



METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS CHONDROSTEREUM PURPUREUM Y NECTRIA GALLIGENA : ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y HERBICIDA

**MARGARITA ISABEL GUTIERREZ CABRERA
DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO DE PRODUCTOS NATURALES**

RESUMEN

Seis aislados de *Nectria galligena* y siete de *Chondrostereum purpureum* se obtuvieron a partir de muestras de madera infectadas por estos microorganismos, recolectados en huertos frutales de las Regiones VI y VII de Chile. Los aislados se cultivaron en tres medios líquidos diferentes: papa-glucosa (PG), extracto de malta-glucosa-peptona (MGP) y levadura-extracto de malta-glucosa (YMG). Una vez consumida la fuente carbonada del medio, los cultivos se extrajeron con acetato de etilo. Los extraíbles se evaluaron como antimicrobianos y herbicidas. Los dos aislados de cada hongo con mejor rendimiento y bioactividad, se cultivaron a escala preparativa para aislar e identificar los metabolitos secundarios bioactivos. Los extractos seleccionados fueron los aislados "El Olivar" y "Requinoa" de *N. galligena* y "Damasco" y "manzano 2" de *C. purpureum*. Estos hongos fueron cultivados a escala preparativa en los medios PG y MGP. De estos microorganismos se aislaron 14 metabolitos secundarios los cuales fueron caracterizados por métodos espectroscópicos. A partir de los cultivos de *N. galligena* se aislaron coletorina B, coletoclorina B, ilicicolina C, ilicicolina E, ilicicolina F y α,β -dehidrocurvularina, informadas por primera vez a partir de este hongo. De *C. purpureum* se obtuvieron el sesquiterpeno ácido condrosterpurico, que corresponde a un nuevo esqueleto químico, los sesquiterpenos sterepolido, dehidrosterepolido, 8-hidroxidihidrosterpolido (descrito por primera vez), echinolactona A y los fenólicos halogenados (3-cloro-4-metoxifenil)metanol, 3-cloro-4-metoxibenzaldehído y (2,4-dicloro-3-metoxifenil)metanol (descrito por primera vez). De estos, solo se había informado con anterioridad el aislamiento de

sterepolido y del dehidrosterepolido a partir de *C. purpureum*. Todos los metabolitos aislados fueron evaluados como agentes antimicrobianos sobre *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium notatum* y *Mucor miehei*. El efecto fitotxico de los metabolitos se evaluo sobre semillas de *Lactuca sativa* y *Panicum millaceum*. Se determino la actividad inhibitoria de los metabolitos sobre las enzimas acetilcolinesterasa, β -Dglucosidasa y β -D-glucuronidasa. La citotoxicidad de los metabolitos fue determinada sobre una linea celular permanente derivada de fibroblastos de pulmon humano. Todos los compuestos fueron inactivos como inhibidores de la germinacion de esporas de *B. cinerea*, con IC50 superior a 250 μ g/ml. Los compuestos aislados de *C. purpureum* fueron activos inhibidores de la germinacion de esporas de *A. alternata* con valores de IC50 de 15,6 y 31,3 μ g/ml, similares a los del fungicida Myclobutanil (IC50 de 31,3 μ g/ml) e inferiores a Iprodione (IC50 de 3,9 μ g/ml). En estas condiciones experimentales, el nuevo sesquiterpeno acido condrosterpurico presento una IC50 de 125 μ g/ml. La actividad antibacteriana sobre *E. carotovora* fue debil para la mayoria de los metabolitos, con valores de IC50 superiores a 250 μ g/ml, excepto 8-hidroxi-dihidrosterpolido y sterepolido, que presentaron IC50 de 112 y 125 μ g/ml, respectivamente, similares a los de penicilina G (IC50 de 122,7 μ g/ml). El efecto de los metabolitos como antifungicos sobre *P. notatum* fue moderado a debil. El mejor efecto sobre *P. variotii* se observo para ilicicolina F, ilicicolinaC, echinolactona A y dihidrosterepolido, con un diametro de inhibicion de 18 mm a 50 μ g/disco, inferior al del control Myclobutanil, con un halo de inhibicion de 30 mm a la misma dosis por disco de antibiograma. Los metabolitos aislados de *N. galligena* mostraron moderada actividad inhibidora de las enzimas acetilcolinesterasa y β -D-glucuronidasa. Entre los metabolitos aislados, la mayor actividad fitotxica fue observada para α,β - dehidrocurvularina, inhibiendo significativamente la longitud de la radicula de *L. sativa*, asi como la longitud del epicotilo de plantulas de lechuga y mijo. Este producto presento la mayor citotoxicidad con IC50 inferior a 40 μ M, mientras que todos los compuestos aislados de *C. purpureum* presentaron IC50 superior a 1000 μ M, siendo los menos

toxicos. En este estudio se informa por primera vez la produccion de metabolitos secundarios de *N. galligena* en medio liquido y su bioactividad, asi como es el primer reporte de metabolitos secundarios generados en medio liquido de aislados locales de *C. purpureum*.

