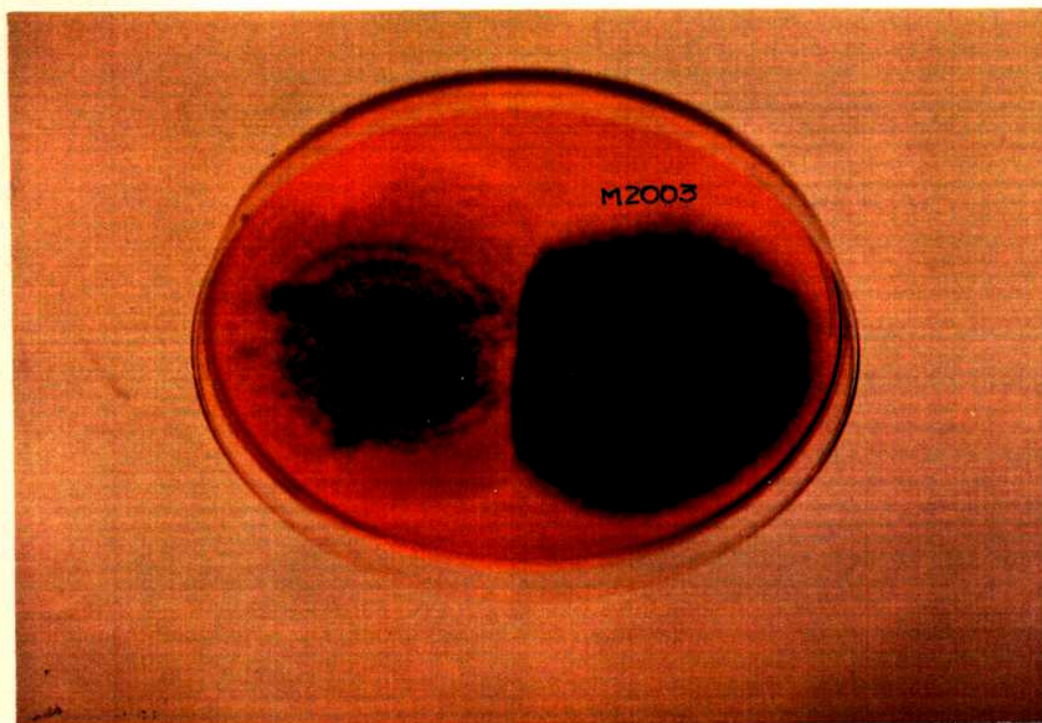


Foto 11.b: Crecimiento de M2003 frente al aislamiento H.



Foto 11.c: Crecimiento de M2003 frente al aislamiento D (MUG).



de la producción de algún metabolito exportable, se realizaron repiques de los distintos hongos a un medio agar Czapek-Dox, que contenía una dilución 1/10 de un filtrado medio líquido de crecimiento de M2003.

El diámetro de la colonia del hongo MUG resultó inhibido en un 20% a 30% (aislamientos C y D respectivamente) en presencia del filtrado, con respecto a los controles de ambos aislamientos crecidos en ausencia del medio de cultivo de M2003.

PARTE III

3- COMPARACION DE LAS PROPIEDADES DEL ANTIVIRAL QUE PRODUCE M2003 Y MELIACINA.

3.1- Obtención de meliacina.

Hasta el momento los estudios realizados indicaron que los extractos de hojas maduras de *Melia azedarach* L. poseen actividad antiviral. Esta actividad se encontró en plantas procedentes de diferentes lugares de la provincia de Buenos Aires, y a partir de hojas recogidas en distintas épocas del año. Sin embargo no se conocía si esta actividad era obtenida únicamente a partir de hojas desarrolladas, o podía obtenerse a partir de tejidos vegetales en diferentes etapas del desarrollo.

El interés de esta observación surge de los datos que indican que el proceso de colonización de las plantas por diferentes especies fúngicas, así como los metabolitos producidos en respuesta a esta interacción, se encuentra relacionado en muchos casos con el estadio del desarrollo del huésped.

Debido a la dificultad de aislar tejido indiferenciado a partir de la planta para realizar los ensayos de actividad antiviral, se utilizaron cultivos in vitro de paraíso en diferentes etapas de desarrollo.

En primer lugar se ensayó la actividad de los extractos de brotes y callos cultivados in-vitro, como se indicó previamente en la sección 10.1 de materiales y métodos. Esta actividad se comparó con la que se obtiene a partir de los extractos crudos de hojas de la planta.

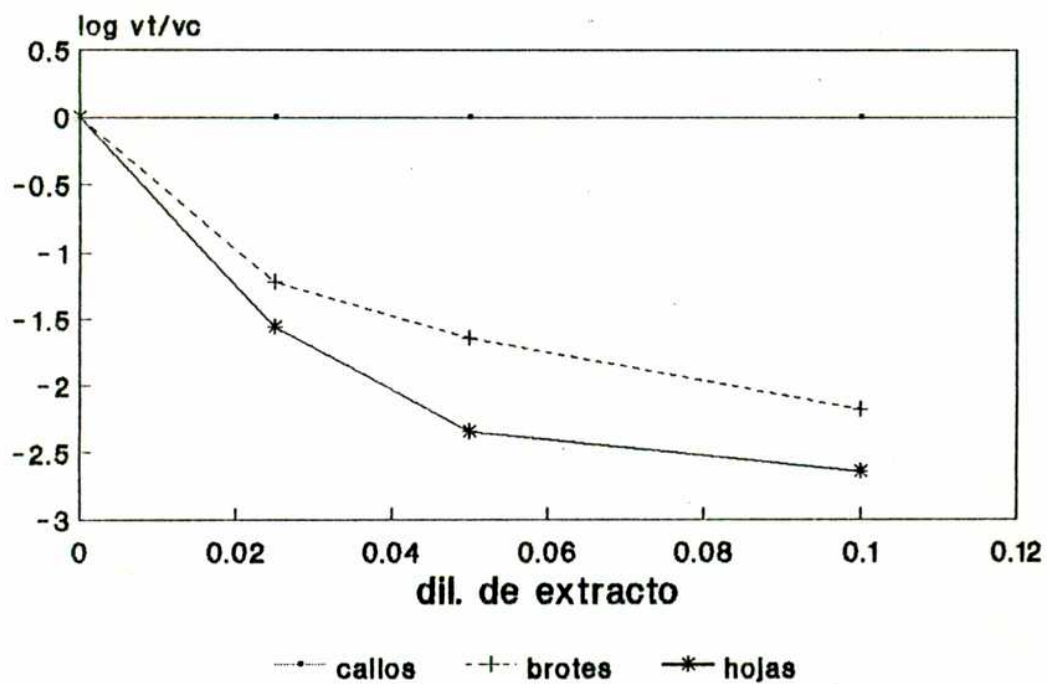
Se pretrataron monocapas de células Vero durante 2 horas a 37 °C con diferentes diluciones de cada extracto. Se descartó el medio de cultivo y se realizó la infección con una multiplicidad de 1 UFP/célula de VSV. A las 24 hs p.i., se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos tratados e infectados y se determinó el rendimiento viral por plaqueo. Paralelamente se realizó un control de VSV sin tratar, que fue titulado de la misma manera.

Los resultados de la figura 12 muestran que tanto el extracto de brotes cultivados in-vitro, como el de hojas maduras, disminuyeron la replicación del virus en forma dependiente de la concentración. En cambio el extracto de callos no presentó actividad antiviral contra VSV.

Dado que los callos cultivados in-vitro carecen de pigmentación, a diferencia de las hojas y los brotes cultivados, se consideró la posibilidad de que la producción de meliacina estuviera relacionada con el proceso de la fotosíntesis.

FIGURA 12:

Actividad antiviral comparativa de los extractos obtenidos de hojas verdes y de material cultivado in-vitro.



vt: titulo del virus tratado.
vc: titulo del virus control

3.2- Ensayos de actividad antiviral en plantas de paraíso crecidas en presencia de luz o en oscuridad.

Con el objeto de obtener material vegetal en el mismo estadio del desarrollo pero con diferencias en su pigmentación, se hicieron germinar semillas de *Melia azedarach* L. en presencia de luz o en oscuridad. (Las plantas crecidas en ausencia de luz, carecieron de pigmentación).

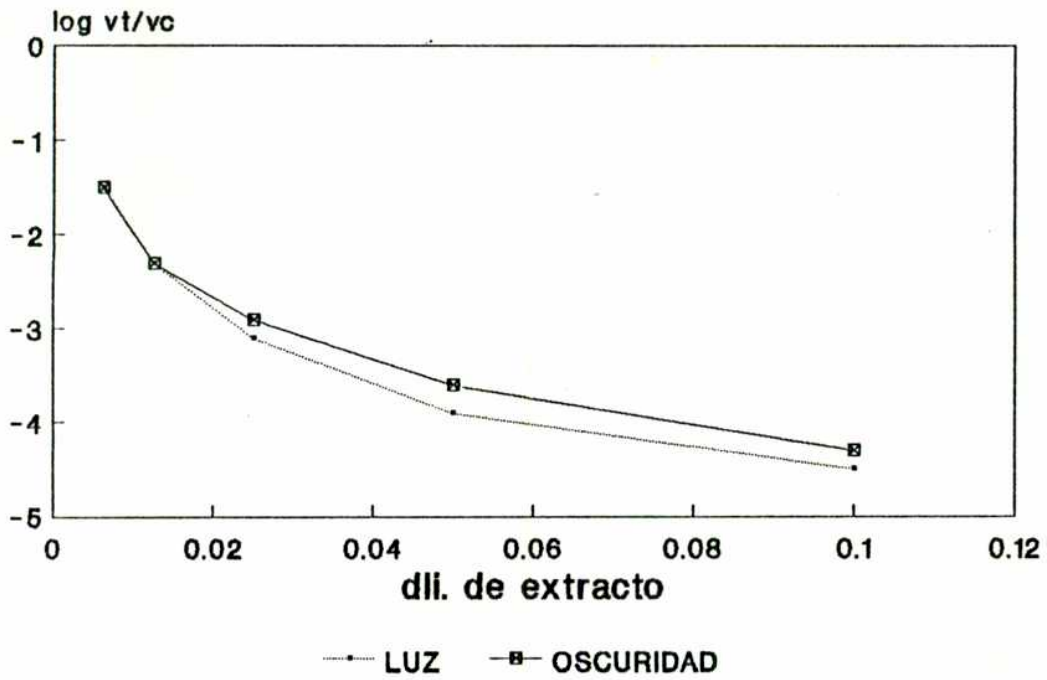
Luego de 20 días de germinadas las plántulas, se realizaron los extractos crudos y se comparó la actividad de ambos materiales por pretratamiento de células Vero contra la infección con VSV. Los sobrenadantes de los cultivos tratados e infectados, se cosecharon a las 24 horas p.i., se titularon por plaqueo, y se determinó el rendimiento con respecto a un control de VSV tratado con MEM únicamente durante todo el ensayo.

Los resultados de la figura 13 muestran que los extractos de plantas crecidas tanto en presencia de luz como en la oscuridad, muestran la misma cinética de inhibición de la replicación de VSV en forma dependiente de la concentración de extracto.

Estos resultados demuestran que la producción de meliacina en la planta de paraíso, no estaría relacionada con la capacidad fotosintética de la misma. En cambio podría depender de algún proceso relacionado con el estadio de desarrollo de los tejidos, que no se lleva a cabo en los tejidos indiferenciados.

FIGURA 13:

Actividad antiviral de los extractos de plantas crecidas en presencia y ausencia de luz blanca.



vt: título del virus tratado.
vc: título del virus control

3.3- Actividad antiviral comparativa en material vegetal de diferentes orígenes.

