

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evaluación de la actividad herbicida sobre la mora invasiva  
(*Rubus niveus*) usando metabolitos fúngicos aislados de San  
Cristobal-Galápagos**

**María Clara Yépez del Pozo Tobar**

**Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 14 de mayo de 2021

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Evaluación de la actividad herbicida sobre la mora invasiva (*Rubus niveus*)  
usando metabolitos fúngicos aislados de San Cristobal-Galápagos**

**María Clara Yépez del Pozo Tobar**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Antonio León, Ph.D**

Quito, 14 de mayo de 2021

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: María Clara Yépez del Pozo Tobar

Código: 00137414

Cédula de identidad: 1720896008

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

*Rubus niveus* (mora silvestre), es una planta invasora que se encuentra distribuida en las Islas Galápagos en San Cristóbal, Santa Cruz, Isabela, Santiago y Floreana. El principal problema de esta especie invasora es que sus semillas permanecen viables hasta por 10 años y puede reproducirse asexualmente como brotes. La introducción de *R. niveus* a Galápagos ha desplazado la flora nativa y ha amenazado a muchas comunidades nativas. El manejo de esta planta invasora se ha realizado mediante control mecánico y químico, no ha sido efectivo, por tanto, el control biológico podría ser la solución debido a que los hongos pueden producir metabolitos secundarios activos que pueden usarse como herbicidas. El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad bioherbicida sobre *R. niveus* a partir de los metabolitos fúngicos de los hongos aislados de *R. niveus*. Se evaluó la actividad bioherbicida a través de bioensayos de daño foliar usando los metabolitos fúngicos de 32 hongos de distinta fenología, metabolitos obtenidos por fermentación en medio líquido. Se encontró que los metabolitos producidos por *Lasidiplodia theobromae* y *Phanerochaete chrysosporium* causan una lesión necrótica en *R. niveus*. Estos resultados indican que estos hongos aislados tienen el potencial como agente de control biológico para *R. niveus*. En estudios posteriores, se debe investigar la identificación química de los metabolitos responsables de la actividad herbicida.

**Palabras clave:** *Rubus niveus*, metabolitos, control biológico, fermentación en medio líquido, herbicida, punción foliar, daño foliar, Galápagos.

## ABSTRACT

In the Galapagos islands, *Rubus niveus* (wild raspberry) is an invasive plant distributed along San Cristobal, Santa Cruz, Isabella, Santiago, and Floreana. The principal problem with this species is that seeds remain viable for up to 10 years and can be spread asexually as suckers. The introduction of *R. niveus* to the Galapagos has displaced native flora and threatened many native communities. The management of this invasive plant has been carried out by manual and chemical control but is ineffective. Thus, biological control could be the solution. The objective of the research was to evaluate the bioherbicidal activity of the fungal metabolites of the fungi isolated from *R. niveus*. The bioherbicidal activity of the fungal metabolites obtained by submerged fermentation of 32 isolates of different phenology were evaluated through foliar damage assays. The metabolites produced by *Lasidiplodia theobromae* and *Phanerochaete chrysosporium* were found to cause a robust necrotic lesion on *R. niveus*. These results indicate that these fungus isolates have the potential as a biological control agent for controlling *R. niveus*. In further studies, chemical identification of the metabolites responsible for herbicidal activity must be investigated.

**Key words:** *Rubus niveus*, metabolites, biological control, submerged fermentation, herbicide, foliar puncture, foliar damage, Galapagos.

**TABLA DE CONTENIDO**

1.Introducción .....	10
1.1. Islas Galápagos y su ecosistema.....	10
1.2. Especies introducidas .....	10
1.3. <i>Rubus niveus</i> .....	10
1.4. Control biológico.....	11
1.5. Hongos como control biológico .....	12
1.6. Objetivo.....	12
1.7. Justificación.....	13
2. Metodología .....	14
2.1. Área de estudio.....	14
2.2. Revisión sistemática.....	14
2.3. Fuente de microorganismos .....	15
2.4. Subcultivo de hongos en medio PDA .....	15
2.5. Fermentación en medio líquido.....	15
2.6. Extracción de los metabolitos fúngicos.....	16
2.7. Bioensayos (Inoculación por daño foliar) .....	16
3. Resultados .....	17
4.Discusión.....	20
5.Conclusión .....	24
6.Tablas.....	25
7.Figuras.....	26
8.Referencias Bibliográficas .....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Evaluación del daño foliar usando la extracción de metabolitos producidos por *P. chrysosporium* sobre *R. niveus* producidos con diferentes métodos de fermentación .....25



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo prisma correspondiente a la identificación, selección e inclusión de los artículos para la revisión sistemática .....	26
<b>Figura 2.</b> Bioensayo de daño foliar en <i>R. niveus</i> . Zonas de inoculación de los metabolitos fúngicos y PDB en la hoja de <i>Rubus niveus</i> .....	27
<b>Figura 3.</b> Resultados de la revisión sistemática. Artículos encontrados basados en el tipo de fermentación usada para la producción de metabolitos fúngicos y diferentes bioensayos para evaluar el potencial herbicida .....	27
<b>Figura 4.</b> Resultados de la revisión sistemática. Artículos encontrados donde se reportan los géneros de hongos cuyos metabolitos tienen actividad herbicida.....	28
<b>Figura 5.</b> Evaluación de la actividad herbicida (daño foliar) y pH de los filtrados crudos de <i>L. theobromae</i> y <i>P. chrysosporium</i> sobre <i>R. niveus</i> , comparados con el control positivo (herbicida Paraquat) y el control negativo (PDB).....	28

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Islas Galápagos y su ecosistema

El archipiélago de Galápagos se compone de 127 islas, islotes y rocas, de las cuales sólo 19 son islas grandes. Galápagos se caracteriza por la diversidad de especies de flora y fauna que presenta, la cual se debe a su ubicación geográfica y corrientes que componen las condiciones climáticas adecuadas para ser hábitat de innumerables especies haciéndolo un lugar privilegiado (FCD & WWF, 2018). La flora es un componente primordial de las islas teniendo un estimado de 500 especies de plantas vasculares de las cuales se estima que 180 son endémicas como las margaritas gigantes (UNESCO, 2021). El ecosistema de Galápagos es frágil y se ve fácilmente vulnerado especialmente por la actividad antropogénica como el turismo, pesca ilegal y la introducción de especies invasoras (De Groot, 1983).

