ARILSELENOFOSFATOS CON ACCIÓN ANTIFÚNGICA SELECTIVA CONTRA *Phymatotrichopsis omnivora*

SELECTIVE ANTIFUNGAL ACTION OF ARYLSELENEPHOSPHATES AGAINST *Phymatotrichopsis omnivora*

Irasema Vargas-Arispuro*, Adriana Contreras-Valenzuela, Javier Hernández-Martínez y Miguel Ángel Martínez-Téllez

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carr. a La Victoria Km. 0.6, Ejido La Victoria. Apdo. Postal 1735. 83000, Hermosillo, Son. México. Tel.: 01 (662) 289-2400, Fax: 01 (662) 280-0058. Correo electrónico: iris@cascabel.ciad.mx
** Autor para correspondencia*

RESUMEN

En la búsqueda de agentes antifúngicos con un modo selectivo de acción contra *Phymatotrichopsis omnivora*, se evaluó una serie de compuestos arilselenofosfatos cíclicos obtenidos mediante síntesis orgánica. *Ph. omnivora* es el agente causal de la enfermedad conocida como 'pudrición texana'. La propagación del hongo en el suelo se debe al rápido crecimiento de los cordones miceliales entre las raíces de las plantas. Los compuestos arilselenofosfatos inhibieron entre 10 y 100 % el crecimiento de cordones miceliales del hongo. Los arilselenofosfatos evaluados son análogos a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), compuesto requerido para la activación del proceso de fosforilación que degrada el glucógeno, que el hongo utiliza como fuente de energía para su germinación y crecimiento inicial.

Palabras clave: *Phymatotrichopsis omnivora*, arilselenofosfatos, compuestos antifúngicos, compuestos de síntesis, pudrición texana.

SUMMARY

In the search for antifungal agents with a selective mode of action, a series of synthetic cyclic arylselenephosphates compounds were evaluated against *Phymatotrichopsis omnivora*, the causal agent of texas root rot. Spreading of fungus is due to the rapid growth of mycelial strands through the soil from plant to plant. Strands formation was inhibited in a range from 10 to 100 % by arylselenephosphates compounds. These compounds are analogues to cyclic adenosine monophosphate (AMPc), required to activate the phosphorylation process in which glycogen is catabolized and used by the fungus as an energy source during sclerotial germination.

Index words: *Phymatotrichopsis omnivora*, arylselenephosphates, antifungal activity, synthesis, texas root rot.

Recibido: 4 de Mayo del 2005.
Aceptado: 26 de Enero del 2006.

INTRODUCCIÓN

Entre los patógenos radiculares que afectan la productividad del suelo se encuentra *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar), agente causal de la pudrición de raíz o pudrición texana, enfermedad de importancia económica, tanto por sus efectos en la producción como por su amplia distribución en regiones agrícolas de Sonora, Chihuahua, Coahuila y Durango (Samaniego-Gaxiola y Herrera-Pérez, 2003). *Ph. omnivora* prolifera rápidamente en suelos calcáreos del norte de México y del suroeste de Estados Unidos, donde infesta las raíces de más de 2300 especies de plantas dicotiledóneas (Alderman y Hine, 1982; Watson *et al*., 2000). La pudrición texana es un factor limitante en algunas regiones de México, en cultivos de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), nogal (*Carya illinoensis* K.) y frutales (Olsen y Jeffrey, 1999).

El control de *Ph. omnivora* con fungicidas y fumigantes del suelo ha sido insatisfactorio (Damicone *et al.,* 2001). La práctica más extendida para reducir la ocurrencia y severidad de la enfermedad es plantar cultivos resistentes al hongo en áreas infestadas o evitar la siembra de cultivos susceptibles en esos terrenos (Texas A&M, 1999). Esta última práctica ha conducido a la incorporación de nuevas áreas de siembra para los cultivos susceptibles a *Ph. omnivora,* con el abandono total o parcial de las áreas afectadas (Gutiérrez, Com. personal[1]; Texas A&M, 1999).

Ph. omnivora es capaz de sobrevivir en el suelo por un largo tiempo mediante estructuras de invernación llamadas esclerocios (Drake, 1990). Estudios de patogenicidad han demostrado que el esclerocio y los cordones miceliales que surgen de éste, son el inicio de la infestación de las raíces vegetales (Alderman y Hine, 1982; Watson *et al*., 2000). El esclerocio acumula glucógeno el cual es utilizado como fuente de energía durante el proceso de germinación, crecimiento y sobrevivencia del hongo en condiciones adversas (Lyda, 1978). Durante la germinación del esclerocio y la emergencia de los cordones miceliales, *Ph. omnivora* produce glicógeno sintasa, glucógeno fosforilasa y AMPc fosfodiesterasa, enzimas involucradas en la regulación de niveles de glucógeno, lo que significa que el hongo utiliza el glucógeno como su fuente de energía (Guanasekan, 1983; Sangan y Guanasekan, 1981).