ABSTRACT

Six isolated of *Nectria galligena* and seven of *Chondrostereum purpureum* were obtained from wood infected samples collected in fruit orchards from the VI and VII Regions of Chile. The microorganisms were grown in three different liquid media: potato-glucose (PG), malt extract-glucose-peptone (MGP) and yeast extract-malt extract-glucose (YMG). Once the carbon source of the medium was consumed, the cultures were extracted with ethyl acetate and the extracts assessed for antimicrobial and herbicidal effect. Two isolated of each fungus with higher extraction yields and bioactivity were grown at a preparative scale to isolate and identify their active secondary metabolites. The selected extract were "El Olivar" and "Requinoa" from *N. galligena* and "apricot" and "apple 2" of *C. purpureum*. Preparative culture of the fungus was carried out in PG and MGP media. Some 14 secondary metabolites were isolated from both fungi and characterized by spectroscopic means. Colletorin B, colletochlorine B, ilicicolin C, ilicicolin E, ilicicolin F and α,β -dehydrocurvularin were isolated from the *N. galligena* cultures, and are reported for the first time for this fungus. From *C. purpureum* the new sesquiterpene skeleton named chondrosterpuric acid was obtained as well as the sesquiterpenes sterepolide, dehydrosterepolide, 8-hydroxydihydrosterepolide (described for the first time), echinolactone A and the halogenated phenolics (3-chloro-4-methoxyphenyl)methanol, 3-chloro-4-methoxybenzaldehyde and (2,4-dichloro-3-methoxyphenyl)methanol (described for the first time). Only sterepolide and dehydrosterepolide were previously reported from *C. purpureum*. All the isolated metabolites were assessed as antimicrobial agents against *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium notatum* and *Mucor miehei*. The phytotoxic activity of the compounds was evaluated on the germination, epicotyl and hypocotyl growth of *Lactuca sativa* and *Panicum millaceum* seeds. The compound was evaluated as inhibitory of enzymes acetylcholinesterase, β -D-glucosidase and β -D-glucuronidase. The cytotoxicity

of the metabolites was determined on a permanent human lung fibroblast cell line. All the compounds were inactive as *B. cinerea* spore germination inhibitors, with $IC_{50} > 250 \mu\text{g/ml}$. The compounds obtained from *C. purpureum* inhibited germination of *A. alternata* spores with IC_{50} in the range 15.6-31.3 $\mu\text{g/ml}$, similar to that of the commercial fungicide Mycobutanil (IC_{50} : 31,3 $\mu\text{g/ml}$) and lower than that of Iprodione (IC_{50} : 3.9 $\mu\text{g/ml}$). In our experimental conditions, the new sesquiterpene chondrosterpuric acid presented an IC_{50} of 125 $\mu\text{g/ml}$. The antibacterial activity against *E. carotovora* was weak for most of the metabolites, with IC_{50} values $> 250 \mu\text{g/ml}$, except 8-hydroxydihydrosterepolide and sterepolide, with IC_{50} of 112 and 125 $\mu\text{g/ml}$, respectively, similar to that found for penicillin G (IC_{50} : 122.7 $\mu\text{g/ml}$). The antifungal effect of the metabolites against *P. notatum* was moderate to weak. The best effect against *P. varioti* was found for ilicicolin F, ilicicolin C, echinolactone A and dihydrosterepolide, with a growth inhibition diameter of 18 mm at 50 $\mu\text{g/disk}$, lower than that of Mycobutanil (inhibition diameter: 30 mm at the same dose). The metabolites isolated from *N. galligena* showed moderate inhibitory activity toward enzymes acetylcholinesterase and β -Dglucuronidase. From the isolated compounds, highest phytotoxic effect was observed for α,β -dehydrocurvularin, which significantly inhibiting radicle growth of *L. sativa*, as well as epicotyl growth of lettuce and millet seedlings. This compound presented the highest cytotoxicity towards human lung fibroblasts, with an $IC_{50} < 40 \mu\text{M}$. All the compounds obtained from *C. purpureum* presented $IC_{50} > 1000 \mu\text{M}$. This study present for the first time the isolation and metabolite production by *N. galligena* in liquid media and the bioactivity of the obtained compounds, being also the first report on the secondary metabolites from local isolates of *C. purpureum*.