### 1.2. Especies introducidas e invasoras

Las especies invasoras son aquellas que se encuentran en expansión en un área donde no es nativa y cuya presencia supone un impacto negativo para la biocenosis (León & Vargas, 2009). Estas suponen una gran amenaza para la flora y fauna nativa de las islas debido a que tienen una alta adaptabilidad produciendo una descendencia fértil por lo que son unas buenas colonizadoras y se expanden con facilidad. (Colautti & MacIsaac, 2004). En Galápagos se han introducido varias especies tanto de flora como de fauna, registrando un total de 1579 especies introducidas para el año 2017, donde las especies de plantas más invasoras son: guayaba (*Psidium guajava*), cedrela (*Cedrela odorata*), pasto elefante (*Pennisetum purpureum*), cascarilla (*Cinchona pubescens*) y mora (*Rubus niveus*) (FCD & WWF, 2018).

### 1.3. *Rubus niveus*

*Rubus niveus* (mora silvestre) es una de las especies más problemáticas para los ecosistemas terrestres de Galápagos. Esta planta es originaria de India y Sureste de Asia, fue introducida a Santa Cruz en 1968 desde América Central. A partir de este evento, la

distribución de la mora en el archipiélago creció considerablemente, mostrando una tasa constante de expansión de 175 ha/ año (Rentería et al., 2012). La distribución de *R. niveus* es amplia en el archipiélago, actualmente cubre grandes extensiones de tierra en San Cristóbal y Santa Cruz mientras que en Isabela, Santiago y Floreana su extensión es más pequeña pero se está expandiendo moderadamente (Quinton et al., 2011).

*R. niveus* es un arbusto trepador que alcanza una altura máxima de 4.5 m perteneciente a la familia de las rosáceas, crece en las zonas húmedas y produce frutos comestibles a partir de los 6 meses de edad. La planta puede reproducirse por dispersión vegetativa o por semillas que permanecen viables en el suelo por al menos 10 años, lo que implica un problema para el control de esta especie (Atkinson et al., 2008). Esta planta ha invadido vegetación abierta formando parches de hasta 4 m de altura, desplazando la vegetación nativa y ha amenazado muchas comunidades nativas. En las zonas agrícolas la mora se ha esparcido agresivamente invadiendo cultivos tornando los suelos infértiles, de este modo ocasionando problemas económicos (Quinton et al., 2011). El control de esta especie se lleva a cabo por medio del uso de herbicidas conjunto con el control mecánico (remoción manual); sin embargo, su control no ha sido efectivo (Charles Darwin Foundation, 2021).

#### **1.4. Control biológico**

El control biológico usa patógenos naturales para reducir las plagas a densidades menores de manera temporal o permanente (Van Driesche & Hoodle, 2007). El objetivo del control biológico es que los microorganismos o sus productos derivados se instauren en su nuevo ambiente, ocasionando daños en las malezas para reducir su competitividad, producción reproductiva y crecimiento de la población (Royet, 2020). A diferencia de los métodos de control convencionales esta técnica es inocua para los humanos, es biodegradable y, no deja residuos tóxicos; evitando la contaminación del ambiente y disminuye el problema de la resistencia (Royet, 2020). Adicionalmente, esta técnica permite conservar áreas

ambientalmente sensibles o propensas a la degradación, así como lo es Galápagos (UNESCO, 2021). A lo largo de la historia se ha empleado los hongos principalmente como pesticidas microbianos para controlar las malezas que alteraban los cultivos. Actualmente se investiga el uso de biopesticidas como una rama del control biológico (Uludag et al., 2018). Los biopesticidas son formulaciones en las que su componente activo son microorganismos vivos o productos derivados que se usan para el control de malezas, en donde los hongos fitopatógenos o sus fitotoxinas son usados en su formulación (Glare, et al., 2012).

### **1.5. Hongos como control biológico**

Los hongos son organismos heterótrofos que se dividen en dos grandes grupos: mohos y levaduras. Presentan reproducción sexual o asexual y algunos pueden producir esporas (Madigan, 2015). Los hongos pueden ser endófitos, saprofitos y patógenos, siendo de interés los patógenos; ya que, se caracterizan por ocasionar enfermedades en las plantas y producir manchas cloróticas, necróticas o marchitamiento. Muchos de estos hongos se caracterizan por producir metabolitos secundarios (compuestos de bajo peso molecular) que no son esenciales para el crecimiento, reproducción o desarrollo de los hongos (Bills & Gloer, 2016). Estos compuestos químicos secundarios exhiben propiedades farmacéuticas, agroquímicas, biológicas mientras que otros están involucrados en interacciones de enfermedades con plantas o animales (Fox & Howlett, 2008). Se conoce que la patogenicidad de los hongos está relacionada con los compuestos activos presentes en las fitotoxinas que juegan un papel crítico en la patogenicidad, la inducción de síntomas de enfermedades y la tasa de virulencia del patógeno en las malezas, por ello, los metabolitos secundarios deben ser explorados para el control biológico (Triolet et al., 2020).

### **1.6. Objetivo**

Se han identificado en estudios previos hongos patógenos, saprofitos y endófitos de *Rubus niveus* en San Cristóbal-Galápagos. Por ello, el objetivo principal de este estudio es

determinar la actividad herbicida de los metabolitos de hongos aislados de *Rubus niveus* en San Cristobal-Galápagos como posible biocontrol. Adicionalmente, evaluar qué protocolo de siembra y extracción de metabolitos produce mayor rendimiento y efectividad; así como, realizar una revisión sistemática con el fin de analizar sí el control biológico por medio de metabolitos fúngicos es viable.

### **1.7. Justificación**

Galápagos posee un ecosistema único con una alta tasa de biodiversidad, por lo que la conservación de esta isla es primordial. Sin embargo, no es una tarea fácil, ya que su biodiversidad se ve afectada por la actividad antropogénica, especialmente por la introducción de especies invasoras que amenazan a la isla. *Rubus niveus* es una de las especies más problemáticas alcanzado una extensión para el 2009 de 30.000 ha pudiendo alcanzar las 90.000 (CDF, 2009). Esta especie ha puesto en la lista roja de la UICN a *Scalesia pedunculata* una especie endémica para la isla (Rentería et al., 2012). El manejo de las especies invasoras es de suma importancia debido a que desplazan especies nativas, alteran la estructura y funcionamiento de las comunidades biológicas.

El control por métodos manuales y químicos se ha visto inefectivo debido a que esta planta produce semillas que son viables por al menos 10 años y el acceso a la remoción mecánica es complicada debido a los matorrales densos con espinas formadas (Atkinson et al., 2008). Por ello, es fundamental la evaluación de otras alternativas para evitar que esta planta invasora siga expandiéndose. El control biológico es una alternativa que se ha visto plausible y debe ser considerada en este caso; ya que, no es invasiva y ayudaría a mitigar los efectos ambientales ocasionados por el uso de herbicidas químicos. Debido a que algunos hongos son patógenos para la mora, siendo los metabolitos secundarios los responsables por la actividad fitotóxica se debe explorar el uso de estos como agentes bioherbicidas (Triolet et al., 2020).