En la búsqueda de alternativas al control de este patógeno del suelo, se evaluó el efecto de arilselenofosfatos

[1]Gutiérrez M (1976) Evaluación de nuevas técnicas en la aplicación de fungicidas sistémicos y comparación con los utilizados hasta la fecha en el control de pudrición texana en manzano. Informe de Fitopatología del Campo Experimental de Zacatecas. FITO-76. CINE-ZAC. pp:2-3.

cíclicos obtenidos mediante síntesis orgánica, contra el crecimiento de cordones miceliales de *Ph. omnivora*. Los compuestos aquí evaluados son análogos al monofosfato cíclicos de adenosina (AMPc), que tiene una importante función en el metabolismo del glucógeno al provocar la activación de la fosforilasa del glucógeno (Lehninger, 1986); si los análogos del AMPc ocupan su lugar en el metabolismo del glucógeno, impedirán la continuación del proceso metabólico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos arilselenofosfatos. Los compuestos se sintetizaron de acuerdo con el método descrito por Gordillo *et al*. (1995). Para obtener el 2-ariloxi-2-seleno-1,3,2λ^5-dioxafosforinanos, en un matraz de dos bocas de 500 mL, provisto de agitador magnético y tapón, se adicionaron 250 mL de cloruro de metileno seco vía cánula, y 28 mL de PCl_3 bajo corriente de nitrógeno. El matraz de reacción se colocó en un baño de hielo húmedo, y gota a gota se le adicionaron 30 mL de la mezcla de 2,4-pentanodiol, se agitó hasta alcanzar la temperatura ambiente. El cloruro de metileno se removió en un rotavapor a 45 °C bajo presión reducida. El espectro de RMN ^{31}P del crudo de reacción, permitió determinar la proporción de los correspondientes fosfocloriditos, 80 % del compuesto 1-*ax-cis* con ^{31}P δ 149.1 ppm (s) y 10 % del 1-*ax-trans* con un ^{31}P δ 150.8 ppm (s). Una vez obtenido el 2-ariloxi-2-seleno-1,3,2λ^5-dioxafosforinanos, se hizo reaccionar con el p-X-fenol en presencia de trietilamina, y dio por resultado el *ec*-2-*p*-X-fenoxi-1,3,2λ^3 dioxafosforinano. Posteriormente se hizo reaccionar con selenio metálico, y resultó el anillo dioxafosforinano. Las estructuras de los 11 compuestos arilselenofosfatos que fueron evaluados en su capacidad para inhibir el crecimiento de *Ph. omnivora,* se muestran en la Figura 1.

Patógeno. Los cordones miceliales utilizados se obtuvieron de raíces de plantas con síntomas de pudrición texana. Los cordones desinfectados con hipoclorito de sodio al 10 % durante 15 min, se colocaron sobre papa-dextrosa-agar (PDA) en cajas de Petri y se incubaron a 28 °C para la producción del micelio (Corrales-Maldonado, Com. personal)[2].

Evaluación antifúngica. Se realizó de acuerdo con la metodología descrita para fitopatógenos (Vargas-Arispuro *et al.,* 1999), que consiste en incluir en el medio de cultivo (PDA), una concentración conocida del compuesto a evaluar. Los cordones miceliales se inocularon en cajas Petri que contenían PDA y 200 μg mL^{-1} del compuesto a evaluar, y se incubaron a 28 ± 1 °C hasta que el crecimiento del micelio de la caja testigo (PDA sin compuesto) alcanzó el tamaño de la placa. El diámetro del crecimiento del micelio se midió diariamente, con un vernier. Se hicieron tres repeticiones para cada evaluación, y cada repetición constó de tres cajas por evaluación. El experimento se repitió cuatro veces.

Análisis estadístico. Se utilizó el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System (NCSS) (Hintze, 2001). Para analizar el efecto de los tratamientos en el crecimiento de cordones miceliales se realizó un análisis de varianza y se aplicó la prueba de comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Los valores de inhibición se presentan en porcentaje con respecto al crecimiento micelial del testigo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los arilselenofosfatos utilizados en este estudio contienen en su estructura un anillo dioxafosforinano, similar a la del AMP cíclico (AMPc). Este último es uno de los metabolitos que más ha interesado a los químicos debido a su participación en procesos biológicos, lo que ha conducido a la síntesis de una serie de análogos de este compuesto, los cuales han mostrado actividad insecticida y antiviral (Verweij *et al*., 2002).