Por un lado se pudo demostrar la capacidad de *Alternaria alternata* de producir un antiviral que es exportado al medio extracelular.

Se podría plantear entonces la posibilidad de que una vez alojado el hongo en el interior de la planta, produjera el antiviral el cual sería translocado a los diferentes tejidos del huésped.

Por otra parte los resultados de los ensayos anteriores indican que las hojas y brotes diferenciados de la planta, poseen actividad antiviral mientras que los callos indiferenciados noL.

En algunos casos el desarrollo de los endofitos se encuentra favorecido en los tejidos jóvenes de la planta, mientras que en otros casos la colonización ocurre en los tejidos ya diferenciados.

Con el objeto de completar y ampliar los resultados obtenidos en el punto 3.1 , se determinó comparativamente la actividad de los cultivos in-vitro de células en suspensión, callos y brotes de paraíso, así como también de hojas y yemas laterales de la planta. Paralelamente se realizó el aislamiento de endofitos a partir de cada uno de los materiales ensayados. Cabe señalar que para el caso de los materiales cultivados in-vitro no se realizó la esterilización superficial, ya que estos cultivos se obtuvieron en condiciones de esterilidad.

TABLA 7:

Actividad antiviral comparativa de meliacina en hojas de endofitos y material cultivado in vitro.

MATERIAL	CONCENTRACION ^a (gr/ml)	ACTIVIDAD DE50/ml	A. ESPECIFICA DE50/gr	ENDOFITOS
brotes	0,17	27	158,8	-
brotes	0,33	40	121,2	-
brotes	1	51,6	51,6	-
brotes	0,25	25	100	-
callos	0,17	< 10		-
callos	1	< 10		-
callos	1	< 10		-
células ^b	ND	10		
sobrenadante	ND	10		
células	ND	10		
sobrenadante	ND	10		
células	ND	10		-
sobrenadante	ND	10		
hojas verdes	0,5	56	112	+
hojas verdes	0,055	8,6	156,4	+
yemas laterales	0,105	14	133,3	NH
yemas laterales	0,115	28,2	245,2	NH

a- Peso fresco de material por unidad de volumen de extracto.

b- Se utilizaron 2 volúmenes de buffer por volumen de células. El sobrenadante se ensayó tal cual.

ND: No determinado.

NH: No hecho.

Para el ensayo comparativo de actividad antiviral, las monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 96 pocillos, se pretrataron por triplicado durante 2 horas, con diferentes diluciones de cada extracto o con MEM únicamente como control.

Luego del pretratamiento los cultivos se infectaron con 1000 UFP de VSV y después de la hora de adsorción se cubrieron con MEM

2%. A las 24 horas p.i., se observó el efecto citopático producido por el virus en los cultivos tratados e infectados y se comparó con el control de virus.

Como se observa en la tabla 7, sólo los brotes poseen una actividad comparable a la de los extractos de hojas. Nuevamente los extractos de callos y células cultivadas en suspensión no presentaron actividad, así como tampoco los sobrenadantes de cultivo de estas últimas.

A pesar de que las yemas que poseen un tejido indiferenciado comparable al de los callos, tienen una actividad comparable a la de las hojas, no se puede descartar la posible influencia del estadio de desarrollo celular sobre la producción de meliacina.

Existen evidencias previas de aislamiento de la actividad antiviral a partir de raíces del árbol de paraíso (85). De este modo, el antiviral podría producirse en los tejidos desarrollados y translocarse posteriormente al resto de la planta.

3.4- Estacionalidad de la actividad de meliacina.

En los resultados expuestos anteriormente en el punto 1.4 se observó un aumento en la frecuencia de aislamiento de endofitos en la época de otoño.

Con el objeto de estudiar si la actividad de meliacina aislada a partir de las hojas de paraíso estaba relacionada con la frecuencia de aparición de hongos, se realizaron en paralelo a los aislamientos de endofitos, los extractos crudos de los mismos materiales vegetales.

Se midió la actividad antiviral de cada extracto por pretratamiento de células Vero durante 2 horas a 37 °C antes de la infección con el virus. Al cabo de dicho tiempo, los cultivos se inocularon con 1000 UFP de VSV, y luego de la adsorción se

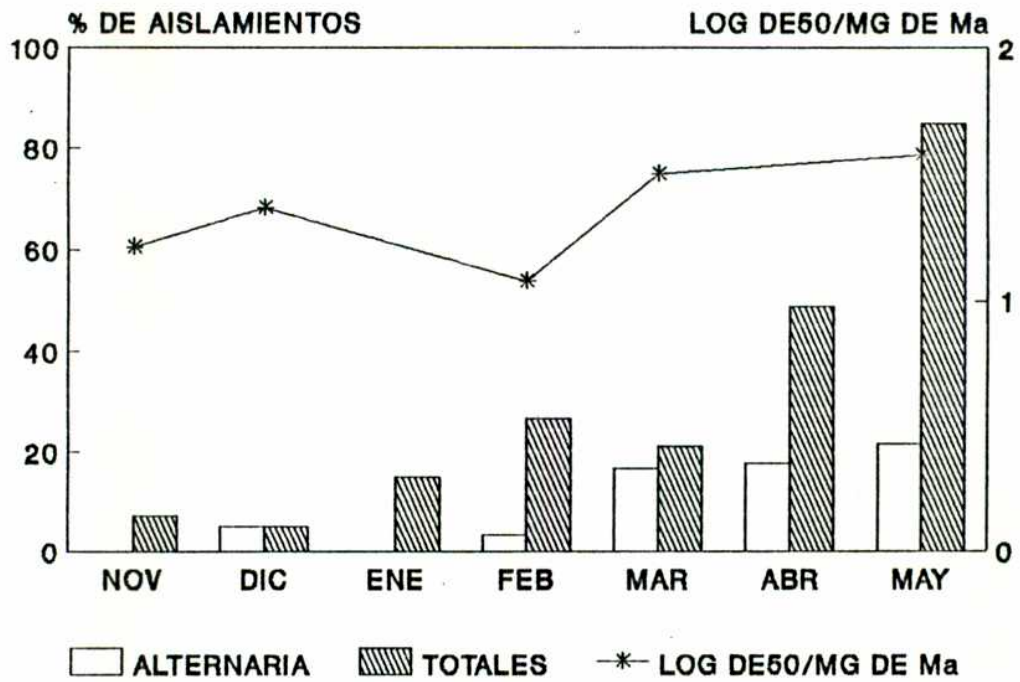
cubrieron con medio de mantenimiento. A las 24 horas p.i., se observó el efecto citopático producido por el virus en los cultivos tratados, el cual se comparó con el que produce VSV en el cultivo control que fue tratado con medio de cultivo durante todo el ensayo.

De este modo, como se indica en la figura 14, la actividad de los extractos se mantuvo siempre dentro del mismo orden, independientemente de la época de recolección de las hojas.

Cabe señalar que si se comparan los resultados de los aislamientos de endofitos obtenidos en los distintos meses (datos de la figura 4) con la actividad de las mismas muestras, se observa que el grado de colonización de las hojas no influye sobre la actividad de meliacina, ya que los extractos de noviembre y diciembre resultaron activos a pesar de la ausencia de endofitos.

FIGURA 14:

Estacionalidad de la actividad de meliacina. Relación con la frecuencia de aislamiento de endofitos.



3.5- Diferencias entre las actividades de meliacina y el antiviral producido por M2003.

3.5.1- Inducción del estado antiviral:

En trabajos anteriores se pudo determinar que el tratamiento de las células con meliacina, antes del agregado del virus, induce en estos cultivos un estado refractario a la infección con VSV (4).

Dada esta particularidad de meliacina se realizó un ensayo comparativo entre la actividad antiviral inducida por el extracto de hojas de paraíso y la actividad producida por M2003 por tratamiento de las células antes y después de la infección con VSV.

Para este ensayo se utilizaron ambos extractos en una concentración de $1,85 \cdot 10^{-2}$ gr/ml de extracto crudo. Se realizaron por separado dos series de tratamientos:

-pretratamiento de las células durante 2 horas antes de la infección y

-post-tratamiento de los cultivos infectados luego de la adsorción viral.

Las células se infectaron con 1000 UFP de VSV. A las 24 horas p.i. se tituló el rendimiento de cada ensayo y se comparó con el título del control correspondiente, que fue tratado con MEM 2% únicamente.

Los resultados de la tabla 6 muestran que a diferencia de meliacina que resultó activa tanto por pre como por post-tratamiento, el extracto de M2003 sólo actúa por post-tratamiento.

TABLA 8:

Actividad antiviral comparativa de meliacina y M2003.

ACTIVIDAD	TRATAMIENTO	MELIACINA	M2003
ANTIVIRAL:	pretratamiento	2	0
-log vt/vc	post-tratamiento	2,18	2,20

vt: rendimiento del virus tratado con el extracto.

vc: rendimiento del virus no tratado (control).

3.5.2- Actividad de meliacina en presencia de 5 - fluoruracilo (5-FU)

Se conocía que la actividad de meliacina podía ser antagonizada por el agregado de actinomicina D. Este resultado indica que es necesaria la síntesis de RNA celular para la inducción del estado antiviral(4).

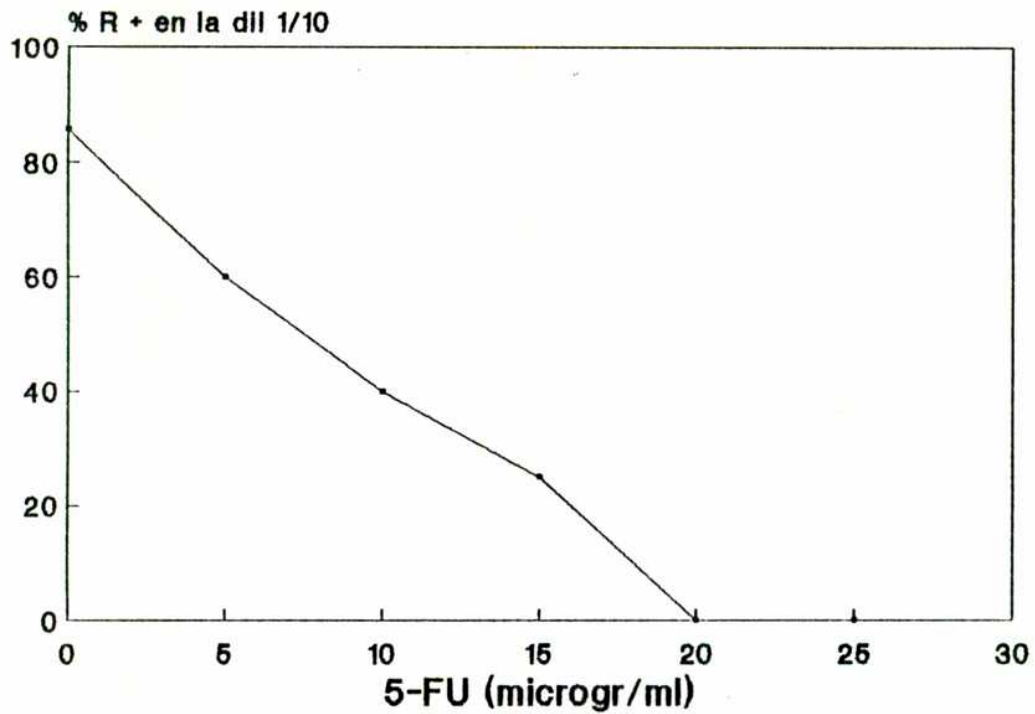
Se intentó determinar entonces si la actividad de meliacina se encontraba afectada también por el agregado de 5-FU, inhibidor del metabolismo de los ácidos nucleicos, que inhibe también la síntesis de DNA celular.