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Área de estudio

Previamente en el proyecto de maestría en Microbiología de la USFQ realizado por Noelia Barriga titulado “Exploring fungal pathogens to control invasive raspberry (*Rubus niveus*) in Galapagos Islands” dentro del contrato marco MAE-DNB-CM-2016-0041; los hongos fueron aislados de hojas, frutos y tallo de *Rubus niveus*, que presentaban síntomas de enfermedades en la isla de San Cristóbal-Galápagos en la zona húmeda (Agrícola) a 200-700 msnm. Se obtuvieron un total de 595 hongos aislados los cuales se clasificaron morfológicamente en 226 fenotipos. Se realizaron ensayos de patogenicidad inoculando conidios a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios por ml. Con los diferentes aislados, en hojas sanas de *R. niveus*, obteniendo 6 hongos como posibles candidatos herbicidas, los cuales fueron identificados a base de técnicas de ADN amplificando de las regiones: ITS, TEF1 (elongation factor 1 alpha), TUB (Beta-tubulin), RPB2 (RNA polymerase II gene) y GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Los hongos fueron identificados como *Bionectria pseudostriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloesporoides*, *Fusarium concentricum*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Penicillium rolfsii*. Todos los hongos fueron aislados en el Galapagos Science Center (GSC) en San Cristóbal y trasladados al Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad San Francisco de Quito, Pichincha, Ecuador para continuar con su análisis molecular y evaluar el efecto bioherbicida (Barriga, 2019).

### 2.2. Revisión sistemática

Se realizó una revisión sistemática en la base de datos SCOPUS. La pregunta de investigación fue: ¿Pueden los metabolitos de los hongos ser usados como bioherbicidas? Para ello, los términos de búsqueda usados fueron: “Bioherbicidas AND Fungi AND Metabolites AND Weed control”. Para el análisis de los datos se tomó en cuenta únicamente los artículos de investigación científica. Se discriminaron los documentos preliminarmente por título y

abstract. Se realizó un screening final en donde los criterios de discriminación usados fueron: “Duplicados o sin abstract”, “No son artículos”, “No habla de metabolitos fúngicos”, “No experimentación/bioensayos”, “Fuera del área del interés”, “Null entries”, resultando en 47 papers a ser analizados para los fines pertinentes como se evidencia en la figura 1.

### **2.3. Fuente de los microorganismos**

Para fines de este proyecto se seleccionaron los hongos positivos (*Bionectria pseudostrata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Fusarium concentricum*, *Penicillium rolfii*, *Phanaerochaete chrysosporium*) del proyecto realizado por Noelia Barriga (2019) y se seleccionaron 26 aislados al azar, de diferente fenología, que presentaban fácil cultivo y manejo, para evaluar su potencial bioherbicida.

### **2.4. Subcultivo de hongos en medio PDA**

Las cepas de los hongos previamente aislados se usaron para hacer el subcultivo. Se empleó una cabina de bioseguridad tipo II en donde se realizó el subcultivo por duplicado de los aislados, para ello se cortó con la ayuda de un bisturí un trozo de agar con el hongo (5x5 mm) y se colocó en una nueva caja Petri con medio PDA (Potato Dextrose Agar). Una vez que los aislados fueron subcultivados, se usó parafilm para sellar las cajas y se procedió a incubar durante 7-15 días a 28°C (Frisvad, 2012).

### **2.5. Fermentación en medio líquido**

La fermentación en medio líquido se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Akbar et al., 2014 y Qiang et al., 2010 con algunas modificaciones. Se tomó 3 mm de disco del hongo que fue subcultivado en medio PDA con ayuda del sacabocados y se colocó en 75 ml de medio PDB (Potato Dextrose Broth) esterilizado en un frasco Erlenmeyer. Se incubó al menos 15 días a 28°C, los ensayos se realizaron por duplicado. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los aislados, se procedió a incubar con agitación a 200 rpm a 28°C por al menos 15 días.

## **2.6. Extracción de los metabolitos fúngicos**

Se filtró el caldo fermentado de los aislados a través de una media nylon esterilizada y el caldo resultante se volvió a filtrar a través de un papel filtro Whattsman No. 1 esterilizado. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min el coctel de metabolitos obtenidos y el caldo se filtró nuevamente a través de un filtro millipore de 0.22 micras. Los metabolitos se refrigeraron a 4°C hasta ser usados. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los aislados, pero en este caso se omitió el paso de centrifugación. Se realizaron ambos procedimientos con el fin de determinar qué metodología es la más efectiva para la extracción de metabolitos (Protocolo modificado de: Akbar et al., 2014 y Qiang et al., 2010). La biomasa una vez filtrada fue pesada y al caldo de metabolitos se midió el pH.

## **2.7. Bioensayos (Inoculación por daño foliar)**

Los bioensayos con los filtrados se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Mohammed et al., 2020 con algunas modificaciones. Las hojas de mora sanas se colectaron en el campo y desinfectaron superficialmente con la ayuda de un papel humedecido con alcohol al 70% y se lavaron con agua destilada estéril. Se inoculó 5 µl del caldo de metabolitos en los diferentes puntos como se muestra en la figura 2. Como control negativo se inoculó 5 µl de PDB y se usó Paraquat (herbicida químico) como control positivo. El ensayo se realizó por duplicado. Las hojas de mora se colocaron en bandejas con papel de cocina humedecido en la base y se cubrió con film plástico creando de este modo una cámara húmeda. Las cámaras húmedas se almacenaron a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) por 7 días en un período de luz/oscuridad. Cada día se observó y evaluó el efecto del metabolito sobre las hojas. Después del período de incubación, se evaluó la dimensión de la lesión; si presentaba una herida mayor o igual a 7 mm de diámetro se consideraba como candidato herbicida.



### 3. RESULTADOS

Después de realizar la revisión sistemática y aplicar los diferentes criterios de exclusión, se encontraron 47 investigaciones que cumplían las especificaciones para los fines pertinentes de esta investigación, mismos que fueron analizados (Figura 1). El análisis general de los artículos científicos publicados desde 1999 al 2020 muestra que el método más usado para llevar a cabo el proceso de fermentación para la producción de metabolitos es la fermentación en medio líquido, en donde 37 investigaciones de las 47 encontradas usaron esta metodología, mientras que sólo en 10 investigaciones usan fermentación en medio sólido (Figura 3). En cuanto al tipo de bioensayos que se llevó a cabo en la literatura analizada para evaluar la actividad bioherbicida se muestra que los ensayos de pulverización foliar (spray foliar assays) predominan siendo reportados en 19 investigaciones, seguidos de ensayos de punción foliar en 17 investigaciones, consiguientemente ensayos de germinación de semillas en 11 investigaciones, mientras que en menor medida se efectúan ensayos sistemáticos (adsorption assays) en tan sólo 5 investigaciones (Figura 3).