Los resultados de la evaluación antifúngica de los once compuestos arilselenofosfatos evaluados contra *Ph. omnivoara* mostraron que todos los compuestos disminuyeron el crecimiento de los cordones miceliales del hongo (Cuadro 1). Destaca el efecto antifúngico de los compuestos I (-F), III (-H), VI (-Cl) y IX (-NO_2), que a una concentración de200 μg mL^{-1} inhibieron completamente el crecimiento de los cordones miceliales del hongo. Los compuestos II (-CH_3), V (-Br) y XI (-I) redujeron en 70 % el crecimiento de los cordones miceliales, con respecto al testigo. Los compuestos que mostraron menor efecto inhibitorio fueron VII (-C_6H_5) y VIII (-$C(CH_3))_3$, con 10 y 12 %, respectivamente.

Hasta el momento de esta publicación no se encontraron reportes que muestren haber utilizado compuestos arilselenofosfatos cíclicos contra hongos fitopatógenos; sin embargo, se ha demostrado que las estructuras químicas que contienen arilselenofosfatos cíclicos presentan diferentes actividades biológicas de interés clínico (Verweij *et al.,* 2002*)*. Entre estos compuestos se encuentran los monofosfatos cíclicos de adenosina (AMPc) o guanosina (GMPc),

[2]Corrales-Maldonado C G (2004) Control *in vitro* de *Phymatotrichopsis omnivora* por compuestos azufrados aislados de plantas del género *Brassica*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora. 60 p.