La actividad de meliacina se ensayó por post-tratamiento contra PrV (27) cuya replicación, de acuerdo con datos previos, no se encuentra afectada en presencia de 5-FU (7). En este caso, el agregado de la máxima concentración no tóxica de 5-FU no modificó el rendimiento de PrV.

Con este objeto, las células se incubaron durante 24 horas con diferentes concentraciones de 5-FU y 2 ug/ml de timidina (7). Se descartó el medio y se realizó la infección con una multiplicidad de 1 UFP/célula de PrV. Luego de la adsorción se

FIGURA 15:

Actividad de meliacina en presencia de 5-FU.



R+: Se midieron las respuestas positivas (protección) acumuladas cuando las células fueron tratadas con una dilución 1/10 de meliacina en presencia de distintas concentraciones de 5-FU.

agregó el medio de cultivo conteniendo distintas diluciones de meliacina (por cuadruplicado) para cada tratamiento con 5-FU. A las 48 hs p.i., se observaron las monocapas y se compararon con una titulación control de actividad de meliacina.

En la figura 15 se observa que el porcentaje de cultivos protegidos (respuestas positivas = R+), disminuyó en forma dependiente de la concentración de 5-FU utilizada.

Una concentración de 20 ug/ml de 5-FU alcanza para inhibir completamente la actividad de meliacina. Estos resultados confirmarían las evidencias anteriormente citadas, que demuestran que meliacina requiere de un metabolismo celular activo para ejercer su acción antiviral.

3.5.3- Actividad antiviral comparativa de meliacina y el extracto de M2003 en presencia o ausencia de 5-FU.

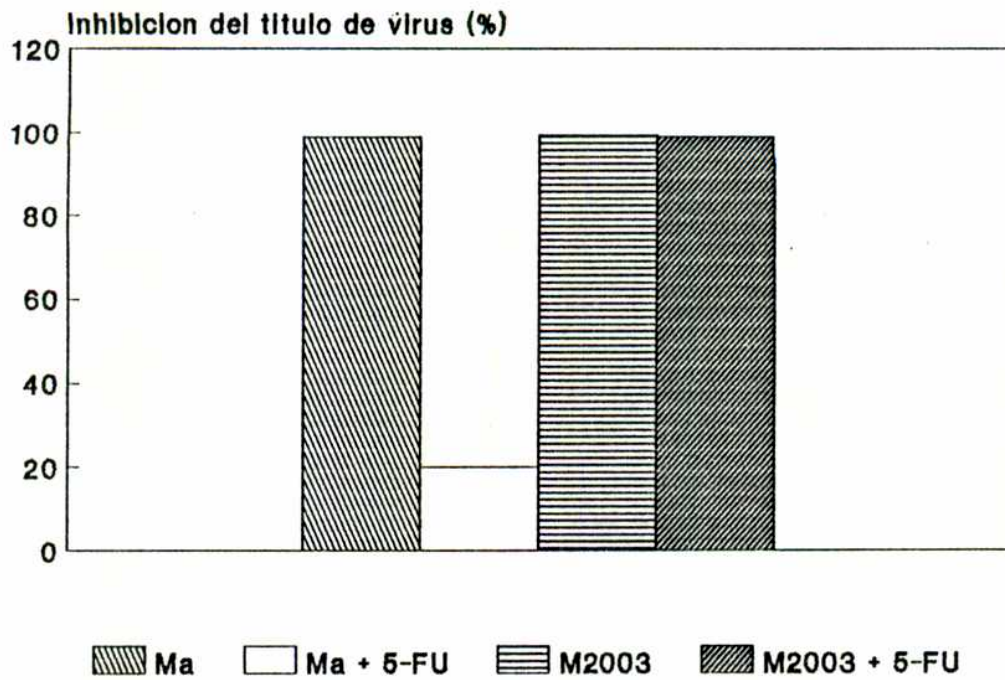
Con el fin de analizar la posible influencia del 5-FU sobre el principio antiviral obtenido a partir de M2003, se trataron células Vero con medio de cultivo (MEM 2%) conteniendo 20 ug/ml de 5-FU o MEM 2% únicamente, durante 24 horas a 37 °C. Se eligió esta concentración de 5-FU ya que era la que inhibía por completo la actividad de meliacina (figura 15).

Al cabo de dicho tiempo, los cultivos se infectaron con una multiplicidad de 1 UFP/célula de PrV y luego de la adsorción los cultivos se cubrieron con MEM 2% o MEM 2% conteniendo una dilución 1/10 de meliacina o del extracto de M2003.

A las 24 horas p.i., se cosechó el virus intra y extracelular y se determinó el rendimiento para los cultivos tratados con: extracto + 5-FU, extracto solo, 5-FU solo, y MEM 2% (control de titulación de PrV).

FIGURA 16:

Actividad comparativa de M2003 y meliacina en presencia o ausencia de 5-FU.



FU: 5-fluoruracilo (20 ug/ml).
Ma: meliacina (dilución 1/10).
M2003: dilución 1/10 de extracto crudo.

Los datos presentados en la figura 16, indican que la acción antiviral de meliacina disminuyó un 80% cuando las células se trataron previamente con 5-FU, mientras que la actividad del extracto de M2003 no se vió afectada por el agregado del inhibidor.

3.6- Purificación parcial en paralelo de los compuestos con actividad antiviral producidos por M2003 y *Melia azedarach L.*

3.6.1- Material de partida

Se resolvió utilizar el mismo esquema de purificación parcial para ambos antivirales, con el objeto de obtener fracciones activas a partir de los extractos crudos de M2003 y *Melia azedarach L.* y poder realizar un estudio comparativo de las mismas.

Para ello se partió en ambos casos de un extracto crudo en fase acuosa. En el caso de meliacina, se resuspendió un extracto liofilizado en agua bidestilada, en una proporción de 0,2 gr de liofilizado/ml, y se lo clarificó por centrifugación.

Por otro lado se utilizó un cultivo de M2003 crecido durante 7 días en medio líquido de Czapek-Dox.

A partir de ambos materiales se separó una alícuota para medir actividad antiviral, y el resto se conservó para el siguiente paso de purificación.

3.6.2- Extracción con acetato de etilo.

Se realizó una extracción volumen a volumen con acetato de etilo a partir de ambos materiales acuosos. La fase acuosa se

descartó, mientras que la fase orgánica se evaporó a sequedad y se conservó a -20°C . Una alícuota de cada material extraído, se resuspendió en FBS para la determinación de actividad antiviral.

Como se observa en el esquema de la figura 17, tanto el antiviral presente en los extractos de hojas como el que produce el hongo, mostraron afinidad por el solvente utilizado.

De este modo, como hasta este punto no se encontraron diferencias en el comportamiento químico de ambos compuestos, se procedió a separar ambas fracciones orgánicas por cromatografía en columna de sílica gel.

3.6.3- Cromatografía en columna de sílica gel.

El material extraído con acetato de etilo, se evaporó a sequedad y se resuspendió en un mínimo volumen del mismo solvente, a fin de sembrar el material en el tope de una columna de sílica gel. La elución de la columna se llevó a cabo con mezclas de cloroformo:metanol en diferentes proporciones.

A partir de este punto se pudo observar una diferencia entre ambos antivirales. Como se indica en el esquema de la figura 17, la fracción activa del extracto de meliicina se obtuvo en la fracción que eluyó con una mezcla de cloroformo:metanol 95:5, mientras que la fracción activa del hongo, eluyó con una mezcla correspondiente a 90:10, de mayor polaridad que la utilizada para la elución de meliicina.

3.6.4- Cromatografía en capa delgada de sílica gel.

Las fracciones eluidas de la columna, se concentraron diez veces por evaporación, y se cromatografiaron por separado en una placa de sílica gel.

Las fotos de la figura 18, muestran claramente que los

patrones de corrida de los compuestos eluidos, obtenidos a partir del extracto de hojas de paraíso (18.a) y del cultivo de M2003 (18.b), son diferentes.

Los resultados muestran que a partir de la purificación de meliacina, se obtuvo una banda con $rf = 0,33$, correspondiente a la banda activa obtenida en trabajos anteriores (1). En cambio la fracción purificada del extracto de M2003, mostró una banda de $rf = 0,55$, tal como se había determinado anteriormente en un trabajo preliminar sobre la purificación del compuesto activo de M2003 (46).

Por otro lado la composición química de meliacina dió un 86% de aminoácidos (1), mientras que la del extracto purificado de M2003 fue entre 4 y 7% (46).

3.6.5- Actividad antiviral y toxicidad de la fracción purificada de M2003.

A partir del material eluido de la columna de sílica, se reunieron y evaporaron las fracciones activas del extracto de M2003. Este material se resuspendió en acetato de etilo y se sembró en una capa delgada de sílica a fin de separar las diferentes bandas por cromatografía.

Las bandas se detectaron por revelado con una mezcla de etanol:ácido sulfúrico 95:5, y se levantaron con una espátula a partir de la placa. Cada banda fue eluida por separado con acetato de etilo, y el material se conservó para determinar su actividad.

Se encontró que la banda de $rf = 0,55-0,6$, fue capaz de producir una inhibición de 2 logaritmos en el rendimiento del virus MSV, por tratamiento de los cultivos infectados con una concentración de 0,2 mg/ml de dicho material purificado. Esta

concentración no resultó tóxica para los cultivos de células
Vero.

FIGURA 17:

Esquema comparativo de obtención de material semipurificado de M2003 y *Melia azedarach* L.