Por otra parte, los géneros de hongos que se muestran más estudiados por su potencial herbicida son: *Phoma* spp. en 11 artículos, *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. siendo reportados en 6 artículos cada uno, mientras que géneros como *Aureobasidium* spp., *Stagonospora* spp., entre otros se reportan en menor medida, siendo géneros más desconocidos (Figura 4). En todos los ensayos que evaluaban el potencial bioherbicida de los metabolitos producidos por los hongos se mostró que causaban lesiones en las hojas o inhibían el crecimiento de la semilla en gran medida o a su vez disminuían el tamaño de la planta, mostrándose los metabolitos fúngicos efectivos para el control biológico de las malezas.

Para determinar qué protocolo de siembra y extracción de metabolitos produce un mayor rendimiento y efectividad, se probaron con 4 de los 6 hongos positivos (causan herida) de la investigación previa realizada. Se observó que al aplicar el filtrado crudo obtenido bajo

diferentes procedimientos: con agitación y centrifugación, con agitación y sin centrifugación y sin agitación ni centrifugación, no produjeron ningún tipo de lesión en las hojas de mora (*Rubus niveus*). Por otra parte, las hojas presentaron una lesión mayor a 7 mm en las zonas con previa lesión al aplicarse los metabolitos obtenidos con centrifugación y sin agitación, como se evidencia en la tabla 1. Por ello, se determinó que el mejor método para la siembra y extracción de metabolitos para esta investigación es sin agitación y con centrifugación a 5000 rpm, por lo que fue el protocolo seleccionado para realizar los demás bioensayos.

Con el objetivo de evaluar la actividad bioherbicida de los metabolitos fúngicos sobre *R. niveus* se realizaron bioensayos de daño foliar en los que únicamente los metabolitos de los hongos *L. theobromae* y *P. cryosporium* ocasionaron lesiones necróticas en las hojas de mora de más de 7 mm de diámetro (Figura 5). Las lesiones se observaron en la zona con previa lesión, mientras que, en la zona sin lesión previa, no se observó ningún tipo de necrosis, siendo estos dos hongos considerados posibles agentes para el control de la mora silvestre en Galápagos. Por otro lado, los 30 filtrados (metabolitos fúngicos) restantes testeados no mostraron lesiones mayores a 7 mm en las hojas de la mora, por lo que, fueron descartados como posibles agentes para el control de *Rubus niveus*.

Por su parte, el control positivo que fue el Paraquat presentó lesiones necróticas generalizadas en las hojas ocasionado que éstas se debiliten y se rompan. El control negativo empleado para estos bioensayos (PDB) no presentó lesiones ni daños en las hojas de este modo validando los bioensayos, siendo evidenciado en la figura 5. Adicionalmente, se midió el pH de los filtrados y se pesó la biomasa seca del micelio. Se obtuvo que unos aislados fúngicos durante la fermentación acidificaban en un rango de 4-5 el caldo, mientras que, otros alcalinizaban en un rango de 7-8. En ambos casos *P. crhyosporium* y *L. theobromae* que mostraron actividad herbicida, mantuvieron un pH neutro.

En cuanto a la biomasa producida en la fermentación se encuentra en un rango de 0.92-0.36 g por contenedor de fermentación. Donde el hongo con código 61T4.3 produjo la mayor cantidad de biomasa con 0.92 g; sin embargo, los metabolitos fúngicos del aislado no mostraron actividad herbicida.

#### 4. DISCUSIÓN

El control de especies invasoras siempre ha sido una preocupación importante, tediosa, costosa y crítica en las áreas de ecosistemas únicos, como es el caso de las Islas Galápagos, donde estas especies foráneas alteran el hábitat de especies nativas. Se han ideado diferentes herramientas y métodos como el deshierbe mecánico y químico para erradicar las especies invasoras (Triolet et al., 2020). Sin embargo, estos métodos se han vuelto inefectivos para el manejo de las especies invasoras, un ejemplo de esto es *Rubus niveus* en Galápagos. El control de esta especie es complicada, ya que forma densos matorrales espinosos, además de la larga viabilidad de sus semillas, provocando cambios en la composición y estructura de las comunidades biológicas (Rentería et al., 2012). Por ello, el control biológico es una alternativa viable, sustentable y amigable para sus ecosistemas. Triolet et al. (2020) indicó que muchos hongos son patógenos para las plantas, incluidas las malas hierbas, siendo tanto los hongos como sus metabolitos secundarios responsables de causar patogenicidad en las plantas, revelando un potencial como agentes de control biológico.

Es por esto que, en el proyecto previo a esta tesis, realizado en la maestría de Barriga del 2016-2019 (Barriga, 2019), se quiso encontrar un hongo que funcione como control biológico contra *R. niveus*, en donde se evaluó el potencial herbicida de hongos aislados de *Rubus niveus* a través de ensayos de daño foliar, resultando *B. pseudostriata*, *F. concentricum*, *L. theobromae*, *C. gloesporoides*, *P. rolfsii* y *P. chrysosporium* los hongos que exhibieron daños en las hojas de la mora. Sin embargo, estos no pueden ser usados, ya que, son generalistas pudiendo afectar a otras plantas no objetivo, incluyendo nativas (Barriga, 2019). Debido a que estos hongos tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, éstos son una alternativa para evaluar el control biológico de la mora. No se ha reportado el uso de metabolitos fúngicos para el control de *Rubus niveus*, pero Oleskevich et al. 2009 identificó a *Fusarium avenaceum* como agente para el control de *Rubus* spp., siendo la moniliformina un compuesto producto de

su metabolismo secundario. De este modo se cree que los metabolitos de los hongos aislados previamente por Barriga pueden ser agentes para el control biológico de *R. niveus*.

En este estudio se realizó fermentación de los hongos en medio líquido para la producción de metabolitos secundarios, ya que nos permite controlar de mejor manera la temperatura, la aireación, el pH, agitación entre otros factores que son determinantes para la producción de metabolitos secundarios así se asegura la homogeneidad en el medio de cultivo (Frisvad, 2012). Además, que el proceso de aislamiento y extracción de metabolitos en medio líquido es mucho más sencillo porque estas moléculas químicas se disuelven en el medio de cultivo facilitando la extracción y evitando pérdidas durante el proceso, en contraste con los metabolitos producidos en medio sólido cuya extracción y aislamiento es difícil debido a que estos quedan adheridos en el medio sólido, imposibilitando la separación por completo y disminuyendo la concentración (Brun et al., 2020).