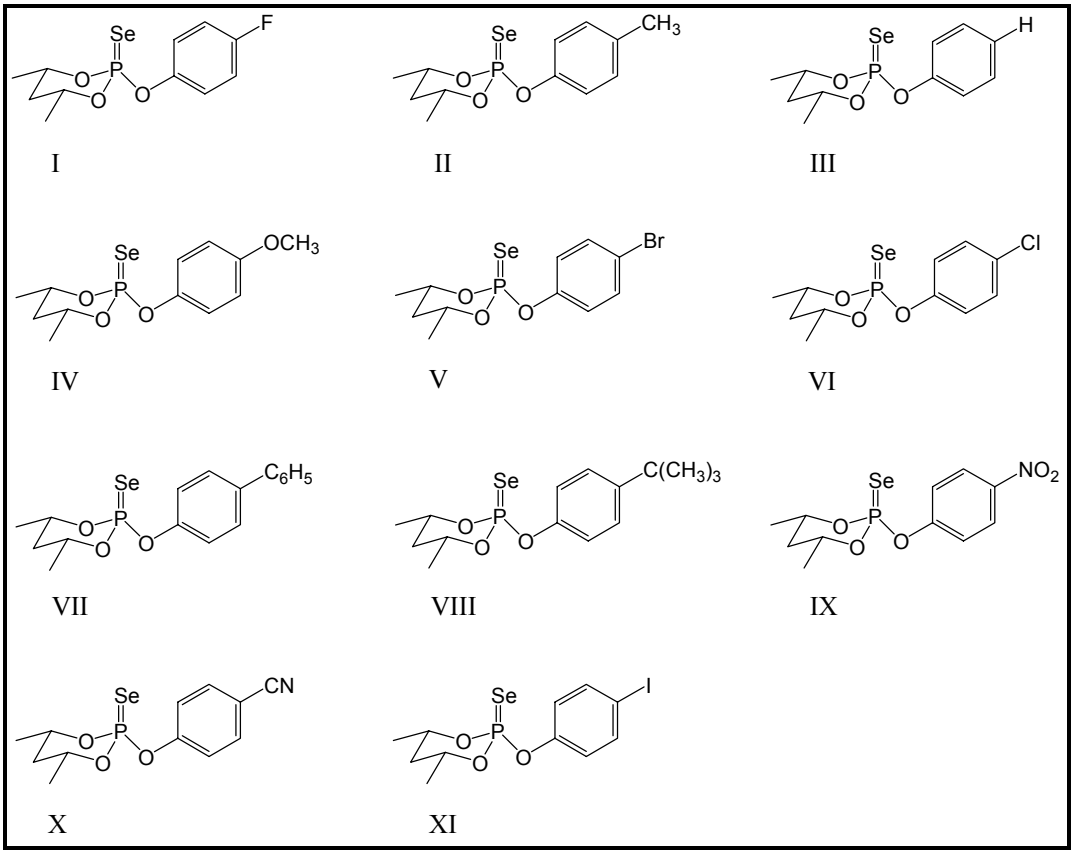


Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos arilselenofosfatos cíclicos evaluados para medir su efecto sobre el crecimiento de cordones miceliales de Phymatotrichopsis omnivora. ***(I)*** *2-(Fluorofenoxi)-2-seleno4,-6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(II)*** *2-(Metilfenoxi)-2-seleno-4,-6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(III)*** *2-(Fenoxi)2-seleno4,6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(IV)*** *2-(Metoxifenoxi) 2-seleno-4,6-dimetil 1,3,2-dioxafosforinano;* ***(V)*** *2-(Bromofenoxi)-2-seleno-4,6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(VI)*** *2-(Clorofenoxi)-2-seleno-4,6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(VII)*** *2-(Fenilfenoxi)-2-seleno-4,-6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(VIII)*** *2-(Butilfenoxi)-2-seleno-4,6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(IX)*** *2-(Nitrofenoxi)-2-seleno-4,6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(X)*** *2-(Cianofenoxi)-2-seleno-4,-6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano;* ***(XI)*** *2-(-Iodofenoxi)-2-seleno-4,-6-dimetil-1,3,2-dioxafosforinano.*

que tienen un papel central en la regulación del metabolismo celular, además de actuar como mensajeros intracelulares. El AMPc tiene una importante función en el metabolismo del glucógeno. El esclerocio de *Ph. omnivora* acumula 37 % de su peso seco en forma de glucógeno. El glucógeno almacenado y degradado a glucosa, por el proceso de fosforilación, es utilizado como una fuente de energía durante la germinación del esclerocio (Lyda, 1978).

Se ha demostrado que en sus primeras etapas de desarrollo, *Ph. omnivora* produce glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa y AMPc fosfodiesterasa, de los cuales glucógeno fosforilasa es la enzima con mayor actividad (Sambandam y Guanasekan, 1987). La regulación del metabolismo del glucógeno por las formas activa e inactiva del glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa, a través del proceso de fosforilación, ha sido bien establecida para algunos hongos y levaduras (Téllez-Inon y Torres, 1970; Uno e Ishikawa, 1976; Drissen y Becker, 1983; Pholing *et al.,* 1983). Otra enzima involucrada en el metabolismo del glucógeno es el AMPc fosfodiesterasa, que en *Ph. omnivora* presenta su máxima actividad entre los 21 y 28 d de crecimiento; la presencia de esta actividad enzimática sugiere la existencia de proteínas cinasas dependientes de AMPc en *Ph. omnivora*, la cual puede multifosforilar y activar la fosforilasa cinasa (Drissen y Becker, 1983; Chan y Graves, 1984).

En este estudio la inhibición del crecimiento de *Ph. omnivora* por efecto de arilselenofosfatos cíclicos puede deberse a que estos compuestos, análogos del AMPc, ocuparon el sitio activo del AMPc en la proteína cinasa e inhibieron su actividad. Este suceso interrumpe la cascada enzimática, reduce o incluso elimina el proceso de degradación de glucógeno, al impedir que la glucosa esté disponible o se encuentre en un nivel insuficiente para que el

hongo la utilice como energía para iniciar el proceso de germinación.

Cuadro 1. Efecto antifúngico de compuestos arilselenofosfatos cíclicos, evaluados a 200 μg mL^{-1} contra el crecimiento de cordones miceliales de Phymatotrichopsis omnivora*, con base en la inhibición del crecimiento del fitopatógeno en placa (PDA).*

Compuesto	Crecimiento micelial (cm)	Inhibición del crecimiento (%)
I (-F)	0.0 e	100
II (-CH_3)	1.5 d	70
III (-H)	0.0 e	100
IV (-OCH_3)	2.5 c	50
V (-Br)	1.5 d	70
VI (-Cl)	0.0 e	100
VII (-C_6H_5)	4.5 b	10
VIII (-$C(CH_3)_3$)	4.3 b	12
IX (-NO_2)	0.0 e	100
X (-CN)	2.5 c	50
XI (-I)	1.5 d	70
TESTIGO	5.0 a	0

* Letras diferentes representan diferencia significativa (Tukey, 0.05) entre tratamientos (n = 3).