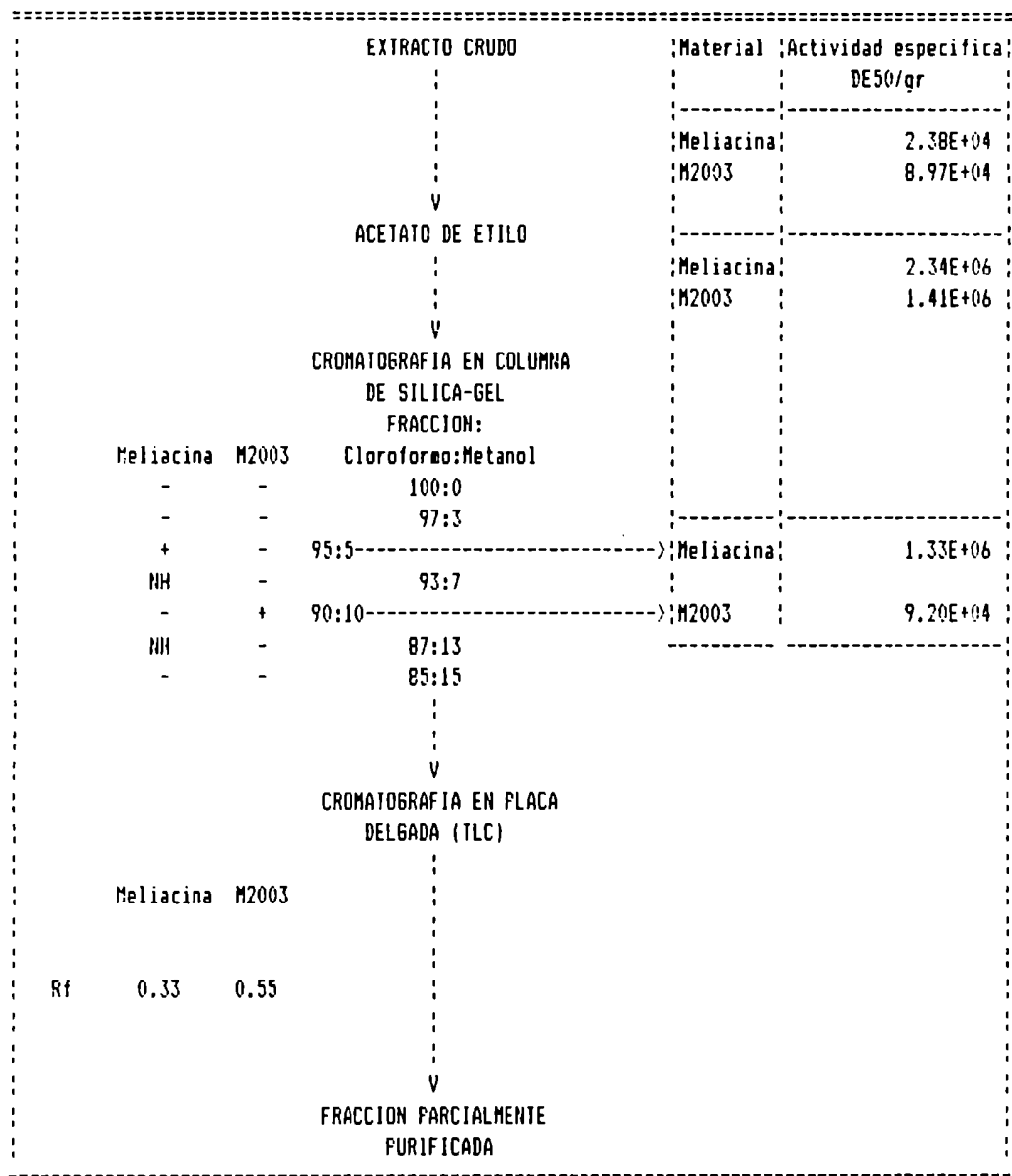


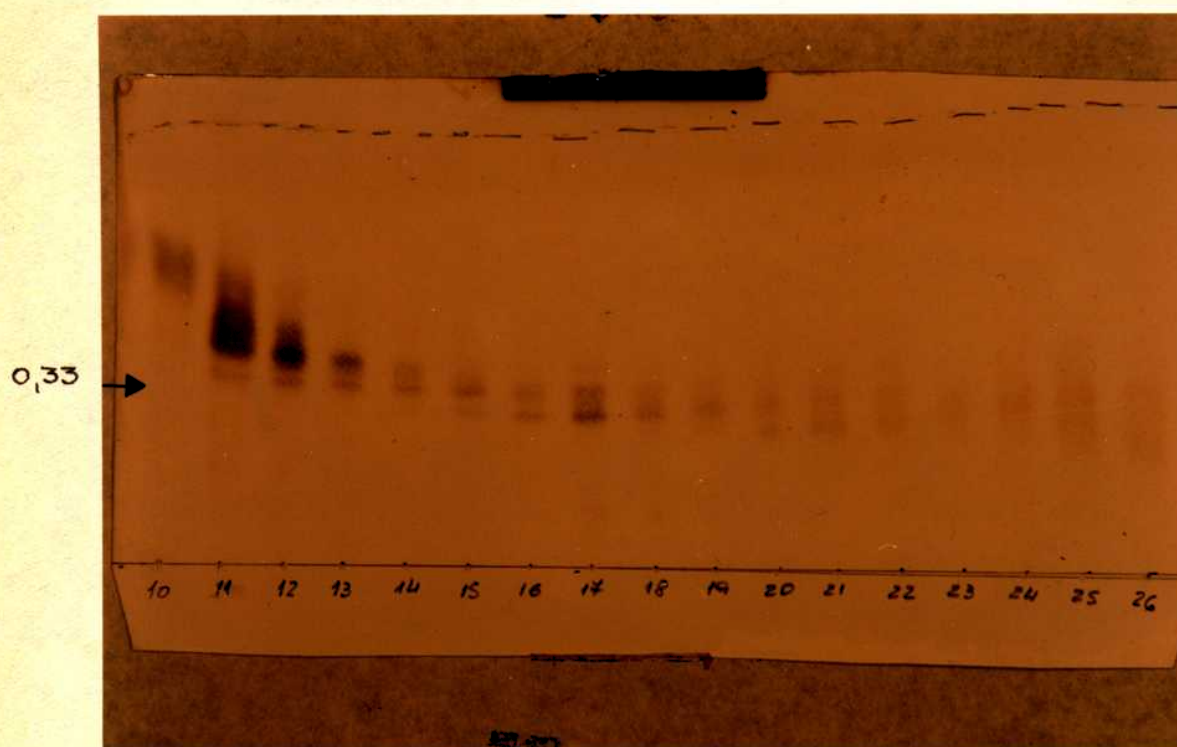
FIGURA 18:

Cromatografía en capa delgada de las fracciones eluidas de la columna de sílica gel de M2003 y *Melia azedarach* L.

Foto 18.a: *Melia azedarach* L

cloroformo:metanol

10-	97:3
11-	95:5 (DE50/ml >160)
12-	95:5
13-	95:5 (DE50/ml >640)
14-	95:5
15-	95:5 (DE50/ml >320)
16-	95:5
17-	95:5 (DE50/ml >640)
18-	95:5
19-	95:5 (DE50/ml =227)
20-	95:5
21-	90:10 (DE50/ml =28)
22-	90:10
23-	90:10 (DE50/ml =28)
24-	90:10
25-	90:10 (DE50/ml =48)
26-	90:10

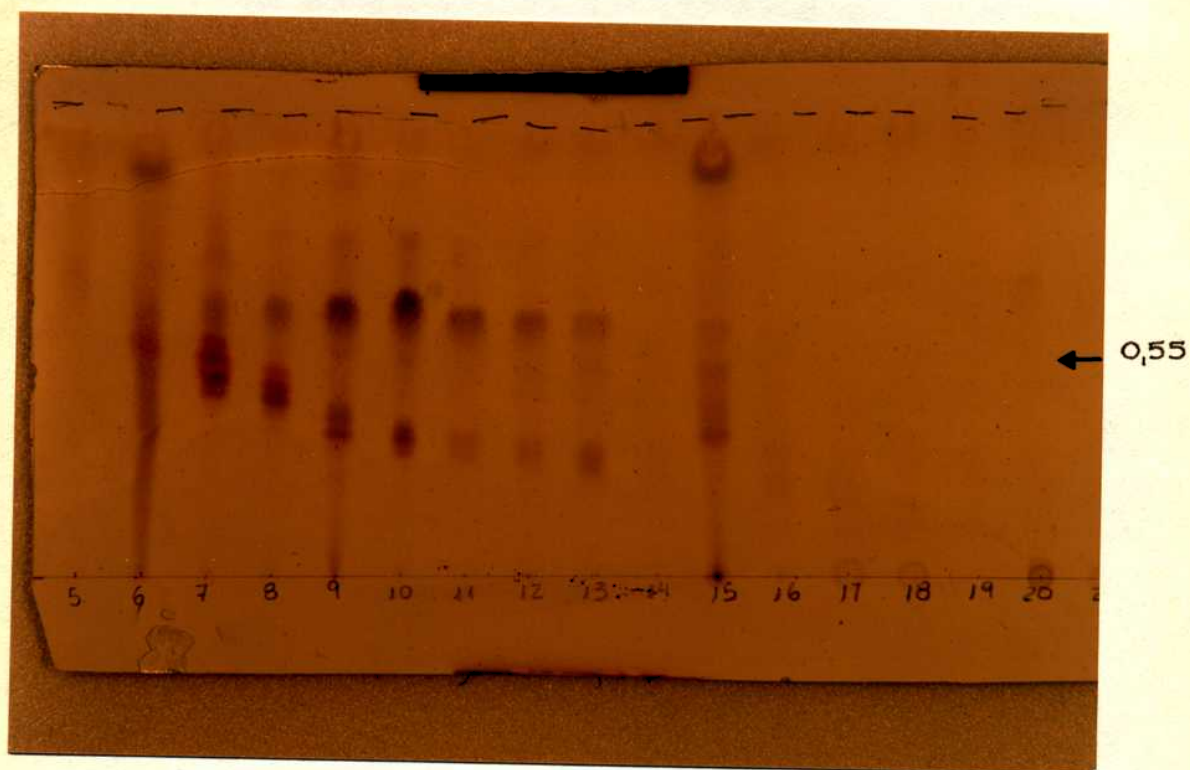


Solvente de corrida: cloroformo:metanol 90:10
Revelador: ácido sulfúrico 5% en etanol
rf banda activa: 0,34-0,36.

Foto 18.b: M2003

cloroformo:metanol

5-	97:3	(DE50/ml <10)
6-	95:5	(DE50/ml <10)
7-	95:5	
8-	95:5	(DE50/ml <10)
9-	93:7	
10-	93:7	
11-	93:7	
12-	90:10	(DE50/ml =160)
13-	90:10	
14-	90:10	(DE50/ml =160)
15-	patrón M2003	purificado
16-	90:10	(DE50/ml =113)
17-	90:10	(DE50/ml =113)
18-	87:13	
19-	87:13	(DE50/ml <10)
20-	87:13	
21-	85:15	(DE50/ml <10)



Solvente de corrida: cloroformo:metanol 90:10
Revelador: ácido sulfúrico 5% en etanol
rf banda activa: 0,34-0,36.

PARTE IV

4- BUSQUEDA DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN HONGOS DEL GENERO *ALTERNARIA* AISLADOS DE DISTINTAS FUENTES.

Ya se introdujo en este trabajo el fenómeno de la producción de metabolitos fúngicos, específicos de la relación que los hongos establecen con la planta hospedante.

Se intentó determinar entonces, si la producción de la actividad antiviral era específica de los aislamientos de *Alternaria*, obtenidos de hojas de paraíso, o podía ser una propiedad de las cepas de este género.

Con este objeto se repicaron aislamientos de *Alternaria* obtenidos a partir de diferentes sustratos, los cuales fueron seleccionados de acuerdo al rol ecológico que el hongo cumple en cada uno de ellos.

Dos de los aislamientos, M-III y M-IV, se obtuvieron a partir de manzana, fruto en el cual el hongo cumple un papel patogénico.

Los aislamientos S y P, procedían de muestras de suelo y hojarasca, en las cuales el hongo se desarrolla como saprófito.

Por último se eligieron otros aislamientos donde *Alternaria* aparece como endofito en la planta hospedante: *Baccharis coridifolia*, *Juncus sp.* y *Melia azedarach L.*

Los repiques de estas cepas crecieron sobre agar-malta durante 15 días a temperatura ambiente en la oscuridad.

Al cabo de ese período se realizaron las extracciones de los aislamientos con metanol y cloroformo. Cada fracción extraída se evaporó a sequedad.

Esta fracción se dividió en dos alícuotas. Una de ellas,

resuspendida en PBS, se utilizó para el ensayo de actividad antiviral, y la otra se resuspendió en cloroformo y se analizó por cromatografía en capa delgada.

La tabla 9 muestra que se detectó actividad antiviral en todas las cepas. Sin embargo debe destacarse que la actividad de algunos de los aislamientos resultó considerablemente elevada.

En particular dichos cultivos correspondieron a los hongos aislados a partir de *Baccharis*, *Juncus* y *Alternaria*, en los cuales el hongo fue aislado como endofito.

El ejemplo más claro es el de la cepa E336 de *Alternaria alternata*, cuya actividad fue aproximadamente 100 veces mayor que la de los aislamientos de suelo, manzana e incluso algunos de los de patata.

El mismo fenómeno se repite con la cepa M2002, obtenida durante el primer aislamiento de este trabajo, y que fue previamente identificada como cepa altamente productora.

Cabe mencionar que en un ensayo previo, no se encontró actividad en dos cepas patógenas de *Alternaria*, aisladas de limón y manzana.

El patrón de los productos extraídos a partir de las distintas cepas, muestra la producción de algunos metabolitos comunes a todos los aislamientos del género.

En la foto de la figura 19.a se observa que todas las cepas producen alternariol metil éter y la mayoría también alternariol, por comparación con una mezcla patrón de ambas toxinas. Los datos del r_f observados para estos compuestos coinciden con los descritos en la literatura (69), (70).