Para probar el potencial herbicida de los metabolitos se realizaron ensayos de daño foliar evaluando el daño visible en las hojas de la mora, este ensayo se ha reportado como efectivo, además que es el método cuantitativo para evaluar la actividad herbicida. Los metabolitos actúan causando lesiones en las hojas, y los daños observados son lesiones necróticas asociados a la patogenicidad del hongo o su metabolito secundario. La necrosis en los tejidos vivos son el resultado de afectaciones estructurales, fisiológicas, bioquímicas y metabólicas en la planta huésped causando cambios en el huésped generando hojas cloróticas y senescentes en los sitios en contacto con el metabolito (Adetunji et al., 2020).

Adetunji et al. (2017) menciona que la composición del medio de cultivo y factores como agitación, temperatura pueden tener un efecto sobre la expresión de los metabolitos secundarios, la potencia de su actividad fitotóxica y la viabilidad durante el almacenamiento. Por ello, la selección de protocolos adecuados es indispensable para la siembra, fermentación y extracción de estos compuestos productos del metabolismo secundario.

Se demostró que el mejor método de siembra es sin agitación del propágulo durante la fermentación y la extracción de metabolitos fue con centrifugación a 5000 rpm. Posiblemente se debe a que la agitación genera fuerzas de corte que pueden afectar a los microorganismos de varias maneras, por ejemplo, daño a la estructura celular, cambios morfológicos, así como variaciones en la tasa de crecimiento, de este modo se disminuye la síntesis de metabolitos fúngicos (Papagianni, 2004).

En cuanto a los ensayos de fitotoxicidad únicamente los metabolitos pertenecientes a *Lasiodiplodia theobromae* y *Phanerochaete chrysosporium* causaron lesiones necrosantes en las zonas con previa lesión como se indica en la figura 5. En las zonas sin previa lesión no se evidencia heridas mayores a 7 mm, esto se puede deber a que el mecanismo de infección de los hongos patógenos se realiza a través de la lesión en la planta, ya que, en estas zonas quedan expuestos ciertos sustratos como lípidos o almidón de almacenamiento que facilitan colonizar la zona y destruirla por acción de sus propiedades fitotóxicas (Petrini et al., 1993).

Los metabolitos de *Lasiodiplodia theobromae* exhibieron actividad herbicida que puede ser atribuida a que este hongo es patógeno o endófito no específico del huésped, se ha reportado que este hongo está asociado a 500 plantas diferentes causando enfermedades como la pudrición de la fruta, la pudrición de la raíz, la muerte regresiva y el cancro (Uranga, 2017). Salvatore et al. (2020) reportó que este hongo es capaz de producir metabolitos secundarios con una gran aplicabilidad. Los metabolitos producidos son de gran diversidad estructural entre los importantes están: dicetopiperazinas, jasmonatos, lactonas, melleínas. El cóctel de metabolitos empleado en los bioensayos podría tener algunos de estos compuestos que pueden ocasionar lesiones en la membrana de las hojas (Salvatore et al., 2020).

Así mismo *Phanerochaete chrysosporium* es un hongo saprofítico que se encuentra distribuido mundialmente. Reportes indican que puede causar daños en las plantas o podredumbre de madera. Se conoce que este hongo tiene la capacidad de producir compuestos

secundarios con actividad lignolítica como las ligninasas que actúan degradando la lignina presente en la pared secundaria de las plantas, siendo componente de las hojas de la mora, de forma que la lignina es degradada dejando expuesta la celulosa ocasionando un fenómeno conocido como la pudrición blanca (Almeida, 2012), siendo candidato para el control biológico de *R. niveus*.

Los caldos fermentados de los demás metabolitos fúngicos aislados probados no mostraron actividad herbicida. No se observaron lesiones mayores a 7 mm por lo que fueron descartados para el control biológico de la mora invasiva. Pudo ser el hecho de que muchos de estos hongos son endófitos lo que quiere decir que tiene una interacción planta-microorganismo benéfica, por lo que, no causan ningún tipo de enfermedad en la planta (Zhang et al., 2019).

Por el contrario, puede ser que los metabolitos sintetizados por estos hongos tengan actividad benéfica que promueva el crecimiento de la planta o que éstos protejan a la mora de otros patógenos (Saikkonen et al., 1998). Otra alternativa para la ineffectividad de estos compuestos secundarios pudo ser que estaban presentes en el caldo fermentado en una baja concentración. Según Brun et al (2020) la actividad herbicida está directamente relacionada con la concentración de los metabolitos en el caldo fermentado; por ello, es importante la selección de la metodología y condiciones adecuadas para optimizar la síntesis de estos compuestos.

## 5. CONCLUSIÓN

*Rubus niveus* es una especie invasora de las islas Galápagos que se ha convertido en una plaga por su capacidad reproductiva y colonización en las islas, afectando la naturaleza de las comunidades biológicas, de este modo desplazando la flora nativa de la zona. Debido a que el manejo de esta especie invasora por métodos mecánicos y químicos no han sido efectivos, se propone el control biológico como una alternativa para su control, en donde los hongos y sus compuestos derivados son responsables de la patogenicidad en las plantas siendo potenciales agentes para el control biológico.

A partir de la revisión sistemática se concluyó que el método de elección para la producción de metabolitos fúngicos es por medio de la fermentación sumergida. Para la evaluación de la actividad herbicida los ensayos más usados son por pulverización o punción foliar, siendo *Phoma* spp el género más estudiado por su actividad bioherbicida.





Es fundamental usar la metodología y condiciones adecuadas para extraer los compuestos del metabolismo secundario de los hongos, por ello se evaluaron metodologías distintas con el fin de optimizar este proceso. Se determinó que el mejor método de siembra y extracción de metabolitos secundarios era a través del uso de fermentación en medio líquido sin agitación y su extracción con centrifugación a 5000 rpm.

Finalmente, se concluyó que los metabolitos obtenidos de *Lasiodiplodia theobromae* y *Phanerochaete chrysosporium* exhibieron potencial herbicida, por tanto, deben ser considerados como posibles agentes para el control de *R. niveus*. A futuro se espera continuar con la obtención de metabolitos de los otros hongos aislados con el fin de encontrar alguno con capacidad de causar daño foliar efectivo a *Rubus niveus* e identificar químicamente los compuestos responsables de la actividad herbicida.