La utilización de compuestos que afectan al sistema que regula los niveles en el metabolismo del glucógeno, permitirá desarrollar estrategias para un control efectivo y selectivo del patógeno y eventualmente lograr el control en los suelos agrícolas en los cuales se ha establecido. En este trabajo se encontró que compuestos arilselenofosfatos cíclicos, que poseen estructuras diferentes a las de los antifúngicos hasta ahora utilizados, inhiben el crecimiento *in vitro* de *Ph. omnivora,* ya que cuatro de los once compuestos aquí evaluados detuvieron por completo el crecimiento de cordones miceliales del hongo.

Es el primer reporte de evaluación de compuestos arilselenofosfatos cíclicos contra un hongo fitopatógeno.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Elisa Valenzuela Soto, Investigadora del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por su acertada aportación a la discusión de los resultados de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Alderman S C, R B Hine (1982) Vertical distribution in soil and induction of disease by strands of *Phymatotrichum omnivorum.* Ecol. Epidemiol. 72:409-412.

Chan, K F, D J Graves (1984) Molecular properties of phosphorylase kinase. *In*: Calcium and Cell function. W Y Cheung (ed). Academic Press, NY. pp:7-31.

Damicone J P, P W Pratt, K E Conway (2001) Phymatotrichum Root Rot. Oklahoma Cooperative Extensión Service Bull. OSU Extension Facts. F-7621, 1:1-4.

Drake C R (1990) Phymatotrichum Root Rot. *In:* Compendium of Apple and Pear Disease. APS Press. The American Phytopathological Society. 125 p.

Drissen R W, J U Becker (1983) Regulation of yeast phosphorylase by phosphorylase kinase. FEBS Lett. 13:83-36.

Gordillo B, C Garduño, G Guadarrama, J Hernández (1995) Synthesis and conformational analysis of six-membered cyclic phenyl phosphates. J. Org. Chem. 60:5180-5185.

Guanasekan M (1983) Physiological studies on *Phymatotrichum omnivorum* cAMP phosphodiesterase. FEBS Lett. 13:83-86.

Hintze J (2001) Number Cruncher Statistical System. Statistical software versión 6.0. Kaysville, Utah.

Lehninger A L (1986) Hormonas. *In*: Principles of Biochemistry. Ed. Omega. Barcelona, España. pp:731-735.

Lyda S D (1978) Ecology of *Phymatotrichopsis omnivorum*. Annu. Rev. Phytophatol. 16:193-209.

Olsen M, C Jeffrey (1999) Disease and Production Problems of Cotton in Arizona. Plant Disease Publications. Cooperative Extension, College of Agriculture & Life Sciences, The University of Arizona. Az Press. 1124 p.

Pholing G, R W Drissen, J W Becker (1983) Characterization of phosphorylase kinase activities in yeast. Biochem. Biophys. Res. Comm. 114: 331-338.

Samaniego-Gaxiola J, T Herrera-Pérez (2003) Producción de nuez en nogales [(*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] atacados por *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. Rev. Mex. Fitopatol. 21:323-330.

Sambandam T, M Guanasekan (1987) Purification and properties of phosphorylase from *Phymatotrichum omnivorum*. Arch. Biochem. Biophys. 254:579-585.

Sangan P, M Guanasekan (1981) Purification and properties of glycogen synthase from *Phymatotrichum omnivorum*. Mycologia 83(5):669-673.

Téllez-Inon M T, H N Torres (1970) Interconvertible forms of glycogen phosphorylase in *Neurospora crassa*. Proc. Nat. Acad. Sci. 66:459-463.

Texas A&M (1999) Texas Plant Disease Handbook. Fruit Crops. http://plantpathology.tamu.edu/Texlab/cfiles/cotton (mayo, 2004).

Uno I, T Ishikawa (1976) Effect of cyclic AMP on glycogen phosphorylase in *Caprinus macrorhizus*. Biochem. Biophys. Acta 452:112-120.

Vargas-Arispuro I, I Sanz, P Moya, E PrimoYúfera (1999) Antimicrobial compounds in the non-volatile fraction of expressed orange essential oil. J. Food Protect. 62(8):929-932.

Verweij P, D Te Dorsthorst, A Rijs, H De Vries-Hospers, J Meis (2002) Nationwide survey of *in vitro* activities of Itracinazole and Voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. J. Clinical Microbiol. 40(7): 2648-2650.

Watson W T, C M Kenerley, D N Appel (2000) Visual and infrared assessment of root colonization of apple trees by *Phymatotrichum omnivorum.* Plant Dis. 84:539-543.