La presencia del antiviral se puede evaluar con mayor precisión en las cromatografías que fueron reveladas con etanol:ácido sulfúrico y con cloruro férrico (fotos 19.b y 19.c respectivamente). En el primer caso se revelan componentes

orgánicos de la muestra ; en el segundo , se manifiestan fundamentalmente fenoles y derivados fenólicos. La mezcla de solventes empleada en ambas cromatografías fue cloroformo :acetona 88:12 de manera tal de impedir la migración del ácido tenuazonico, único metabolito ya descrito en *Alternaria* con actividad antiviral.

TABLA 9:

Actividad antiviral de cepas de *Alternaria* de diferentes orígenes.

CEPA	ORIGEN	ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE50/ml	BANDA rf 0,23 #	BANDA rf 0,27-0,29 #
P	suelo	33,33	+	
S	suelo	28,28		
M-III	manzana	113,14		+
M-IV	manzana	95,16		+
C16	Baccharis	226,27		+
B336	Baccharis	5120		+
J156	Juncus	2152,4	+	+
M2002	Melia	3620,4		+
M2025	Melia	95,14		+
M2031	Melia	67,27	+	+

Ver cromatografía de la figura 19.b

Los patrones que corresponden a una fracción previamente purificada por cromatografía en capa delgada del extracto de M2003, muestran bandas cuyos valores de rf corresponden a: 0,23; 0,27-0,29; 0,54 y 0,63 por revelado con etanol:ácido sulfúrico (foto 19.b).

La única banda que se reveló con cloruro férrico es la que corresponde a un rf= 0,23 (foto 19.c).

Se observa que los aislamientos P, J156, M2003 y M2031 presentan la banda de 0,23 (calles 1, 10 y 14

respectivamente), mientras que en todos los demás (salvo S y F, calles 1 y 2) se observa la banda de 0,27-0,29 (foto 19.b).

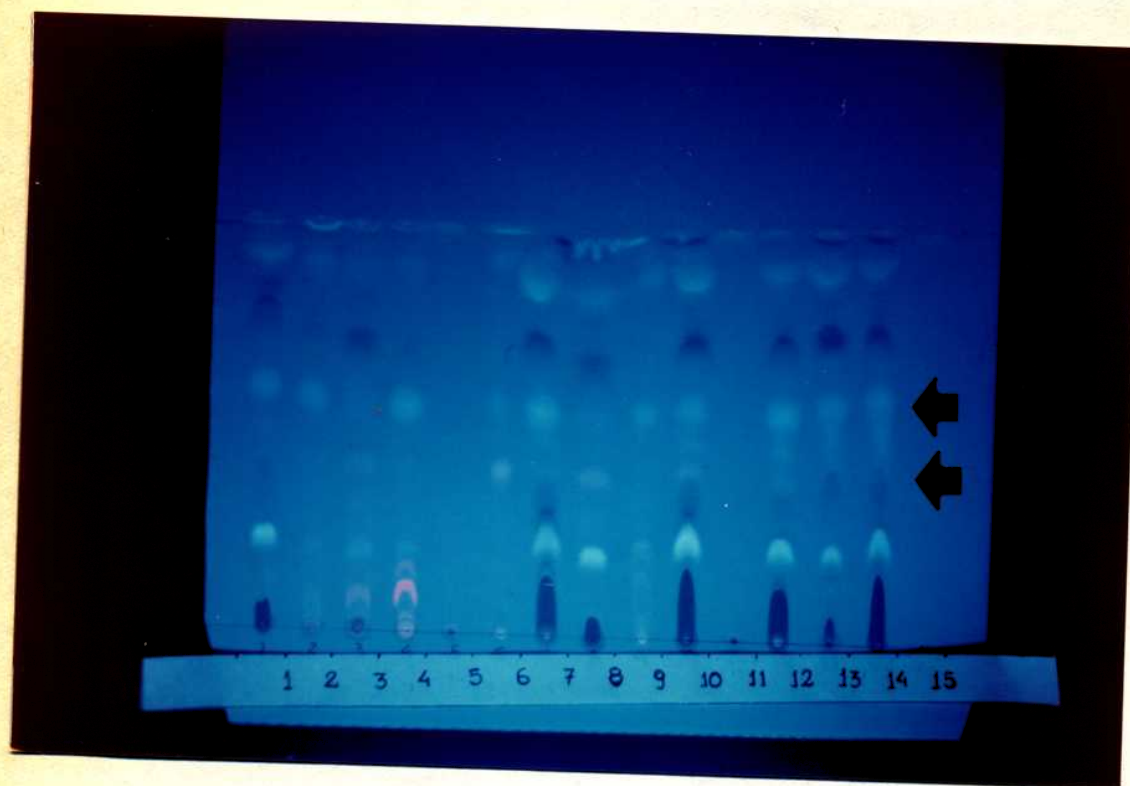
Es interesante destacar que todos aquellos aislamientos, independientemente de la fuente de origen, que presentan una actividad mayor que 100 DE50/ml (M 111, C16, B336, J156 y M2002), evidencian una banda con un r_f 0,27-0,29 común con el control del extracto de M2003 (calle 11 foto 19.b) y con una fracción previamente purificada de M2003 (calle 5, foto 19.b). Dado que la mezcla de solventes utilizada en este caso (cloroformo:acetona 88:12) tiene una menor polaridad respecto de cloroformo:metanol 90:10, es posible inferir que la banda correspondiente a la actividad de la de la cepa testeada, así como la de M2003, presentan un r_f menor. En efecto, la foto de la figura 20 muestra una cromatografía en capa delgada de sílica realizada con cloroformo:metanol 90:10, en la cual se observa que el aislamiento de B336 (de mayor actividad antiviral) presenta una banda considerable a la altura de 0,49-0,61, que coincide, no sólo con el control de M2003, sino también con los aislamientos antes mencionados (calles 2, 4, 3 y 8).

FIGURA 19:

Cromatografía en capa delgada de los extractos de *Alternaria* de diferentes orígenes

foto 19.a:

- 1- P
- 2- S
- 3- M III
- 4- M IV
- 5- banda activa M2003
- 6- patrón alternariol y alternariol metil éter
- 7- J156
- 8- C16
- 9- B336
- 10- M2003
- 11- patrón: banda activa M2003
- 12- M2002
- 13- M2025
- 14- M2031



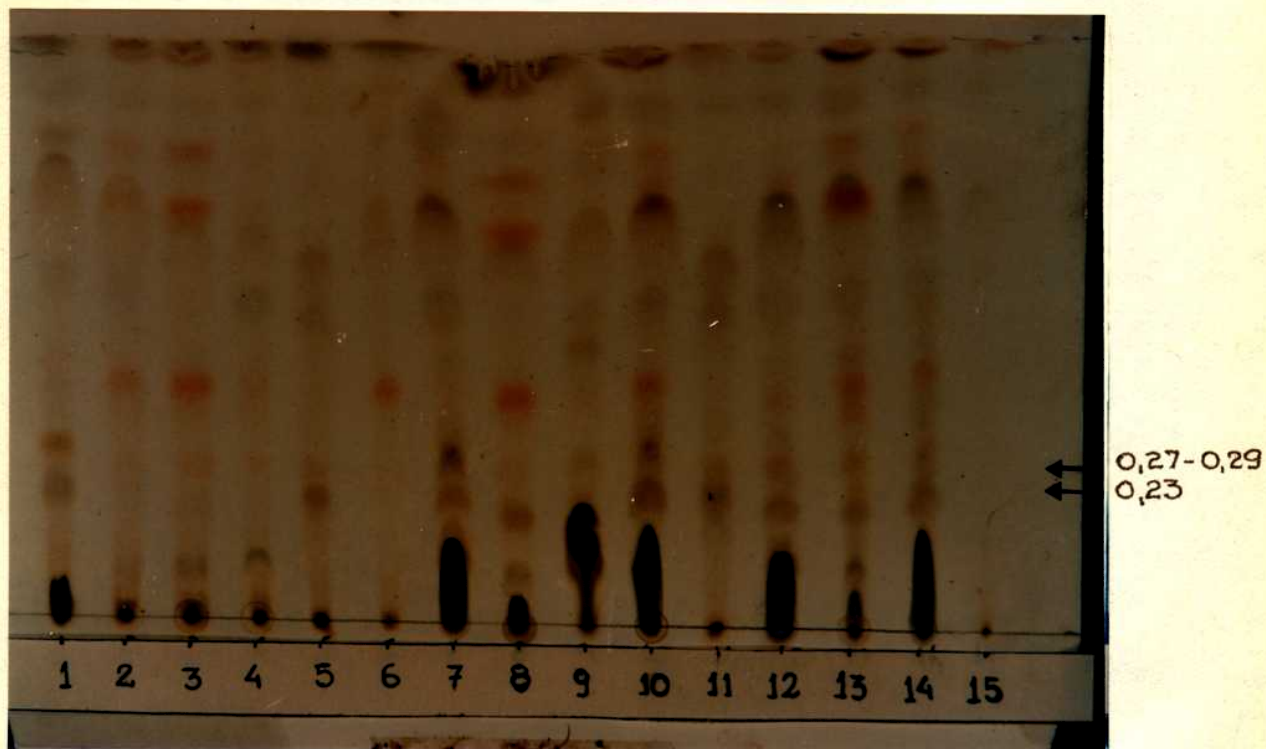
alternariol metil éter

alternariol

Revelado: luz UV cercana
Solvente: cloroformo:acetona 88:12

foto 19.b

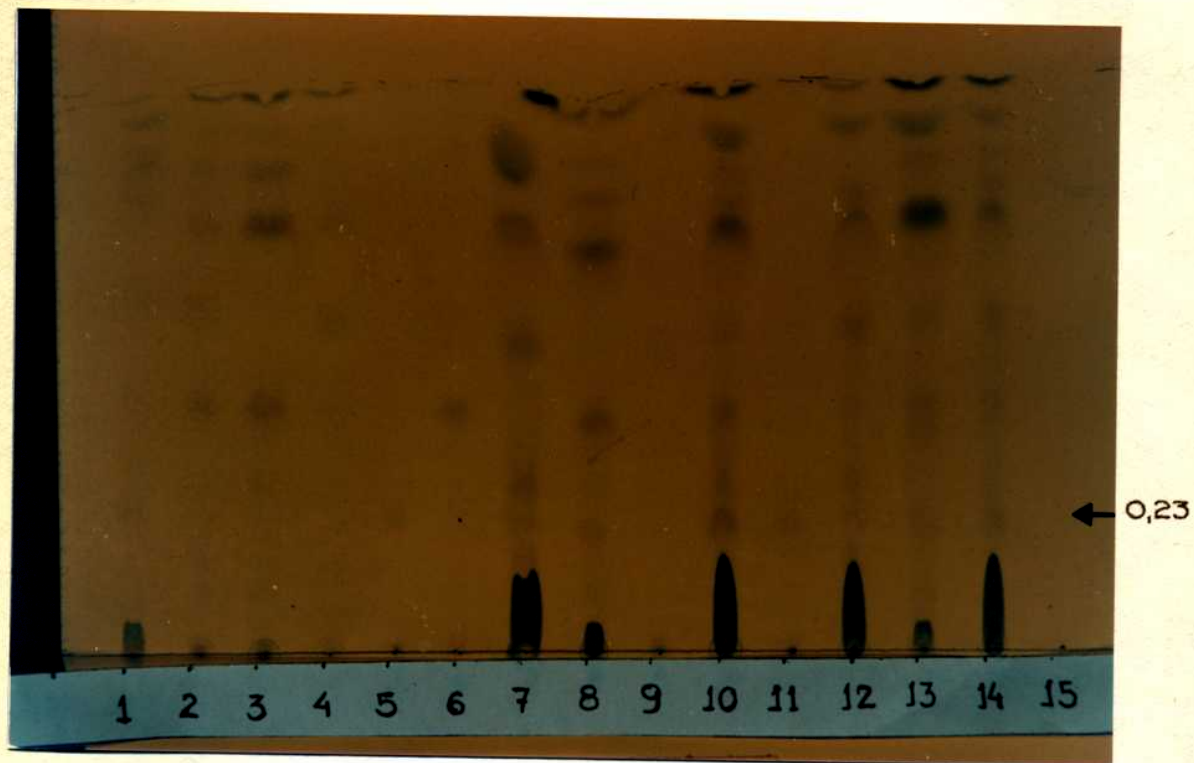
- 1- P
- 2- S
- 3- M III
- 4- M IV
- 5- banda activa M2003
- 6- patrón alternariol y alternariol metil éter
- 7- J156
- 8- C16
- 9- B336
- 10- M2003
- 11- patrón: banda activa M2003
- 12- M2002
- 13- M2025
- 14- M2031