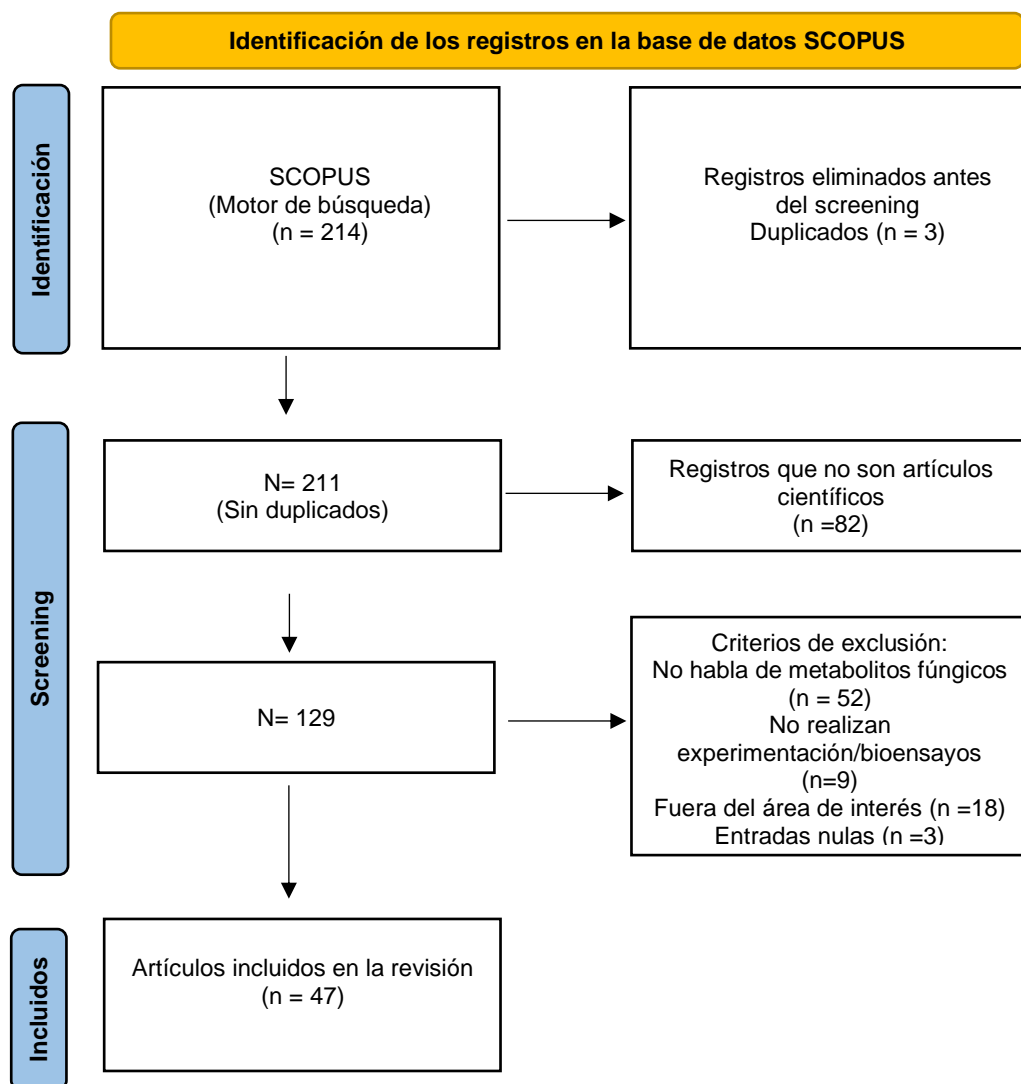


## 6. TABLAS

**Tabla 1.** Evaluación del daño foliar usando la extracción de metabolitos producidos por *P. chrysosporium* sobre *R. niveus* producidos con diferentes métodos de fermentación

Metodología	Resultados	Observaciones
Con agitación y centrifugación		No se evidencian lesiones $\geq$ 7 mm.
Con agitación y sin centrifugación		No se evidencian lesiones
Sin agitación y con centrifugación		Lesiones necróticas $\geq$ 7 mm en zonas con previa lesión
Sin agitación ni centrifugación		No se evidencian lesiones