Revelado: ácido sulfúrico 5% en etanol
Solvente: cloroformo:acetona 88:12

foto 19.c

- 1- P
- 2- S
- 3- M III
- 4- M IV
- 5- banda activa M2003
- 6- patrón alternariol y alternariol metil éter
- 7- J156
- 8- C16
- 9- B336
- 10- M2003
- 11- patrón: banda activa M2003
- 12- M2002
- 13- M2025
- 14- M2031

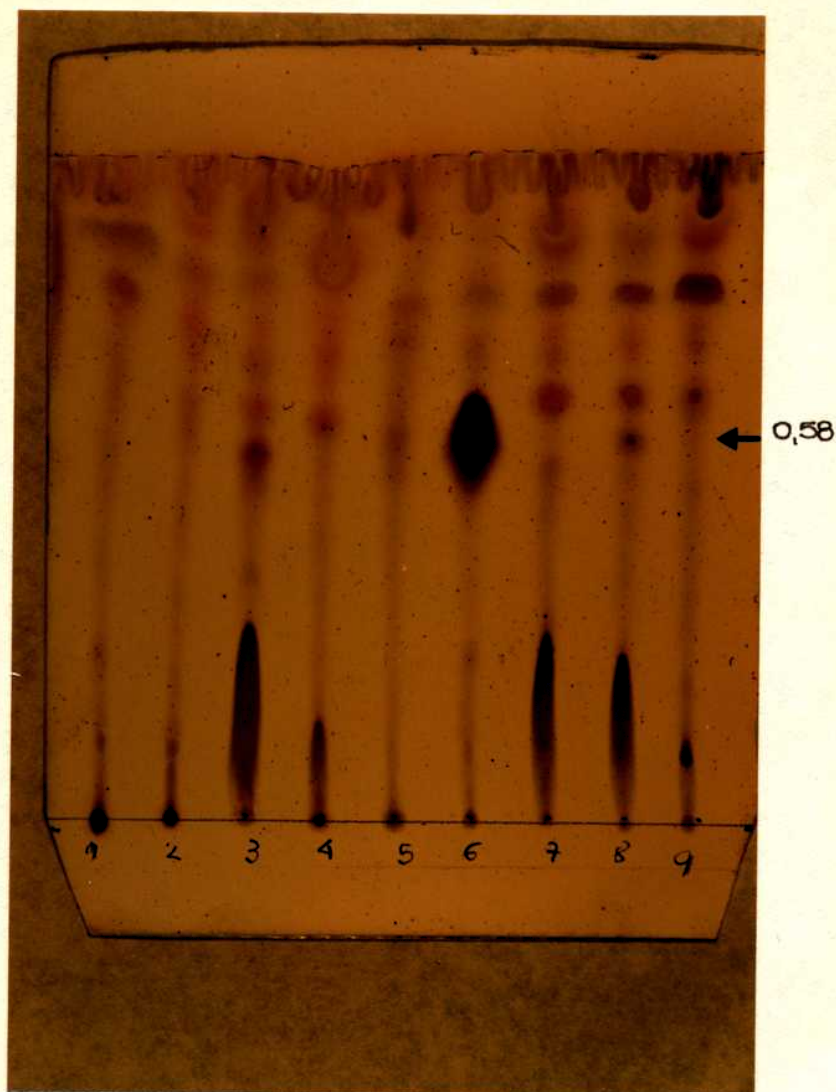


Revelado: cloruro férrico 2%
Solvente: cloroformo:acetona 88:12

FIGURA 20:

Cromatografía en capa delgada de los extractos de *Alternaria* de diferentes orígenes

- 1- S
- 2- M III
- 3- J156
- 4- C16
- 5- banda activa M2003
- 6- B336
- 7- M2003
- 8- M2002
- 9- M2025



Revelado: ácido sulfúrico 5% en etanol
Solventes: cloroformo:metanol 90:10

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La gran parte de los compuestos utilizados actualmente en quimioterapia antiviral son obtenidos por síntesis química.

En general estos compuestos son inhibidores de algún paso de la multiplicación viral durante el proceso de infección en las células. Lamentablemente la mayoría resultan tóxicos para la misma, o bien desencadenan efectos colaterales no deseables en el caso de las aplicaciones realizadas in-vivo.

La búsqueda de compuestos de origen natural para ser aplicados en esta clase de terapia se basa precisamente en ensayar extractos de distintas fuentes que tradicionalmente hayan sido usadas en medicina natural para combatir distintas enfermedades con baja o nula toxicidad para el huésped infectado.

Las plantas han sido una fuente común de medicamentos, tanto en la forma de preparaciones tradicionales como en principios activos puros. De allí la importancia de identificar a los posibles productores de estos compuestos e intentar la purificación de los mismos. En particular se han aislado péptidos con actividades biológicas no verificadas como esenciales para el metabolismo de la planta y que resultan útiles para el uso médico. De esta manera estos compuestos podrían ser utilizados como drogas alternativas y contribuir al ya conocido espectro de terapias antivirales actualmente en uso (31).

Según las investigaciones detalladas en el presente trabajo de tesis, endofitos pertenecientes al género *Alternaria* capaces de producir un metabolito con actividad antiviral y baja toxicidad, deben ser incluidos en este contexto. Particularmente ha sido posible aislar la especie *Alternaria alternata* responsable de dicha actividad a partir de hojas de *Melia azedarach* L., las cuales presentan per sé actividad antiviral frente a un amplio rango de virus ADN y ARN (87) (88).

En este trabajo se demuestra que la cepa M2003 de *Alternaria*

alternata produce un antiviral diferente del recientemente mencionado, presente en los extractos de hojas de *Melia azedarach* L.

Otro de los aportes realizados en el transcurso de esta investigación es la descripción de la asociación entre *Alternaria alternata* y *Melia azedarach* L.

Los hongos del género *Alternaria* son de distribución cosmopolita y en general producen diferentes patologías en las plantas hospedadoras (80).

En este caso particular las hojas a partir de las cuales fue aislado el hongo como endofito presentaban un aspecto sano, sin síntomas aparentes de infección. Más aún, entre las cincuenta y siete especies fúngicas descritas como patógenas de la planta de paraíso no han sido reportados los hongos de este género (95). Esto indicaría que es muy factible que una vez que *Alternaria* se desarrolla sobre la superficie de la hoja, puede penetrar de algún modo en los tejidos internos de la misma y así comportarse como endofito.

La mayoría de los aislamientos de *Alternaria alternata* se logran con mayor frecuencia durante la época otoñal. Este hecho no parecería atribuible a diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente, dado que en los meses de primavera, con características climáticas semejantes a las del otoño, no se encontraría favorecido el desarrollo de endofitos. Por otra parte los endofitos son capaces de invadir los tejidos de hojas de diferentes edades (figura 5) siempre durante la época otoñal, razón por la cual las hojas de paraíso resultarían susceptibles a la colonización fúngica dependiendo de las condiciones ambientales más que de la edad de las hojas.

El principio de esta época resultaría propicia para el

desarrollo de *Alternaria* ya que se observó un aumento en la colonización por otras especies fúngicas hacia fines del otoño. En particular, durante el último aislamiento, se observó una alta frecuencia de un ascomicete aún no identificado.

Si bien la presencia de endofitos es conspicua y repetitiva a lo largo de la época otoñal, las once cepas de *Alternaria* ensayadas presentaron distintos niveles de producción del principio activo (tabla 5). Se realizó la caracterización biológica de la cepa denominada M2003 (alta productora) identificada como *Alternaria alternata*, encontrando que los extractos de este hongo presentaban mayor actividad antiviral y menor toxicidad cuando eran cultivados en agar Czapek-Dox (tabla 6).

Asimismo el hongo es capaz de exportar el principio activo al medio de cultivo extracelular fundamentalmente a lo largo de la fase de crecimiento exponencial (figura 8.a). Por ende y a diferencia de otros compuestos con actividades biológicas comprobadas, no se trataría de un metabolito secundario. Por el contrario, se observó una toxicidad considerablemente alta durante la fase estacionaria que probablemente se deba a la producción de alguna toxina exportable, especialmente alternariol y alternariol metil éter las cuales presentan un pico de producción al comienzo de la fase estacionaria en cultivos realizados en medio sintético (89). De todos modos no se puede descartar que la producción del antiviral ocurra simultáneamente con la del compuesto tóxico durante esta etapa, a diferencia de lo que sucede en la etapa del crecimiento exponencial en la cual se obtiene la actividad antiviral en ausencia de toxicidad. Cabe destacar que los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del hongo no fueron limitantes en las condiciones ensayadas (figura 8.b).

Respecto de la actividad biológica propiamente dicha se determinó que, extractos de micelio de la cepa M2003 inhiben la multiplicación tanto de virus ARN (VSV) como de virus ADN (FrV y HSV-1), cuyos mecanismos de replicación involucran procesos totalmente distintos, por lo cual aparentemente estaría afectado un mecanismo común ya que en los tres casos la inhibición fue dependiente de la dosis de extracto. Paralelamente el medio de cultivo líquido de M2003 no mostró actividad antibiótica contra las diferentes bacterias ensayadas, en tanto que tiene un efecto antifúngico moderado contra otros hongos que colonizan el mismo hospedador. El crecimiento de los mismos podría haberse inhibido ya sea por falta de espacio físico para el desarrollo de la colonia o por la producción de algún metabolito de M2003 que impediría el crecimiento del otro hongo.

A partir de la asociación de *Alternaria* con *Melia azedarach* I, la planta podría recibir algún beneficio relacionado con el antagonismo hacia la infección con otros microorganismos patógenos, como ha sido descrito en la introducción para la relación entre endofito y hospedante. Sería interesante entonces, verificar si el principio activo producido por este hongo, podría servir como mecanismo de defensa a la planta hospedante frente a diferentes enfermedades producidas frente a virus vegetales.

Resultados anteriores demostraron que algunas cepas de *Alternaria* aisladas como endofito, eran capaces de producir actividades antibacterianas y antifúngicas en cultivo de laboratorio (33).

En el caso de la cepa M2003 sólo se encontró un efecto antagónico moderado hacia el hongo MUG, hecho que no descarta que cepas de otros aislamientos de *Alternaria* puedan presentar actividades antimicrobianas más notorias.

Si bien *Alternaria alternata* produce un metabolito con actividad antiviral, se planteó el interrogante acerca de una posible y directa asociación con meliacina, el principio aislado de las hojas del paraíso (2).

Sin embargo existe evidencia experimental que demuestra que ambas actividades no se encontrarían relacionadas entre sí.

En primer lugar, la actividad antiviral de meliacina fue verificada en brotes, yemas laterales y hojas verdes, en tanto que el aislamiento de endofitos sólo fue posible en el caso de las hojas verdes. Asimismo la actividad antiviral de *Melia azedarach* L. se detectó en extractos de hojas obtenidas a lo largo del período noviembre-mayo, hecho que se correlaciona con el aislamiento de endofitos únicamente durante los meses de marzo, abril y mayo (figura 14).

Desde el punto de vista del mecanismo de acción ambos principios activos parecerían comportarse de distinta manera. En efecto, la meliacina actúa inhibiendo la multiplicación viral cuando se agrega antes o después del virus a la monocapa celular, mientras que el extracto de la cepa M2003 no es capaz de inducir un estado refractario a la infección, ya que sólo actúa por post-tratamiento (tabla 8).

Por último la meliacina precisaría el metabolismo celular activo para ejercer su acción antiviral, pues se observa una disminución del título viral no significativa cuando las células fueron tratadas con 5-FU. En cambio en el caso de la cepa M2003 el efecto inhibitorio no se vio modificado por el agregado del análogo.

Todas estas evidencias indicarían que la presencia de hongos no sería un factor determinante en la producción de meliacina y viceversa.

Los experimentos realizados con extractos crudos de material

vegetal en distintos estadios de desarrollo indicarian que la produccion de meliacina podria estar relacionada con el grado de diferenciacion que presentan los tejidos de la planta, ya que los callos y las celulas indiferenciadas no poseen actividad antiviral.

La caracterizacion quimica de los principios activos del hongo y de la planta a traves del mismo esquema de purificacion corroboraria el hecho de que se trataria de compuestos diferentes.

Al igual que diversos antibioticos con actividad antiviral, ambos compuestos presentaron afinidad por solventes organicos. Sin embargo la fraccion activa del hongo eluyó en una mezcla de cloroformo:metanol de mayor polaridad que la correspondiente utilizada en la elucion de meliacina (figura 17). A su vez los patrones de corrida obtenidos a traves de una cromatografia en capa delgada de silica gel no son comparables, ya que los valores de r_f de cada producto con actividad antiviral comprobada son de 0,33 y 0,55 para la meliacina y la fraccion activa del endofito respectivamente. En este ultimo caso, cabe aclarar que la multiplicacion del VSV se redujo en 2 logaritmos respecto del control sin evidenciar toxicidad para los cultivos de las celulas Vero ni para los ratones inoculados intraperitonealmente. Si bien no ha sido posible definir la dosis letal 50 (DL50), se puede inferir que una concentracion determinada del compuesto capaz de inhibir la produccion viral in vitro no resultó tóxica in-vivo.

Por lo tanto, las diferencias observadas en diversos aspectos biologicos tales como la produccion y el mecanismo de accion de ambos antivirales y, a su vez, la demostracion de un comportamiento quimico diferencial, sugieren que se trataria de dos moléculas diferentes.

Es importante destacar que la fracción activa de *Alternaria alternata* no presenta un r_f comparable al del las toxinas alternariol y alternariol metil éter (foto 19.a), las cuales resultan mayoritarias en este género de hongos. Por otra parte el principio aislado de la cepa M2003 migra en un sistema cloroformo:acetona 88:12 en una cromatografía en capa delgada de sílica gel, en tanto que el ácido tenuazónico (capaz de inhibir un amplio espectro de virus animales), no se cromatografía en estas condiciones (70). Como dato adicional tampoco son coincidentes los valores de r_f respectivos obtenidos en una corrida con una mezcla de cloroformo:metanol 90:10, ya que el ácido tenuazónico exhibe un r_f próximo a 0,3 y el compuesto de M2003, un r_f de 0,55-0,63 en este sistema de solventes (foto 20).


El análisis de los extractos de otras cepas de *Alternaria* no asociadas con el paraíso demostró que la actividad antiviral es considerablemente elevada, fundamentalmente en aquellos casos en que el hongo fue aislado como endofito (tabla 9).

El ejemplo más notorio de este fenómeno es el la cepa B336 que presentó un r_f similar al de la fracción activa de M2003. La producción del antiviral no sería específica de la relación que establece *Alternaria* con *Melia azedarach* L. Más bien se correlacionaría con el rol ecológico que cumple el hongo en la planta colonizada (Este hecho ya se podía inferir a partir de los resultados de la tabla 5 donde se observa que no todas las cepas de *Alternaria* aisladas de paraíso fueron productoras del antiviral).

Por otro lado, entre los diferentes aislamientos se obtuvieron patrones de corrida heterogéneos, lo cual indica que no todas las cepas de *Alternaria* producen compuestos similares en condiciones de cultivo de laboratorio.

El hallazgo de extractos de *Alternaria alternata* con

actividad antiviral independiente de la ya descrita para los extractos de hojas de *Melia azedarach* L resulta un aporte novedoso al ya existente espectro de moléculas de diversos orígenes con actividad biológica. Tal como lo define Prusoff (61), esta aproximación empírica a la temática antiviral ofrece ventajas ya que a través de la búsqueda intensiva de metabolitos activos, se llega a la caracterización de lo que él define como un "compuesto líder", en este caso la fracción purificada por cromatografía en capa delgada de M2003. Desde el punto de vista de su aplicabilidad, la caracterización química completa de este principio activo podría resultar un aporte significativo para su desarrollo adecuado dentro del marco industrial. Así, la determinación definitiva de la estructura del compuesto - permitiría la producción por síntesis orgánica de análogos moleculares, que estructuralmente resultarían inhibidores eficaces y de baja toxicidad frente a un amplio espectro de virus animales.


C.E. Coto.


ADRIANA H. DESCALZO

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andrei G.M. Caracterización y purificación de un factor antiviral presente en la planta superior *Melia azedarach* L. Determinación de su mecanismo de acción. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires (1988).
- 2.- Andrei G.M. , Coto C.E. , de Torres R.A. Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia azedarach* L. Revista Argentina de Microbiología 17: 187, (1985).
- 3.- Andrei G.M. , Coulombié F.C. , Courreges M.C. , de Torres R.A., Coto C.E. Meliacine , an antiviral compound from *Melia azedarach* L inhibits interferon production. J. of Interferon Research 10: 469, (1990).
- 4.- Andrei G.M. , Damonte E.B. , de Torres R.A. , Coto C.E. Induction of a refractory state to viral infection in mammalian cells by a plant inhibitor isolated from leaves of *Melia azedarach* L. Antiviral Research 9: 221, (1988).
- 5.- Andrei G.M. , Lampuri J. , Coto C.E. , de Torres R.A. An antiviral factor from *Melia azedarach* L prevents Tacaribe virus encephalitis in mice. Experientia 42: 843, (1986).
- 6.- Bailey L.H. The Standard Cyclopedia of Horticulture. Macmillan , Nueva York (1922).
- 7.- Ben-Porat T. , Jong-Ho J. , Kaplan A. Early function of genome of Herpesvirus.IV.Fate and translation of immediate-early viral RNA. Virology 59: 524, (1974).

- 8.- Ben-Porat T. , Rakusanova T. , Kaplan A. Early functions of the genome of Herpesvirus.II.Inhibition of the formation of cell specific polysomes. *Virology* 46: 890, (1971).
- 9.- Barloni M.D. Contribución al estudio de los endofitos fúngicos.Tesis Doctoral , Universidad de Buenos Aires , pp 117-126 (1989).
- 10.- Bessey E.A. Morphology and taxonomy of Funqi. Mapple Press Company , Nueva York , U.S.A. , pp 596-597 (1950).
- 11.- Bhakuni D.S. , Dhar M.L. , Dhar M.M. , Dhawan B.N. , Mehrotra B.N. Screening of Indian plants for biological activity:Part II. *Indian J. of Exp. Biol.* 7: 250, (1969).
- 12.- Burkill. A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula , Tomo V , pp. 1465-1469 (1966).
- 13.- Cabral D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*:dynamics of fungal populations. *Trans. Br. mycol. Soc.* 85: 501, (1985).
- 14.- Carral G. Fungal endophytes in stems and leaves from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2, (1988).
- 15.- Carral G.C. , Carral F.E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can. J. Bot.* 56: 3034, (1978).
- 16.- Clark I. , Gresser I. , Pfau C. , Moss J. , Woodrow D. Antibody to mouse α - β interferon abrogates Pichinde virus-induced liver lesions in suckling mice. *J. Virol.* 59: 728,

(1986).

- 17.- Claus J. , Andrei G.M. , Coto C.E. de Torres R.A. HSV-1 intraperitoneal infection of Balb/c mice:effect of treatment with green leave extracts. Libro de Resúmenes de la Segunda Conferencia Internacional sobre el Impacto de las enfermedades virales en los países latinoamericanos y la región del Caribe. Mar del Plata (1988).
- 18.- Clay K. Clavicipaceous endophyte of grasses:their potential as biocontrol agents. Mycol. Res. 92: 1, (1989).
- 19.- Clouse S. , Martensen A. , Gilchrist D. Rapid purification of host-specific pathotoxins from *Alternaria alternata* f. sp. *licopersici* by solid-phase adsorption on octadecylsilane. J. Chromatography 350: 255, (1985).
- 20.- Cooke R.E. , Rayner A. Ecology of saprotrophic fungi. Longman , London 414 (1984).
- 21.- Coulombié F.C. , Andrei G.M. , Laguens R.P. , de Torres R.A.,Coto C.E. Antiviral effect of a compound isolated from leaves of *Melia azedarach* L on Tacaribe infected mice. Phytotherapy Research , (en prensa)
- 22.- Coupland K. , Niehaus W. Stimulation of alternariol biosynthesis by zinc and manganese ions. Exp. Mycol. 11: 60, (1987).
- Courreges M.C. , Benencia F.B. , Coulombié F.C. , Coto C.E.,

- Massouh E.J. Extractos de *Melia azedarach L* con actividad antiviral y su efecto sobre el sistema inmune del ratón. Libro de Resúmenes del III Congreso Argentino de Virología , Santa Fe (1990).
- 24.- Courreges M.C. , Benencia F.B. , Coulombié F.C. , Coto C.E., Massouh E.J. Extractos de *Melia azedarach L* con actividad inmunomoduladora: efectos sobre la capacidad fagocítica de células peritoneales de ratón Libro de Resmenes de la XXXV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas , Mar del Plata (1990).
- 25.- Crueger W. , Crueger A. Biotechnology: a textbook of Industrial Microbiology. Thomas D. Brock Ed. , Science Tech. Inc. , U.S.A. , pp. 197-238 (1984).
- 26.- Davis C. , Camp B. , Read J. The vaso-active potential of halostachine an alkaloid of tall fescue (*Festuca arudinacea schreb*) in cattle. Vet. Hum. Toxicol. 25: 408, (1983).
- 27.- Descalzo A.M. , Coto C.E. Inhibición del virus de pseudorrabia (Suis Herpesvirus I) por un antiviral aislado de hojas de *Melia azedarach L*. Revista Argentina de Microbiología 21: 133, (1989).
- 28.- Dubois M. , Gilles J. , Hamilton P. , Rebers A. , Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry 28: 350, (1956).
- 29.- Ellis M.B. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew. Commonwealth Mycological Institute ,p 608 (1971). 30.-Faifer G. ,

- Bertoni M. Interactions between epiphytes and endophytes from the phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* III. *Nova Hedwigia* 47: 219, (1988).
- 31.- Fansworth N. , Akerele O. , Binzel A. , Soejarto D. , Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization* 63: 965, (1985).
- 32.- Fisher P. , Anson Avril E. Antibiotic activity of some endophytic fungi from Ericaceae plants. *Botanica Helvetica* 94: 249, (1984).
- 33.- Fisher P. , Anson Avril E. , Petrini D. Antibiotic activity of some endophytic fungi from *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. *Botanica Helvetica* 96: 37, (1986).
- 34.- Galenbeck S. , Sierankiewicz J. Microbial production of Tenuazonic acid analogues. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 3: 308, (1973).
- 35.- Gitterman C.O. Antitumor , cytotoxic and antibacterial activities of tenuazonic acid and congeneric tetramic acids. *J. Med. Chem.* 8: 483, (1965).
- 36.- Grogan R. , Kimble K. , Misaghi I. A stem canker disease caused by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 65: 880, (1975).
- 37.- Haqqlblom P. , Niehaus W. The effect of different wavelengths of light on polyketide metabolism in *Alternaria*