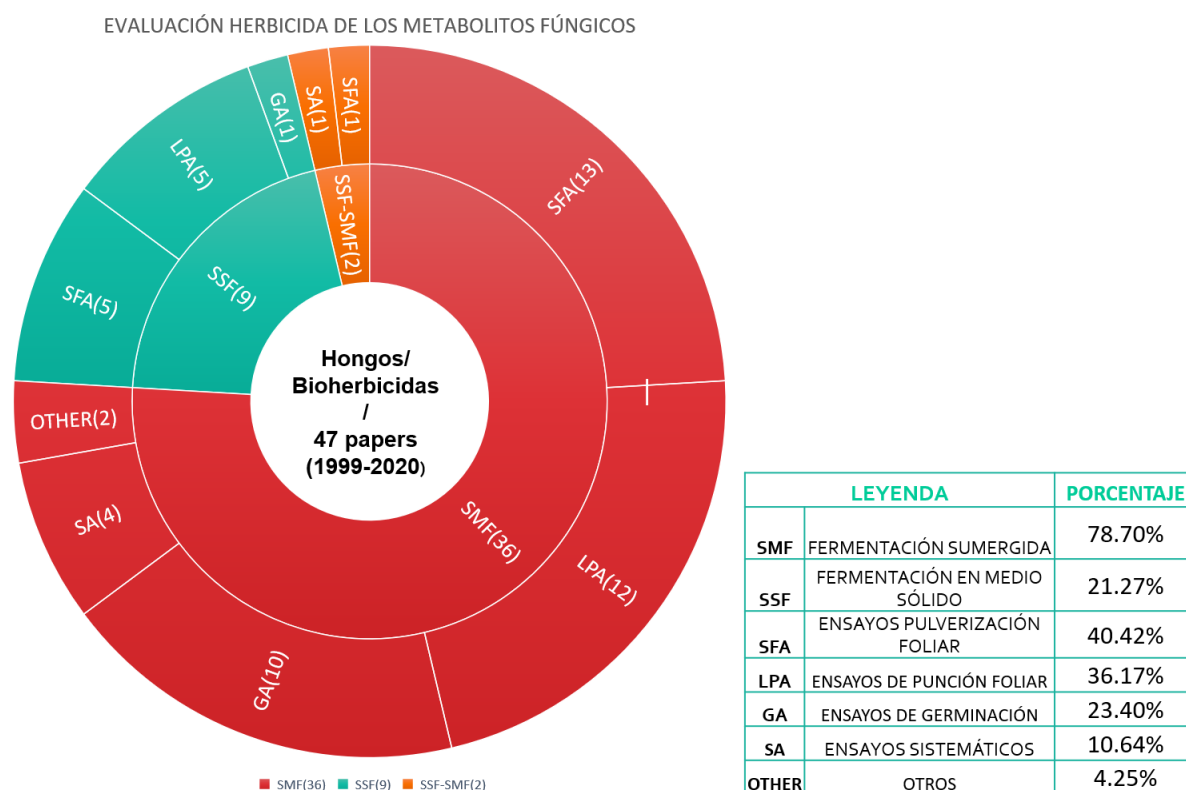
## 7. FIGURAS



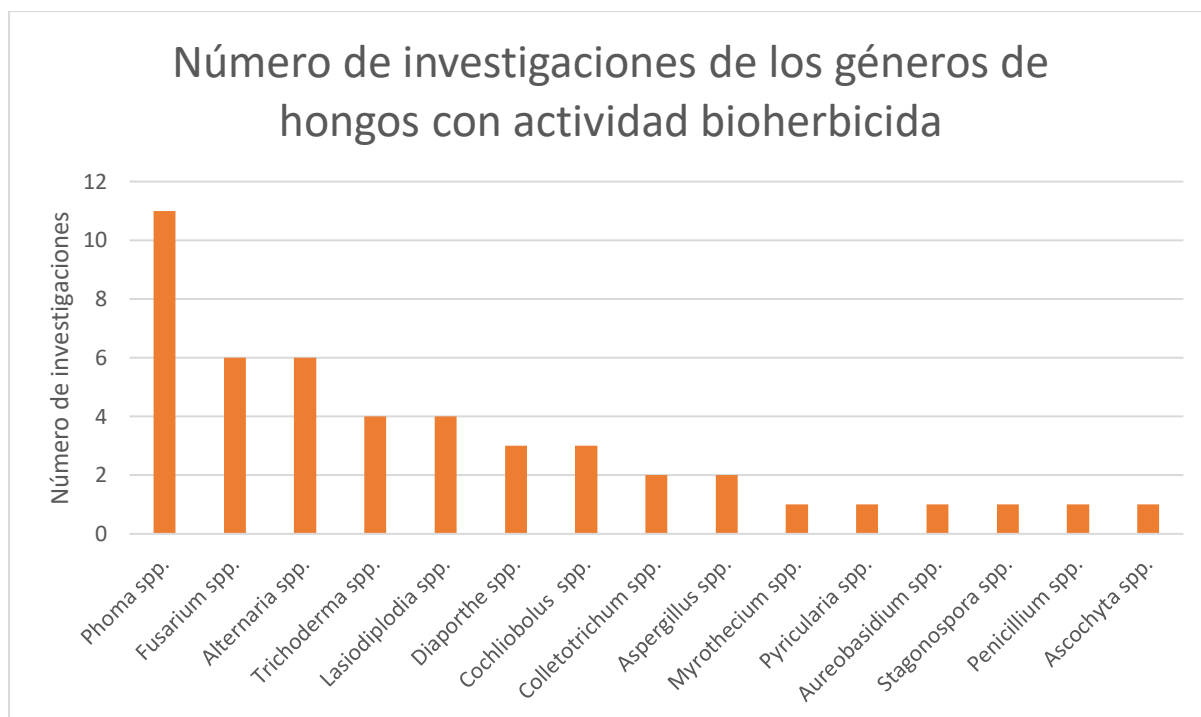
**Figura 1.** Diagrama de flujo prisma correspondiente a la identificación, selección e inclusión de los artículos para la revisión sistemática.



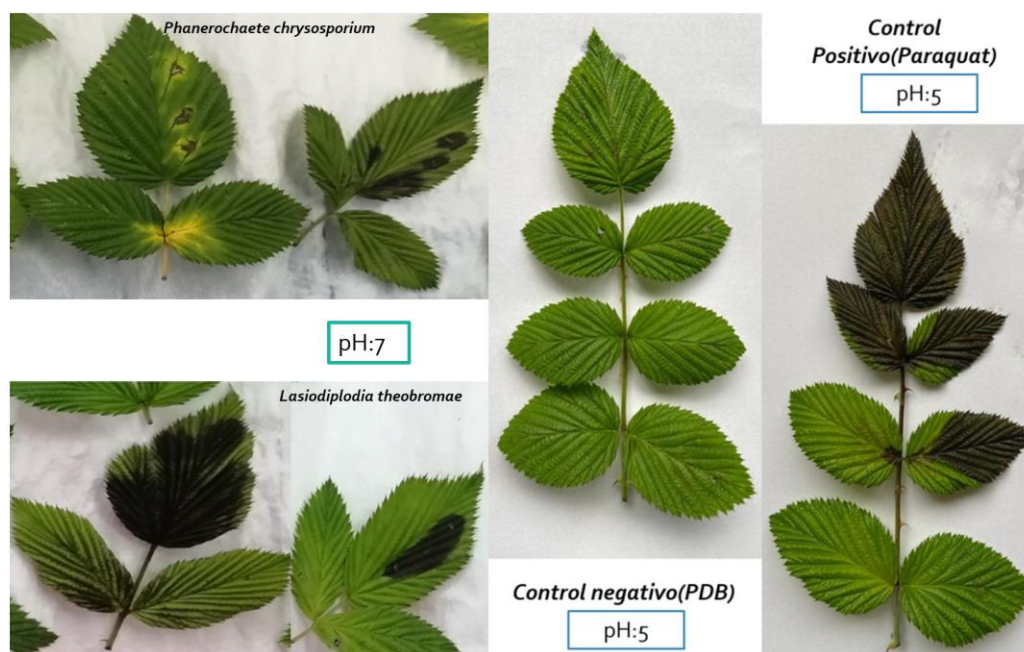
**Figura 2.** Bioensayo de daño foliar en *R. niveus*. Zonas de inoculación de los metabolitos fúngicos y PDB en la hoja de *Rubus niveus*.



**Figura 3.** Resultados de la revisión sistemática. Artículos encontrados basados en el tipo de fermentación usada para la producción de metabolitos fúngicos y diferentes bioensayos para evaluar el potencial herbicida.



**Figura 4.** Resultados de la revisión sistemática. Artículos encontrados donde se reportan los géneros de hongos cuyos metabolitos tienen actividad herbicida.



**Figura 5.** Evaluación de la actividad herbicida (daño foliar) y pH de los filtrados crudos de *L. theobromae* y *P. chrysosporium* sobre *R. niveus*, comparados con el control positivo (herbicida Paraquat) y el control negativo (PDB).