- alternata*. *Exp. Mycol.* 11: 150, (1987).
- 38.- Hoch H. , Staples R. , Whitehead B. , Comeau J. , Wolf E.
Signalling for growth orientation and cell differentiation
by surface topography in *Uromyces*. *Science* 235: 1659,
(1987).
- 39.- Hull R. , Lavelle J. Inhibition of cytopathogenic effect of
poliomyelitis viruses in tissue culture by antibiotic M-
8450. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 83: 787, (1953).
- 40.- Irvin J. Pokeweed antiviral protein. *Pharmacol. Ther.* 21:
371. (1983).
- 41.- Johnson M. , Siegel M. , Bush L. The endophyte of tall
fescue (*Festuca arundinacea* schreb). en *Trichotecenes and
other mycotoxins* , J. Lacey Ed. (1985).
- 42.- King D. , Schade J. *Alternaria* toxins and their importance
in food. *J. of Food Protection* 47: 886, (1984).
- 43.- Latch G. , Christensen M. Artificial infection of grasses
with endophytes. *Ann. Appl. Biol.* 107: 17, (1985).
- 44.- Leach C.M. Interaction of near-ultraviolet light and
temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*
Cercospora , *Fusarium* , *Helminthosporium* and *Stemphylium*.
Can. J. Bot. 45: 1999, (1967).
- 45.- Lebrun M. , Nicolas L. , Boutar M. , Gaudemer F. ,
Ranomenjanahary S. , Gaudemer A. Relationships between the

- structure and the phytotoxicity of the fungal toxin tenuazonic acid. *Phytochemistry* 27: 77, (1988).
- 46.- Lemos C. , Descalzo A. , Coto C.E. Actividad de extractos crudos y purificados de la cepa M2003 de *Alternaria alternata*. Libro de resúmenes del III Congreso Argentino de Virología , N 61 , Santa Fe (1990).
- 47.- Haqan N. , Cayley G. , Lacey J. Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1113, (1984).
- 48.- Maheshwari R. , Hussain M. , Gupta B. 6-MFA an antiviral agent from *Aspergillus ochraceus* ATCC-28706 influence of body weight and mineral oil administration on the antiviral activity in mice. *Acta Virol.* 21: 63, (1977).
- 49.- Haver A.M. Plant Fungal interactions: a plant physiologist's viewpoint. *Phytochemistry* 28: 311, (1989).
- 50.- McKenzie R. , Epan R. , Johnson D. Cyclosporine A inhibits Herpes Simplex Virus-induced cell fusion but not virus penetration into cells. *Virology* 159: 1, (1987).
- 51.- Miller F. , Rightsel W. , Sloan B. , Erhlich J. , French J., Baritz Q. Antiviral activity of tenuazonic acid. *Nature* 200: 1430, (1963).
- 52.- Hinter D. Possible biological control of *Lophodermium*

- editiosum*, en Current Research on Conifer Needle Diseases
, C.S. Millar Ed. ,pp. 67-74 (1981).
- 53.- Hara T. , Skoog F. A revised medium for rapid growth
and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*
15: 97, (1962).
- 54.- Nacify K. , Carver D. Cyclopin: A trypsin sensitive
constituent of *Penicillium cyclopinum* with antiviral
properties. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 113: 175, (1963).
- 55.- Oomra S. , Inamura N. , Kinotozawa K. , Otaguro K. , Lukacs
G. Faghih R. , Tolmann R. , Arinson B. , Smith J. The
structure of virustomycin A. *J. Antibiotics* 36: 1783,
(1983).
- 56.- Oomra S. , Shimizu H. , Iwai Y. , Hinotozawa K. , Otaguro
K. , Hashimoto H. , Nakagawa A. AM-2604 A , a new antiviral
antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *J.*
Antibiotics 35: 1632, (1982).
- 57.- Parodi. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardineria.*
(1983).
- 58.- Petrini O. , Carrol G. Endophytic fungi in foliage of some
Cupressaceae in Oregon. *Can. J. Bot.* 59: 629, (1981).
- 59.- Porter C.L. Concerning the characters of certain fungi as
exhibited by their growth in the presence of other fungi.
American J. Bot. 2: 168, (1924).

- 60.- Fouell H. , Culberston C. , McGuire J. , Hoehm M. , Barker L. Antibiotic and Chemotherapy 2: 432, (1952).
- 61.- Frusoff W.H. , Lai-Shun L. , August E. , Marongiu M.E. Development of antiviral agents for therapy of Aids. en Advances in Chemotherapy of Aids , Chapter I , Pergamon Press Inc. , Nueva York (1990).
- 62.- Baistrick H. , Stickings C. , Thomas R. Studies in the biochemistry of Micro-organisms.90.Alternariol and Alternariol monomethyl ether metabolic products of *Alternaria tenuis*. Biochem. J. 55: 421, (1953).
- 63.- Raj S. , Gupta B. , Rana N. Study of factors influencing yield and activity of 6-MFA an interferon inducing antiviral factor agent from mold fungus *Aspergillus ochraceus*. Indian J. Plant Pathol. 3: 267, (1985).
- 64.- Reed L. , Muench H. A simple method for estimating fifty percent end points. Ann. J. Hyg. 27: 493, (1938).
- 65.- Riddley D. Flora of the Malay Peninsula ,Volúmen I , p. 384 (1980).
- 66.- Rosset T. , Sankhala R. , Stickings C. , Taylor M. , Thomas R. Studies in the biochemistry of micro-organisms.103.Metabolites of *Alternaria tenuis* Auct. culture filtrate products. Biochem. J. 67: 390, (1957).
- 67.- Ruegger A. , Kuhn M. , Lichti H. , Loosli H. , Huguenin R. , Quiquerez CH. , von Wartburg A. Cyclosporine A , ein

- immunsuppressiv wirksamer Peptidmetabolit aus *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *Helvetica Chimica Acta* 59: 1075, (1976).
- 68.- Sachis V. , Scott P. , Farber J. Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from red kidney bean. *Mycopathology* 104: 157, (1988).
- 69.- Schade J. , King D. Analysis of the major *Alternaria* toxins. *J. Food Protection* 47: 978, (1984).
- 70.- Seitz L.M. *Alternaria* metabolites. en *Mycotoxins-Production , isolation , separation and purification*. Elsevier Science Publishers , Amsterdam , pp. 443-455 (1984).
- 71.- Seitz L. , Mohr H. Analysis of *Alternaria* metabolites by high-pressure liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 70: 224, (1976).
- 72.- Sharp J. , Mc Neil M. , Albersheim P. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive Hexa (β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *J. Biol. Chem.* 259: 11321, (1984).
- 73.- Shigeura H. , Gordon CH. The biologic activity of tenuazonic acid . *Biochemistry* 2: 1132, (1963).
- 74.- Shope R.E. An antiviral substance from *Penicillium*

tuniculosum:Effect upon infection in mice with swine influenza virus and columbia SK encephalomyelitis virus. J. Exp. Med. 97: 601, (1953).

75.- Shope R.E. An antiviral substance from *Penicillium tuniculosum*:II-Effect of helenin upon infection in mice with Senliki Forest virus. J. Exp. Med. 97: 627, (1953).

76.- Steyn P. , Rabie C. Characterization of magnesium and calcium tenuazoate from *Phoma sorghina*. Phytochemistry 15: 1977, (1976).

77.- Stinson E. Micotoxins: their biosynthesis in *Alternaria*. J. Food Protection 48: 80, (1985).

78.- Suzuki S. , Sano F. , Yuki H. Studies on antiviral agents.IV.Biological activity of tenuazonic acid derivatives. Chem. Farm. Bull. 15: 1120, (1967).

79.- Takatsuki A. , Suzuki S. , Ando K. , Tamura G. , Arima K. Studies on antiviral and antitumor antibiotics.Part XII.Effect of geodin on virus multiplication. Agr. Biol. Chem. 33: 1119, (1969).

80.- Templeton G.E. *Alternaria* toxins related to pathogenesis in plants. en Microbial toxins , Volúmen VIII:Fungal Toxins, pp. 169-192 , Academic Press , Nueva York (1972).

81.- Veno T. , Nakashima T. , Hayashi Y. , Fukami H. Isolation and structure of AN-toxin.III.A host specific phytotoxic metabolite produced by *Alternaria mali*. Agr. Biol. Chem.

- 39: 2081, (1975).
- 82.- Veno T. , Nakashima T. , Hayashi Y. , Fukami H. Structures of AH-toxins I and II , host specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria mali*. Agr. Biol. Chem. 39: 1115, (1975).
- 83.- Visconti A. , Logrieco A. , Bottalico A. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives their production and possible transfer into oil. Food additives and contaminants 3: 323, (1986).
- 84.- Visconti A. , Logrieco A. , Vurro M. , Bottalico A. Ienguazonic acid in black mold tomatoes: occurrence , production by associated *Alternaria* species and phytotoxic properties. Phytopat. Medit. 26: 125, (1987).
- 85.- Wachsman M.B. , Andrei G.M. , Daelli M. , Coto C.E. Actividad antiviral asociada a una fracción polipeptídica obtenida de extractos de *Melia azedarach* L. Acta Farmacéutica Bonaerense 3: 27, (1984).
- 86.- Wachsman M.B. , Damonte E.B. , Coto C.E. Antiviral effects of *Melia azedarach* L leaves extracts on Sindbis virus-infected cells. Antiviral Research 8: 1, (1987).
- 87.- Wachsman M.B. , Martino V. , Coto C.E. Search for antiviral activity in higher plant extracts. Fitoterapia 54: 424, (1983).

- 88.- Nachsman M.B. , Martino V. , Gutkind G. , Coussio J. , Coto C.H. , de Torres R.A. Antiviral activities of a *Nelia acedarach* plant extract. *Fitoterapia* 53: 167, (1982).
- 89.- Mei C. , Swartz D. Growth and production of mycotoxins by *Alternaria alternata* in synthetic , semisynthetic and rice media. *J. Food Protection* 48: 306, (1985).
- 90.- Mei C. , Swartz D. , Cornell J. Effects on culture media , exposure time and temperature on near-ultraviolet-induced sporulation of *Alternaria alternata*. *J. Food Protection* 48: 316, (1985).
- 91.- West C. , Laekor E. , Oosterhuis D. , Robbins R. Association of endophytic fungus and nematode resistance in tall fescue. *Arkansas Farm. Research* 37: 1, (1987).
- 92.- Witsenboer H. , van Schaik C. , Bino R. , Loffler H. Hijkamp J. , Hille J. Effects of *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins at different levels of tomato plant cell development. *Plant science* 56: 253, (1988).
- 93.- Yuki H. , Tohira Y. , Aoki B. , Kano T. , Takama S. , Yamasaki T. Studies on antiviral agents.111.Synthesis of tenuazonic acid derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 15: 1107, (1967).
- 94.- Zocher R. , Hadry N. , Peeters H. , Weinkauf H. Biosynthesis of cyclosporine A. *Phytochemistry* 23: 349, (1984).

ERRATA:

Page D. , Bills G. , Chamuris G. , Rossman A. Fungi on
plants and plants products in the United States. pp.

The American phytopathological Society ,APS Press, St.
Paul, Minnesota , USA (1989).