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adetunji, C. O., Oloke, J. K., & Prasad, G. (2020). Effect of carbon-to-nitrogen ratio on eco-friendly mycoherbicide activity from *Lasiodiplodia pseudotheobromae* C1136 for sustainable weeds management in organic agriculture. *Environment, Development and Sustainability*, 22(3), 1977-1990. <https://doi.org/10.1007/s10668-018-0273-1>
- Adetunji, C. O., Oloke, J. K., Prasad, G. S., & Adejumo, I. O. (2017). Effect of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* Isolates, a potential bioherbicide for *Amaranthus hybridus* L. maize culture. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(1), 131–137. <https://doi.org/10.15835/nsb9110018>.
- Akbar M. y col. Holadysenterine, un herbicida natural de *Drechslera australiensis* para el tratamiento de *Rumex dentatus*. *J Agric Food Chem*. 2014; 62: 368- 72.
- Almeida, F. (2012). Estudio de la generación de extractos con actividad ligninolítica a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en un fermentador de bandejas. <https://1library.co/document/z1dwk08z-estudio-generacion-extractos-actividad-ligninolitica-phanerochaete-chrysosporium-fermentador.html>
- Atkinson R, Renteria JL, Simbana W, 2008. The consequences of herbivore eradication on Santiago - are we in time to prevent ecosystem degradation again? *Galapagos Report*, 2007-2008 [ed. by Cayot L J, Toral M V]. Puerto Ayora, Galapagos, Ecuador: Charles Darwin Foundation, Galapagos National Park, INGALA, 121-124
- Barriga, Noelia. (2020). Exploring fungal pathogens to control invasive raspberry (*Rubus niveus*) in Galapagos Islands. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/9162>
- Bills GF, Gloer JB.(2016). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. En *The Fungal Kingdom* (pp. 1087-1119). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016>

- Brun, T., Rabuske, J. E., Confortin, T. C., Luft, L., Todero, I., Fischer, M., Zobot, G. L., & Mazutti, M. A. (2020). Weed control by metabolites produced from *Diaporthe schini*. *Environmental Technology*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1780477>
- CDF. (2009). Charles Darwin Foundation, Galapagos. Providing Technical Assistance to the Control of the Invasive Blackberry *Rubus niveus* on the Islands of Santiago and Floreana.
- Charles Darwin Foundation. (2021). *Lista de Especies de Galápagos*. Retrieved from *Rubus niveus* Thunb.: <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=706>
- Colautti, R. I., & MacIsaac, H. J. (2004). A neutral terminology to define 'invasive' species. *Diversity and Distributions*, 10(2), 135-141. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2004.00061.x>
- De Groot, R. S. (1983). Tourism and conservation in the Galapagos Islands. *Biological Conservation*, 26(4), 291-300. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(83\)90093-9](https://doi.org/10.1016/0006-3207(83)90093-9)
- Frisvad, J. C. (2012). Media and Growth Conditions for Induction of Secondary Metabolite Production. En N. P. Keller & G. Turner (Eds.), *Fungal Secondary Metabolism* (pp. 47-58). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-122-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-122-6_3)
- Fundación Charles Darwin (FCD) y WWF-Ecuador. (2018). *Atlas de Galápagos, Ecuador: Especies Nativas e Invasoras*. Quito, FCD y WWF Ecuador
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Stewart, A. (2012). ¿Han alcanzado la mayoría de edad los bioplaguicidas? *Trends in biotechnology*, 30 (5), 250-258. DOI: 10.1016 / J.TIBTECH.2012.01.003
- Howlett, B.J. & Fox, E.M. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 481-487. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.007>.

- León, O., & Vargas, O. (2009). *Las especies invasoras: Un reto para la restauración ecológica* (pp. 19-38).
- Madigan, M. (2015). Brock. *Biología de los microorganismos*. Pearson education. Isbn 978-84-9035-280-9. Oclc 966850150.
- Mohammed, Y. M. M., & Badawy, M. E. I. (2020). Potential of phytopathogenic fungal isolates as a biocontrol agent against some weeds. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00295-0>
- Oleskevich, C., Shamoun, S. F., Vesonder, R. F., & Punja, Z. K. (2009). Evaluation of *Fusarium avenaceum* and other fungi for potential as biological control agents of invasive *Rubus* species in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1080/07060669809500440>
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189-259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L., & Viret, O. (1993). Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1(3), 185-196. <https://doi.org/10.1002/nt.2620010306>
- Qiang, S., Wang, L., Wei, R., Zhou, B., Chen, S., Zhu, Y., Dong, Y., & An, C. (2010). Bioassay of the Herbicidal Activity of AAC-Toxin Produced by *Alternaria alternata* Isolated from *Ageratina adenophora*. *Weed Technology*, 24(2), 197-201. <https://doi.org/10.1614/WT-D-09-00016.1>
- Quinton, J. M. S., Fay, M. F., Ingrouille, M., & Faull, J. (2011). Characterisation of *Rubus niveus*: A prerequisite to its biological control in oceanic islands. *Biocontrol Science and Technology*, 21(6), 733-752. <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.570429>

- Rentería, J. L., Gardener, M. R., Panetta, F. D., Atkinson, R., & Crawley, M. J. (2012). Possible Impacts of the Invasive Plant *Rubus niveus* on the Native Vegetation of the Scalesia Forest in the Galapagos Islands. *PLOS ONE*, 7(10), e48106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048106>
- Royet Barroso, J. (2020). Control biológico de malezas: un enfoque microbiológico biological control of weeds: a microbiological approach.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 319-343. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.319>
- Salvatore, M. M., Alves, A., & Andolfi, A. (2020). Secondary Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, Chemical Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *Toxins*, 12(7), 457. <https://doi.org/10.3390/toxins12070457>
- Triolet, M., Guillemain, J., Andre, O., & Steinberg, C. (2020). Fungal-based bioherbicides for weed control: A myth or a reality? *Weed Research*, 60(1), 60-77. <https://doi.org/10.1111/wre.12389>
- Uludag, A., Uremis, I., & Arslan, M. (2018). Biological Weed Control. En *Non-Chemical Weed Control* (pp. 115-132). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809881-3.00007-3>
- UNESCO. (2021). *Islas Galápagos*. Retrieved from <https://whc.unesco.org/en/list/1/>.
- Uranga, C. (2017). *Análisis metabolómico del hongo de la madera de vid Lasiodiplodia theobromae* *Metabolomic analysis of the grapevine trunk disease fungus Lasiodiplodia theobromae*. <https://1library.co/document/q5w374gq-analisis-metabolomico-lasiodiplodia-theobromaemetabolomic-analysis-grapevine-lasiodiplodia-theobromae.html>
- Van Driesche, R., & Hoodle, S. (2007). Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Forest Health technology enterprise team. Obtenido de



[https://www.fs.fed.us/foresthealth/technology/pdfs/VANDRIESCHE\\_CONTROL  
PPPPPY\\_PLAGAS\\_WEB.pdf](https://www.fs.fed.us/foresthealth/technology/pdfs/VANDRIESCHE_CONTROL_PPPPPY_PLAGAS_WEB.pdf)

zhang, Y., Yu, X., Zhang, W., Lang, D., Zhang, X., Cui, G., & Zhang, X. (2019). Interactions between Endophytes and Plants: Beneficial Effect of Endophytes to Ameliorate Biotic and Abiotic Stresses in Plants. *Journal of Plant Biology*, 62(1), 1-13.

<https://doi.org/10.1007/s12374-018-0274-5>